

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Giovanna Barbarini Longato

“Atividade anticâncer e mecanismo de ação de compostos isolados das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*”

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Giovanna Barbarini Longato

"Atividade anticâncer e mecanismo de ação de
compostos isolados das folhas de
Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. *regnellii*"

Este exemplar corresponde à redação
final da Tese defendida pela candidata

Giovanna Barbarini Longato

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutora
em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Biologia Celular.

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

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L855a Longato, Giovanna Barbarini, 1985-
Atividade anticâncer e mecanismo de ação de compostos isolados das
folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* / Giovanna Barbarini Longato.
– Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Coorientador: Mary Ann Foglio.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Piper regnellii*. 2. Resistência a múltiplas drogas. 3. Anticâncer. 4. Produtos
naturais. 5. Apiol. 6. Eupomatenóide-5. I. Carvalho, João Ernesto. II. Foglio, Mary
Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anticancer activity and mechanism of action of compounds isolated
from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* leaves.

Palavras-chave em inglês:

Piper regnellii
Multidrug resistance
Anticancer
Natural products
Apiole
Eupomatenoid-5

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]
Denise Gonçalves Priolli
Ana Carolina Souza de Santos Galvão
Karina Gottardello Zecchin
Karin Juliane Pelizzaro Rocha

Data de defesa: 28-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

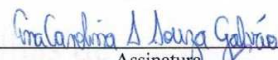
Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)


Assinatura

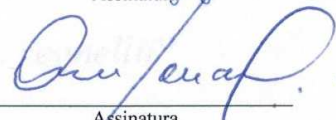
Dra. Karina Gottardello Zecchin


Assinatura

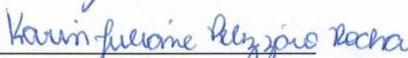
Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão


Assinatura

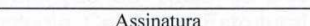
Dra. Denise Gonçalves Priolli


Assinatura

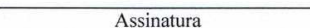
Dra. Karin Juliane Pelizzaro Rocha


Assinatura

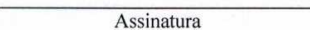
Dra. Cristina Pontes Vicente


Assinatura

Dra. Viviane Ferre de Souza


Assinatura

Dra. Ana Paula Oliveira Hohne


Assinatura

*Aos meus pais, José Luiz e Mariangela,
Pelo dom da vida, pelo amor incondicional,
Pela presença em todos os momentos,
Por todo incentivo e apoio,
Dedico-lhes este trabalho.*

*À minha família, em especial meus avós e irmã,
Pela preocupação constante e pelo carinho,
Dedico-lhes este trabalho.*

*Ao meu namorado Fábio, pelo amor, pelo encorajamento,
Por me fazer acreditar que posso ir além do que penso ser capaz,
Pela companhia maravilhosa nesses oito anos de namoro,
Dedico-lhe este trabalho.*

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre me dá forças para superar os desafios e sem O Qual eu nada seria;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP;

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pela oportunidade de trabalho;

À Profa. Dra. Mary Ann Foglio, por toda a orientação fitoquímica envolvida neste projeto e também pela amizade e carinho;

À Ana Lúcia, a quem eu sempre recorri em momentos de desespero, pelas inúmeras ajudas e sugestões, além do carinho, atenção e amizade prestados a mim;

À Sirlene e à Karin, pela colaboração indispensável na realização dos experimentos e pela amizade;

À Ana Possenti, minha “mãezona”, por todo apoio, por estar sempre presente nos momentos difíceis, tanto pessoais quanto profissionais, e por ser tão especial;

Às minhas amigas Giovanna Fiorito, Débora e Paula Monteiro pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração nos experimentos, pelas longas noites que passamos no laboratório, cansadas, em busca de resultados e pela companhia sempre agradável;

Ao pessoal da Farmacologia: Michelle, Vanessa, Larissa, Marianinha, Adriana, Paula Paiva, Fabiana, Humberto, Lucas e Rafael pela ajuda, pelo companheirismo e pelas risadas, fundamentais na convivência diária;

À Ilza, Núbia e Benicio pelo apoio técnico prestado e por estarem sempre dispostos a ajudar;

À professora Dra. Renata Perdomo, ao técnico Rafael José Padilha e à Sinara Almeida pela parceria estabelecida e pelos ensaios que corroboraram para o desenvolvimento desta tese;

Aos professores membros da pré-banca e da banca de Doutorado pela disponibilidade e pelas sugestões que enriqueceram esta tese;

À Liliam, secretária do programa de Pos-Graduacao em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela competência, profissionalismo e também pela atenção dispensada a mim e a todos os alunos deste programa;

À FAPESP, ao CNPq e à Capes pelo apoio financeiro;

A todos os amigos que de alguma forma colaboraram no pleno desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O câncer é a segunda causa de morte da população nos países em desenvolvimento. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de células instáveis que tendem a não responder aos estímulos internos e externos que controlam a proliferação, diferenciação e morte celular. O crescente entendimento da biologia tumoral tem fornecido alvos moleculares para a triagem orientada de quimioterápicos e de agentes quimiopreventivos, geralmente de origem natural ou sintetizados com base em produtos naturais. A partir do extrato bruto diclorometânico das folhas de *Piper regnellii* foram isolados dois compostos, o eupomatenóide-5 e o apiol. O eupomatenóide-5 é uma neolignana cuja potencial atividade anticâncer foi demonstrada *in vitro* (cultura de células tumorais humanas) e *in vivo* (tumor sólido de Ehrlich) em trabalhos anteriores publicados pelo nosso grupo. Dentre as linhagens mais sensíveis, MCF-7 (mama) e 786-0 (rim) foram selecionadas para dar continuidade aos estudos de mecanismo de ação deste composto. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o eupomatenóide-5 possui ação multialvo, uma vez que demonstraram claramente que existe um mecanismo de ação diferente para cada linhagem celular. Sugere-se que o efeito antiproliferativo do eupomatenóide-5 esteja associado com indução de apoptose em linhagem MCF-7 e necrose programada em linhagem 786-0. O apiol, outro composto isolado, é um fenilpropanóide com conhecida ação bloqueadora dos canais de cálcio. Sabe-se que a inibição de canais de cálcio tem relação com a reversão da resistência a múltiplas drogas (MDR) e, por este motivo, o efeito do apiol sobre a glicoproteína-P, uma das principais proteínas moduladoras dessa resistência, foi avaliado; entretanto o apiol não inibiu sua ação. Por outro lado, neste estudo foi possível evidenciar que embora tenha apresentado atividade citostática baixa para as linhagens tumorais, ele potencializou a atividade específica dos quimioterápicos doxorrubicina e vincristina quando associado a estes em linhagens tumorais com e sem fenótipo de resistência, sugerindo um efeito sinérgico. Além disso, o apiol potencializou a atividade antiproliferativa do eupomatenóide-5 e essa associação reduziu a quantidade de células tumorais de Ehrlich em modelo *in vivo*, sem sinais de toxicidade evidentes. Os resultados encorajam o aprofundamento desses estudos para a determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades anticâncer do eupomatenóide-5 e de reversão da MDR do apiol.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of mortality worldwide. The loss of normal cell growth control is the main event in the development of cancer and includes specific steps known as cell proliferation, differentiation and apoptosis. Natural compounds are good source of new anticancer agents, being the investigation into cell death mechanisms involved in this activity a significant endeavor. From the crude dichloromethane extract of *Piper regnellii* leaves two compounds were obtained: eupomatenoid-5 and apiole. Eupomatenoid-5 is a neolignan whose *in vitro* (tumor cell lines culture) and *in vivo* (Ehrlich solid tumor) anticancer activity was previously reported by our group. Among the cancer cell lines most sensible to eupomatenoid-5 treatment, MCF-7 (breast) and 786-0 (kidney) were chosen to continue the cell death mechanism of action studies. The results obtained suggest that eupomatenoid-5 is a multiple-target compound. Our findings support the possibility that eupomatenoid-5 might be acting in both cell death via: apoptosis in MCF-7 cell line and programmed necroptosis in 786-0 cell line. Apiole, the other compound isolated, is a phenylpropanoid and a calcium channel blocker. Recent pharmacological studies have reported the ability of several calcium channel blockers to reverse the multidrug resistance (MDR) and, therefore, the effect of apiole on P-glycoprotein (P-gp), the main protein involved in MDR, was evaluated. Apiole did not inhibit P-gp and, moreover, presented low cytotoxic activity for the most tumor cell lines. Nonetheless, the combined therapy with chemotherapies (doxorubicin and vincristine) was efficient in potentializing their antiproliferative action in tumor cell lines with or without resistance phenotype, suggesting synergic effect. Furthermore, apiole potentiated the antiproliferative activity of eupomatenoid-5 and this association reduced the *in vivo* tumor cell quantity with no side effects. The results encourage further studies to be developed with the aim to determine the mechanisms of action involved in the anticancer activity of eupomatenoid-5 and in the MDR reversion by apiole.

ÍNDICE

7AAD – *7-Aminoactinomycin D*

ABC – *ATP-binding cassette*

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina de soro bovino

CCD – cromatografia camada delgada

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

DCF – *dichlorodihydrofluorescein*

DCFH-DA – *dichlorodihydrofluorescein diacetate*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DRI – *dose reduction index*

EBD – extrato bruto diclorometânico

EBDa – extrato bruto diclorometânico do acesso a

EBDb – extrato bruto diclorometânico do acesso b

EBH – extrato bruto hexânico

EUP-5 – eupomatenóide-5

GI50 – *50% of growth inhibition*

HBSS – tampão Hanks

HSC – tampão

IC50 – *half maximal inhibitory concentration*

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

LC50 – *half maximal lethal concentration*

MDR – *multidrug resistance*

MMP – potencial de membrana mitocondrial

MRP – proteína relacionada à multirresistência

MXR – proteína de resistência à mitoxantrona

NAD - dinucleótido de nicotinamida e adenina

NCI – *National Cancer Institute*

PAF – fator de agregação plaquetária

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

PBS – tampão fosfato salina

PE – *phycoerythrin*

P-gp – glicoproteína P

PI – iodeto de propídio

PS – fosfatidilserina

RF – fator de retenção

RIP – proteína serina/treonina quinase

RMN – ressonância magnética nuclear

RNS – espécies reativas de nitrogênio

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SDS – dodecilsulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

SRB – sulforrodamina B

SR-VAD-FMK – *sulforhodamine derivative of valylalanyl aspartic acid fluoromethyl ketone*

TBE – tampão *Tris-Borate-EDTA*

TCA – ácido tricloroacético

TGI – *total growth inhibition*

TNF – fator de necrose tumoral

TOPO – topoisomerase

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. CÂNCER.....	3
2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR: APOPTOSE X NECROSE	5
3. REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS	8
4. PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER.....	11
5. <i>Piper regnellii</i> E ATIVIDADE ANTICÂNCER.....	16
OBJETIVOS	19
OBJETIVO GERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	25
2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	25
3. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS EUOMATENÓIDE-5 E APIOL.....	27
4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	28
5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY" (HRESIMS)	28
6. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	29
6.1 Triagem farmacológica.....	29
6.2 Avaliação da associação entre quimioterápicos e compostos em linhagens tumoriais humanas.....	34
6.3 Teste de inibição das topoisomerases I e II-alfa	36
6.4 Citometria de fluxo	37
6.4.1 Quantificação de células em fases do ciclo celular.....	38
6.4.2 Quantificação de células em estágios de apoptose.....	40
6.4.3 Detecção de caspases ativas	42
6.4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	44
6.4.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	45
6.4.6 Teste do efluxo de rodamina-123 intracelular por meio da glicoproteína-P (P-gp).....	48
6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
7. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA <i>IN VIVO</i> – Tumor ascítico de Ehrlich	51
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

RESULTADOS.....	55
1. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS EUPOMATENÓIDE-5 E APIOL.....	57
2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO EUPOMATENÓIDE-5.....	62
2.1 Associação entre eup-5 e etoposídeo em NCI/ADR-RES.....	63
2.2 Teste de inibição das enzimas topoisomerase I e II.....	65
2.3 Quantificação de células em fases do ciclo celular.....	67
2.4. Quantificação de células em estágios de apoptose.....	70
2.5 Detecção de caspases ativas.....	74
2.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	77
2.7 Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	79
2.8 Produção de ânions superóxido (O ₂ ⁻).....	81
2.9 Alterações ultramorfológicas das células 786-0 e MCF-7 observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	82
3. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO APIOL.....	84
3.1 Associação entre apiol e doxorrubicina em NCI/ADR-RES.....	87
3.2 Associação entre apiol e vincristina em NCI/ADR-RES.....	90
3.3 Associação entre verapamil e vincristina em NCI/ADR-RES.....	92
3.4 Teste do efluxo de rodamina-123 intracelular por meio da glicoproteína-P (P-gp).....	94
3.5 Associação entre apiol e quimioterápicos em OVCAR-3.....	96
4. ASSOCIAÇÃO ENTRE EUPOMATENÓIDE-5 E APIOL EM MCF-7 E 786-0	97
5. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> - TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH.....	99
DISCUSSÃO.....	101
CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS.....	125
ANEXOS.....	143
ANEXOS I - Espectros de RMN e dados de HRESI-MS do composto apiol....	145
ANEXO II – Protocolo Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	152

INTRODUÇÃO

1. CÂNCER

Câncer é um conceito utilizado para determinar um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Dividindo-se rapidamente, estas células tem a capacidade de metastizar, determinando a formação de tumores malignos (INCA, 2014).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de reparar as agressões externas (WEINBERG, 2008).

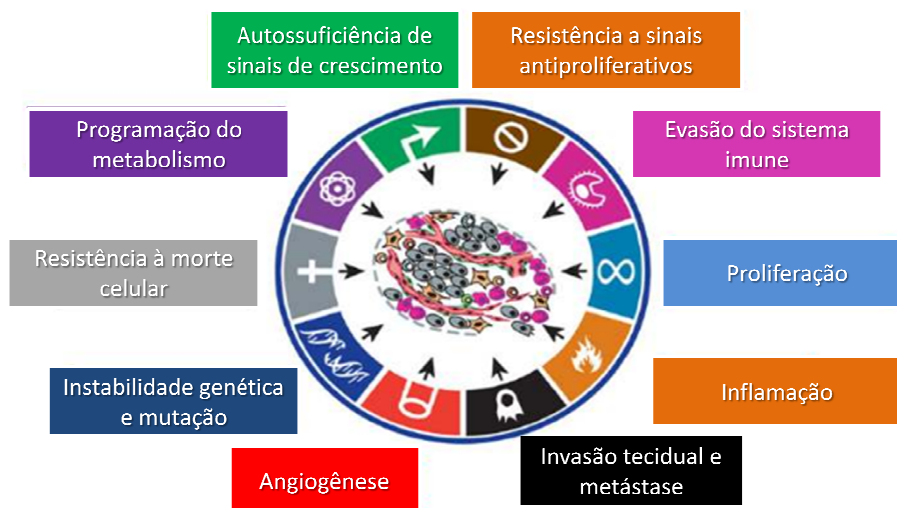
Atualmente, o câncer é a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (NCI, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as mortes por câncer em todo o mundo continuarão aumentando com uma estimativa de 13,1 milhões de mortes e 27 milhões de novos casos em 2030. No Brasil são esperados 580 mil casos novos da doença no ano de 2014. Os cânceres mais incidentes na população brasileira no ano de 2015 serão: pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil), mama (57 mil), cólon-retos (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil) (INCA, 2014).

Em 2000, os pesquisadores Hanahan & Weinberg publicaram um artigo de revisão esclarecendo o comportamento das células tumorais. Nesse trabalho os autores mostraram que as células cancerosas diferem das células normais por continuarem crescendo e se dividindo, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação do câncer. Algumas alterações na fisiologia das células que caracterizam o câncer são: auto-suficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte

celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAAN e WEINBERG, 2000).

Após 11 anos, estas características foram revisadas (Figura 1) e foi constatado que, além das alterações fisiológicas descritas acima, também ocorrem instabilidades genômicas, que geram a diversidade genética e aceleram o processo de transformação celular, inflamação, reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imune (HANAHAAN e WEINBERG, 2011). Além disso, a complexidade do microambiente tumoral não deve ser ignorada, pois garante a manutenção do meio adequado para a implantação, manutenção e desenvolvimento das células tumorais (JUNTILLA e SAUVAGE, 2013). Portanto, o conhecimento aprofundado sobre as características tumorais ajuda no desenvolvimento de novos fármacos e em novos métodos de tratamento para esta doença.

Figura 1. Características essenciais das células tumorais.



Adaptado de HANAHAAN e WEINBERG, 2011.

2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR: APOPTOSE X NECROSE

A morte celular é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas, regulando o desenvolvimento embrionário, a homeostase tecidual, a função imunológica e a supressão tumoral (WALSH, 2014; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007). Os tipos de morte celular mais bem estudados compreendem a autofagia, a apoptose e a necrose (GALLUZZI *et. al.*, 2012).

Como já salientado, as células cancerosas perdem a capacidade de reconhecer os sinais externos e internos que regulam a proliferação celular, evitam os processos de apoptose e diferenciação, são geralmente instáveis, deficientes no reparo de danos ao DNA e na correção de erros de replicação, tendendo a acumular mutações. Tais alterações podem levar à inativação de proteínas supressoras de tumor (p53, Rb) e genes que induzem a apoptose (como o *FAS* e o *BAK*); bem como ativação de oncogenes - Myc, Myb, Src, Ras, Fos e genes que inibem a apoptose, como o *BCL-2* (ALBERTS *et. al.*, 2008; WEINBERG, 2008).

O mecanismo anticâncer mais estudado nos últimos anos tem sido o de indução seletiva de apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI, MAHIPAL e REDDANNA, 2005). A apoptose e a proliferação celular possuem uma participação importante na tumorigênese, determinando o crescimento tumoral e, conseqüentemente, sua agressividade. Sendo assim, são consideradas mecanismos celulares bastante regulados, através dos quais há o controle entre a produção de novas células e a capacidade individual das mesmas em se autodestruírem (TERZIAN *et. al.*, 2007).

A apoptose é caracterizada pela externalização de fosfatidilserina da membrana plasmática, além de ser um processo de morte celular que requer a ativação e a execução de uma série de moléculas reguladoras (HENRY, HOLLVILLE e MARTIN, 2013). As mitocôndrias são o principal local de origem para os sinais de iniciação de

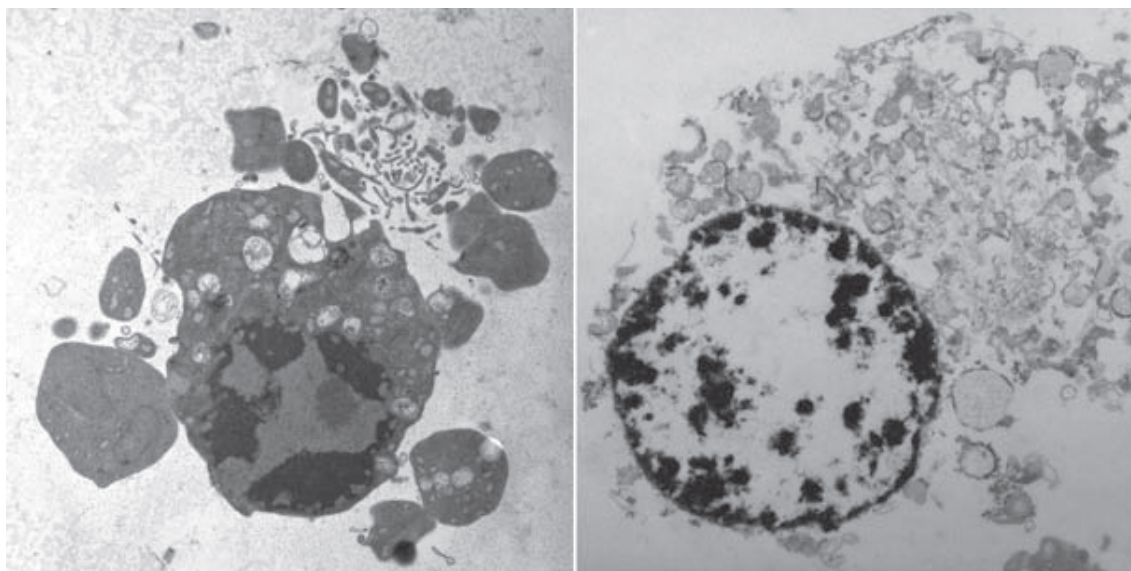
apoptose, embora este tipo de morte celular possa ocorrer por uma via extramitocondrial. Alguns dos sinais apoptóticos incluem alteração no sistema de transporte de elétrons, perda do potencial de membrana mitocondrial (MMP), falha na homeostase do fluxo de Ca^{+2} , além de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de ativadores de caspases. O estágio inicial da apoptose é marcado por uma alteração no MMP, que precede a fragmentação do DNA. A produção de ROS endógeno como subproduto da respiração mitocondrial é rigidamente controlada pelo MMP. A interrupção na homeostase de ROS desempenha um papel crítico na regulação dos eventos apoptóticos (KIM *et. al.*, 2011a).

A atividade proteolítica exerce um importante papel na apoptose e a ativação de proteases aspartato-específicas, conhecidas como caspases, parece ser essencial para a execução do processo apoptótico (FERRARO-PEYRET *et. al.*, 2002). Essas enzimas são sintetizadas como precursores inativos e se encontram solúveis no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células. Seis das 14 caspases humanas conhecidas participam do processo de apoptose (3, 6, 7, 8, 9 e 10) (NICHOLSON e THORNBERRY, 1997). As caspases sinalizam a apoptose ao clivar substratos que contenham resíduos de aspartato, causando a condensação, fragmentação nuclear e a externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para que as células sejam fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007). A indução de morte por apoptose através de um sinal externo é uma das tentativas da terapia contra o câncer (BROKER, KRUYT e GIACCONE, 2005; FADEEL e ORRENIUS, 2005).

A morte celular por apoptose difere da necrose com base em diversos aspectos bioquímicos e morfológicos (Figura 2). A apoptose é morfológicamente caracterizada pela integridade das organelas celulares (incluindo a mitocôndria), condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear e formação de corpos apoptóticos. Por outro lado, a

necrose está relacionada a intensas agressões nas células associadas com a inflamação, processo que resulta na queda da produção de ATP e ou lesão da membrana celular. Este processo é morfológicamente caracterizado por tumefação, rompimento celular e das organelas, particularmente das mitocôndrias, aparecimento de vacúolos, acidofilia citoplasmática e em suas etapas finais a necrose é responsável pela degradação total das células (VANDENABEELE *et. al.*, 2010).

Figura 2. Aspectos morfológicos da apoptose x necrose.



Microscopia eletrônica de transmissão de células em processo de morte celular por apoptose (com formação de corpos apoptóticos) e necrose (com extravasamento de conteúdo citoplasmático), respectivamente. VANDENABEELE *et. al.*, 2010.

Pesquisas realizadas durante a última década ilustram a contribuição das formas alternativas de morte celular no desenvolvimento e homeostase. Por um longo período, a necrose era considerada uma forma incontrolada de morte celular, mas evidências atuais sugerem que este tipo de morte celular é executado por mecanismos mais complexos e regulados (BERGHE *et. al.*, 2010).

A natureza desregulada da necrose foi questionada em 1988, quando foi descoberto que diversos tipos celulares morriam em resposta ao mesmo sinal ativador (fator de necrose tumoral – TNF), ao passo que as células manifestavam ou os aspectos morfológicos característicos da apoptose ou uma morfologia ‘*balloon-like*’, sem desintegração nuclear. Desde então, foi estabelecido o conceito de necrose programada, culminando na introdução, em 2005, do termo “necroptose” para descrever uma morte celular por necrose controlada, diferenciando-a da necrose acidental (VANDENABEELE *et. al.*, 2010). O metabolismo energético mitocondrial foi relacionado aos processos necróticos no início da década de 90, quando foi demonstrado que a produção de ROS pelo complexo respiratório mitocondrial I era crucial para a resposta necrótica (SCHULZE-OSTHOFF *et. al.*, 1992).

Recentemente, o termo necroptose tem sido usado para designar um tipo específico de necrose programada que é dependente da atividade da quinase serina/treonina (RIP-1). Além de estar relacionada a essa enzima, a necroptose está associada a uma rápida disfunção mitocondrial que leva à excessiva produção de ROS. Assim, um colapso súbito da função mitocondrial (que provoca uma queda de ATP intracelular), sustentado talvez pela ativação excessiva de polimerases poli-ADP-ribose (PARP) que promovem depleção de NAD⁺, pode explicar a crise bioenergética que constitui o passo final da necrose programada (GALLUZZI e KROEMER, 2008).

3. REVERSÃO DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

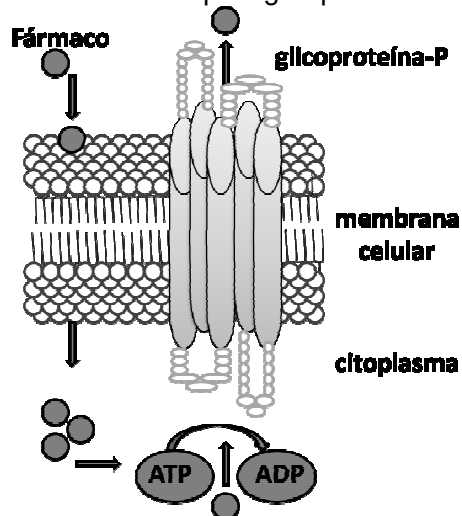
Um dos maiores obstáculos do tratamento antitumoral é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos, não havendo resposta ao tratamento em cerca de 90% dos casos de câncer metastático (LONGLEY e JOHNSTON, 2005). Até o momento são reconhecidos dois tipos de resistência: a

intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do tratamento e a adquirida, quando surge no segundo ciclo (pós-terapia) (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010).

A resistência a múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance* - MDR) é um caso de resistência adquirida, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto àquele que foi utilizado inicialmente, quanto a outros empregados como alternativa. Uma das características mais intrigantes da MDR é que os quimioterápicos envolvidos não têm analogia estrutural nem farmacológica entre si como, por exemplo, a vimblastina, que é um alcalóide bisindólico e a doxorubicina, que é uma antraciclina (SALEH *et. al.*, 2012; DEWICK, 2009).

Os principais fatores envolvidos no mecanismo de resistência celular são: 1) a diminuição da absorção de drogas solúveis em água e que necessitam de transportadores para adentrar as células; 2) alterações nas células que afetam a capacidade destas drogas em matá-las, incluindo alterações no ciclo celular, aumento no reparo do DNA e incapacidade de sofrer apoptose e 3) aumento do efluxo-dependente de energia de drogas hidrofóbicas que podem facilmente adentrar as células por difusão através da membrana plasmática. Este último fator é mediado por uma família de transportadores-dependentes de energia conhecida como *ATP-binding cassette* (ABC) (SZAKÁCS *et.al.*, 2006).

Transportadores ABC são uma família de proteínas que translocam solutos pela membrana celular. Muitas células tumorais em cultura superexpressam tais transportadores sob pressão seletiva. Dentre estas proteínas, destacam-se a glicoproteína-P (P-gp), a proteína relacionada à multirresistência (MRP) e a proteína da resistência a mitoxantrona (MXR). Essas proteínas funcionam como bombas de efluxo dependentes de energia (Figura 3), capazes de translocar para o exterior da célula uma ampla variedade de drogas quimioterápicos reduzindo sua concentração intracelular para níveis sub-letais (SALEH *et. al.*, 2012; HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010; SHUKLA *et. al.*, 2006).

Figura 3. Mecanismo de efluxo de fármacos pela glicoproteína-P.

Um fármaco, representado nesta figura pela esfera, adentra a membrana celular, permanecendo no citoplasma. Este fármaco ficaria retido dentro da célula se não fosse a P-gp atuar como uma bomba que expulsa o conteúdo intracelular para fora da célula, por meio de um mecanismo dependente de energia (ATP). Adaptado de CATTANEO, 2009.

A resistência a quimioterápicos promovida pela P-gp é a forma de resistência mais estudada *in vitro*, *in vivo* e na clínica e, conseqüentemente, um grande número de fármacos e compostos recentemente sintetizados são investigados por suas habilidades em inibi-la (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010). Esta proteína pertence à subfamília ABCB e se destaca entre os transportadores ABC por conferir forte resistência à mais ampla variedade de compostos incluindo alcalóides vinca, antraciclina, epipodofilotoxinas e taxanos. A P-gp encontra-se normalmente expressa no epitélio de fígado, rim e trato gastrointestinal, atuando como barreira farmacológica; além de estar presente em células-tronco e do sistema imune (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010; SHAROM, 1997).

Os transportadores expõem uma grande quantidade de droga do citoplasma ou da membrana celular, protegendo as células tumorais. A super-expressão destes transportadores é um dos maiores obstáculos na quimioterapia clínica. Muito esforço tem sido feito na tentativa de encontrar compostos reversores da MDR que bloqueiam a atividade das bombas de efluxo, permitindo o acúmulo intracelular da droga

quimioterápica (SALEH *et. al.*, 2012; HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010; SHUKLA, 2006). Dentre eles, um número elevado de produtos naturais tem sido relatado como bons inibidores da P-gp. Entretanto, as células tumorais resistentes a múltiplas drogas podem expressar simultaneamente diferentes transportadores ABC (LI *et. al.*, 2011).

As principais pesquisas estão concentradas na exploração direta do segundo uso de fármacos, ou seja, ativos farmacêuticos que são utilizados em função de uma atividade farmacológica principal, mas que têm como propriedade secundária a capacidade de reverter o fenômeno MDR. Para exemplificar, pode-se citar o verapamil, utilizado na clínica como antiarrítmico por ser um potente bloqueador de canais de cálcio. Seu efeito sobre o mecanismo de reversão da MDR é secundário (HUANG *et. al.*, 2011, HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010).

Para uma pesquisa aprofundada sobre este mecanismo, várias áreas de estudo precisam ser exploradas, destacando-se o conhecimento do alvo, no caso a bomba de efluxo; seu(s) sítio(s) ligante(s); o mecanismo de efluxo e, também, as propriedades físico-químicas e requisitos estruturais importantes para a ação moduladora.

4. PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER

A descoberta de medicamentos provenientes de plantas medicinais continua exercendo um papel importante no tratamento do câncer (NEWMAN e CRAGG, 2012). A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos remonta os tempos antigos na história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química, cerca de 60% dos quimioterápicos são produtos naturais ou derivados desses (CRAGG e NEWMAN, 2009).

A maioria das substâncias ativas são compostos isolados de produtos naturais, incluindo muitos alcalóides como morfina, codeína (analgésicos); papaverina (inibidor de

fosfodiesterase); efedrina, cafeína (estimulantes); ajmalina, quinidina (antiarrítmicos); quinina (antimalárico); reserpina (antihipertensivo); capsaicina (dores reumáticas); colchicina (tratamento de gota); yohimbina (afrodisíaco); entre outros (WINK *et. al.*, 2005).

As plantas aparecem como um excelente recurso para o desenvolvimento de potenciais fármacos, principalmente contra o câncer (GANESAN, 2013). De 1961 a 1999, nove compostos foram aprovados como fármacos anticâncer nos EUA, sendo eles: vinblastina, vincristina, vinorelbina, etoposida, teniposida, paclitaxel, docetaxel, topotecan e irinotecan (LEE, 1999). Entre 2006 e 2010, um número significativo de agentes antitumorais, antibacterianos e antifúngicos também foi aprovado como fármacos. Em 2010, das vinte “moléculas-pequenas” aprovadas, metade era oriunda de produtos naturais ou diretamente derivada destes, sendo a maioria delas relacionadas à atividade antitumoral (NEWMAN e CRAGG, 2012).

Catharantus roseus

Os alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina, vindesina – Figura 4), isolados da planta *Catharantus roseus* (Apocynaceae) e seu composto semi-sintético vinorelbina são utilizados no tratamento de leucemias, linfomas, câncer testicular avançado, mama e pulmão. Estes compostos são capazes de inibir o fuso mitótico, induzindo uma parada na metáfase. Nesta fase da mitose esses agentes são capazes de se unir à tubulina resultando na inibição de sua polimerização para a formação dos microtúbulos, interrompendo, assim, a divisão celular (FERNANDÉZ-PÉREZ *et. al.*, 2013; BALUNAS e KINGHORN, 2005).

Taxus brevifolia

Outro composto, denominado paclitaxel (Taxol®), é um triterpeno poliidroxilado que foi isolado da planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae) pela primeira vez em 1971. Este

composto tornou-se um medicamento na década de 90, após descoberta de sua ação através da inibição do fuso mitótico. O paclitaxel (Figura 4) interfere na função normal de crescimento do microtúbulo, impedindo a divisão descontrolada da célula. Enquanto drogas como a colchicina causam a despolimerização dos microtúbulos *in vivo*, o paclitaxel combate suas funções se ligando à proteína tubulina dos microtúbulos, impedindo sua despolimerização. Estudos adicionais indicaram que o paclitaxel induz à morte programada das células (apoptose) do câncer através da modulação da proteína antiapoptótica bcl-2, o que a impede de exercer sua função (WAI-LENG, JENG-YUAN e LIE-FEN, 2012; SOUZA, 2004; WANG, WANG e SOONG, 2000).

Dois análogos desta molécula foram semi-sintetizados, o docetaxel (Figura 4) e o isotaxel. Enquanto o paclitaxel vem sendo utilizado no tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão e sarcoma de Kaposi, o doxetaxel é utilizado especificamente em casos de câncer de mama e pulmão, sendo muito mais solúvel e eficaz que o anterior (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Podophyllum peltatum

O primeiro composto ativo de *Podophyllum peltatum* (Podophylaceae), a podofilotoxina, foi isolado no ano de 1880, porém sua estrutura só foi identificada no ano de 1950 (CRAGG e NEWMAN, 2005). A podofilotoxina é uma lignana e seu maior efeito citotóxico é a inibição da divisão celular na fase metáfase da mitose. Seus derivados semi-sintéticos etoposídeo e teniposídeo (Figura 4) foram desenvolvidos em 1970 na tentativa de obtenção de derivados com menor toxicidade gastrointestinal, permanecendo até hoje como importantes quimioterápicos no tratamento do câncer (CHEN *et. al.*, 2013; NITISS, 2009).

Esses agentes antitumorais agem bloqueando as células nas fases S e G2 do ciclo celular e inibindo a ação da enzima topoisomerase II, responsável pela separação da

dupla fita de DNA no processo de divisão celular. A inibição desta enzima ocorre através da ligação do composto antitumoral ao complexo DNA-topoisomerase II causando a quebra da dupla-fita de DNA e a subsequente morte celular (CHEN *et. al.*, 2013).

Camptotheca acuminata

Da casca da árvore *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) foi extraído o alcalóide camptotecina (Figura 4) que também apresenta propriedade antitumoral, principalmente nos casos de tumores sólidos. O mecanismo de ação deste composto se dá através da inibição da enzima topoisomerase I, responsável pela quebra de uma das fitas de DNA, sendo importante nos processos de replicação e empacotamento do DNA. A inibição desta enzima ocorre porque a camptotecina é capaz de se ligar ao complexo formado pelo DNA e a enzima topoisomerase I (RAHIER, THOMAS e HECHT, 2005).

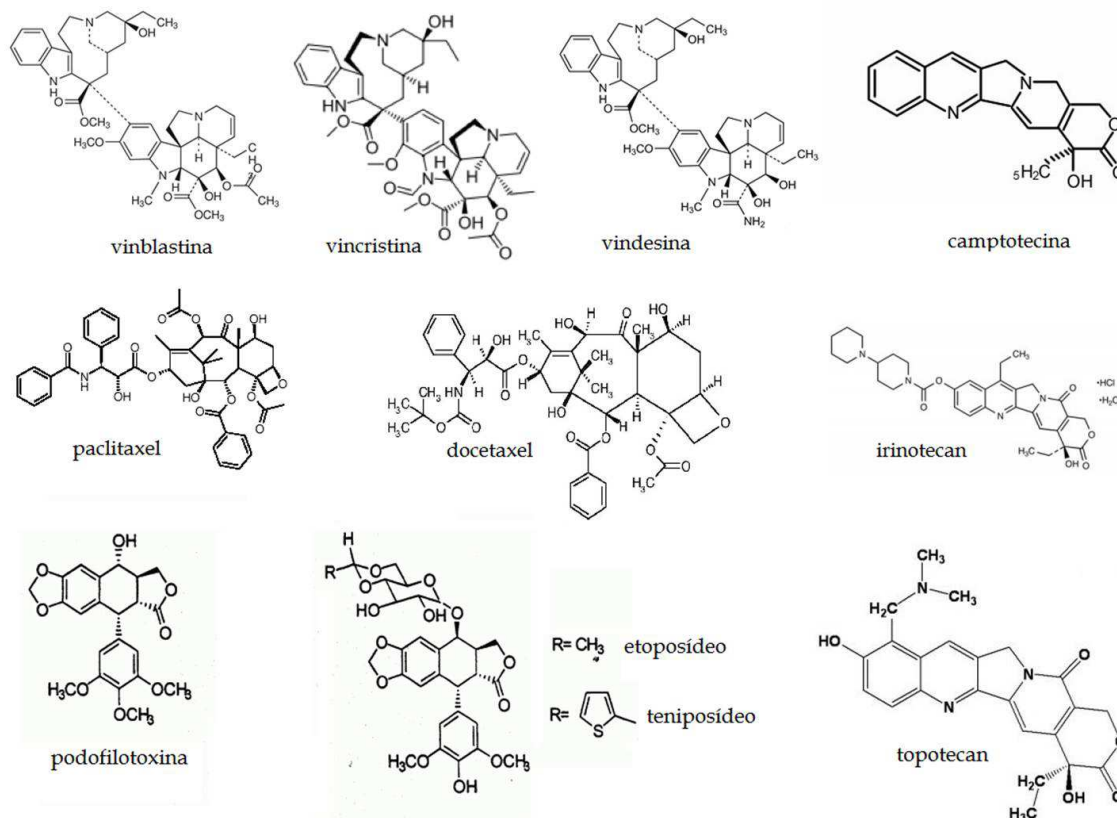
Originalmente este composto apresentou uma mielossupressão inaceitável (BALUNAS e KINGHORN, 2005); em vista disso, outros análogos sintéticos menos tóxicos do que a camptotecina precisaram ser avaliados, sendo então aprovados para uso clínico o topotecan (Hycamptin®) e o irinotecan (Camptosar®), Figura 4 (ORMROD e SPENCER, 1999).

Um dos motivos que faz dos produtos naturais fontes ricas de compostos com potencial terapêutico é que grande parte deles são metabólitos secundários produzidos por organismos para defesa contra predação e também para comunicação, sendo muitas vezes tóxicos e, portanto, com potenciais efeitos antiproliferativos (CRAGG e NEWMAN, 2009).

Diversos exemplos de compostos das classes flavonóides, lignanas e alcalóides são descritos como agentes quimioterapêuticos potenciais (RAVISHANKAR *et. al.*, 2013; URRÁ *et. al.*, 2013; ZHAO, HUI e ZHU, 2013). Estes compostos têm se mostrado

potentes em inibir o crescimento de determinadas células tumorais através de vários mecanismos. Muitos apresentam efeito ainda mais promissor contra o crescimento de células tumorais quando combinados com outros agentes quimioterapêuticos. Dentre os mecanismos envolvidos nestas atividades estão a modulação do ciclo celular, efeito antiangiogênico e indução de apoptose (MEIYANTO, HERMAWAN e ANINDYAJAT, 2012). Tendo-se em vista a elevada incidência de câncer no mundo, estudos visando à busca de novas drogas anticâncer devem se intensificar, abordando a química dos compostos, os mecanismos de ação e a seletividade.

Figura 4 – Estruturas dos principais compostos isolados ou derivados semi-sintéticos de plantas com atividade anticâncer.



Fonte: Google (acesso 21/08/2014)

5. *Piper regnellii* E ATIVIDADE ANTICÂNCER

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, apresentando cerca de 700 espécies. As espécies deste gênero, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, são usadas medicinalmente para diversos fins e apresentam importância econômica, por constituírem o importante grupo das pimentas e serem utilizadas mundialmente como “temperos picantes” (PARMAR *et al.*, 1997). Além disso, são fontes de óleos essenciais bioativos e de grande interesse para as indústrias farmacêuticas (SILVA e MACHADO, 1999).

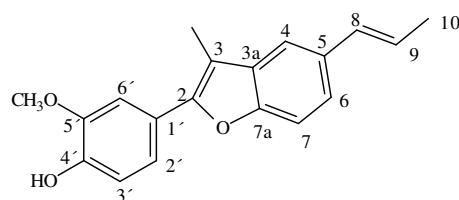
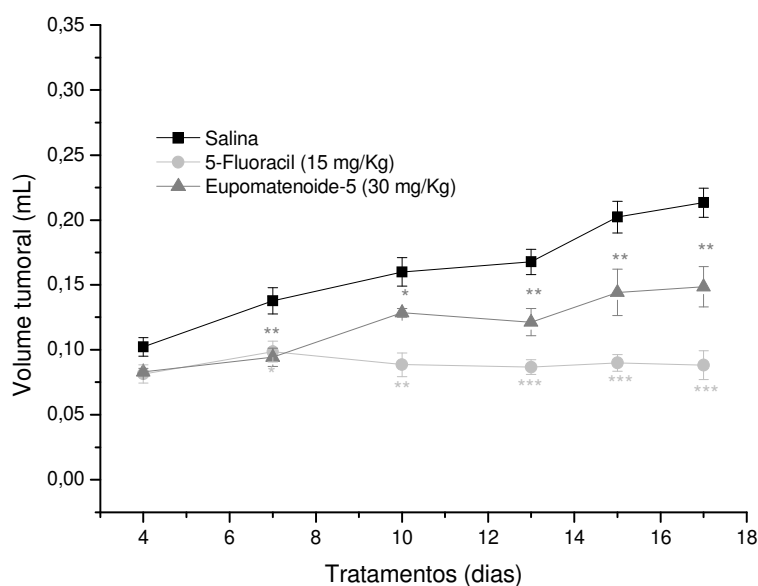
Substâncias isoladas de diferentes espécies de *Piper* têm aumentado o interesse por este gênero, devido às atividades biológicas apresentadas (PARMAR *et al.*, 1997). Diversas substâncias isoladas de espécies de *Piper* (inclusive outras variações da espécie *P. regnellii*) apresentaram atividades biológicas como anti-PAF (fator de ativação plaquetária), antifúngica, antimicrobiana, moluscicida, anti-inflamatória, antiparasitária e inseticida (LEAL *et al.*, 2013; LEMOS *et al.*, 2013; PELIZZARO-ROCHA *et al.*, 2011; ATJANASUPPAT *et al.*, 2009; CÉLINE *et al.*, 2009; LAGO *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2009; PESSINI *et al.*, 2005). Além disso, diversas substâncias têm sido apresentadas como agentes citotóxicos em várias linhagens tumorais evidenciando o potencial anticâncer deste gênero (OUYANG *et al.*, 2013; MAJDALAWIE e CARR, 2010; BEZERRA *et al.*, 2008; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007; SELVENDIRAN, SINGH e SAKTHISEKARAN, 2006; BALACHANDRAN e GOVINDARAJAN, 2005; TSAI *et al.*, 2005; LAMPE, 2003).

Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. *regnellii* é uma espécie herbácea conhecida popularmente como caapeba e pariparoba e está amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais (BENEVIDES, SARTORELLI e KATO, 1999). As folhas e raízes são utilizadas na forma de extratos, infusões ou emplastros para o tratamento de feridas,

redução de inchaços, irritações na pele e infecções (SCHIMIDT *et al.*, 2009; HOLETZ *et al.*, 2002; CORRÊA, 1984). Dados da literatura apontam a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. regnellii* (Miq) C. DC. sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, sobre os fungos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e dermatófitos do gênero *Trichophyton* e *Microsporum* (FELIPE *et al.*, 2008; KOROISHI *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2007; HOLETZ *et al.*, 2002; CONSTANTIN *et al.*, 2001).

Ensaio *in vitro* realizados durante a execução do projeto de Mestrado (LONGATO, 2010) revelaram que o extrato bruto diclorometânico (EBD) de *P. regnellii* foi capaz de inibir o crescimento e provocar morte celular em oito linhagens tumorais humanas. O EBD foi submetido a processo de fracionamento e, através de biomonitoramento da fração enriquecida, foi possível verificar a presença de quatro neolignanas, sendo identificadas 3 delas (eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e conocarpano).

Através de precipitação da fração enriquecida, seguida dos processos de cristalização e recristalização, o composto eupomatenóide-5 foi isolado e sua estrutura (Figura 5) foi confirmada através de dados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM) e espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), aliados aos publicados em literatura (PESSINI *et al.*, 2005). Os resultados *in vitro* indicaram que esta neolignana é um dos compostos responsáveis pela atividade antiproliferativa do extrato (LONGATO, 2010). Os efeitos observados *in vitro* foram comprovados em modelo *in vivo* de tumor sólido de Ehrlich, sendo que o eupomatenóide-5 (30 mg/Kg) reduziu o volume tumoral em 30.4% (Figura 6).

Figura 5. Estrutura do eupomatenóide-5.**Figura 6.** Variação do volume tumoral (mL) induzido por células tumorais de Ehrlich em coxim plantar de camundongos, ao longo do tratamento.

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (em relação ao grupo salina).

Teste de Duncan (ANOVA). Longato *et. al.* 2011

Os resultados obtidos demonstraram a potencial atividade anticâncer do composto isolado e estimularam a busca por outros compostos que pudessem apresentar uma resposta anticâncer promissora ou potencializar a ação do eupomatenóide-5, bem como ensaios para determinação do mecanismo de ação dos compostos provenientes do EBD de *P. regnellii*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- ❖ Avaliar a atividade anticâncer dos compostos isolados do extrato bruto diclorometânico das folhas de *Piper regnellii*, em modelos experimentais de câncer e investigar os mecanismos de ação destes compostos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

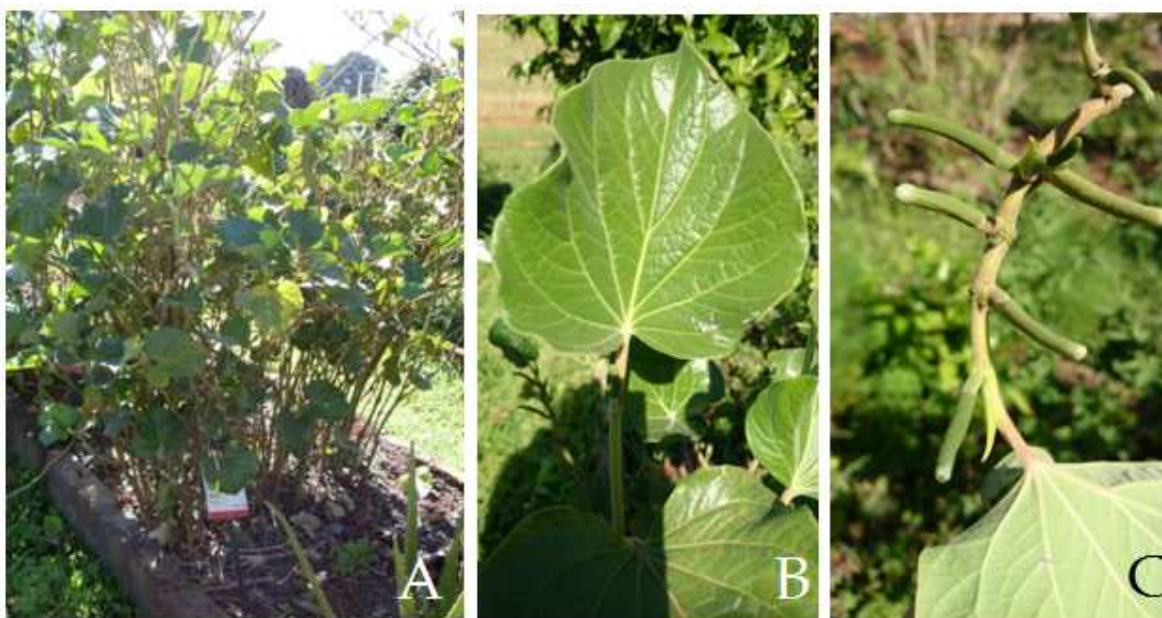
- ❖ Isolamento de compostos ativos oriundos do extrato bruto diclorometânico das folhas da espécie vegetal *Piper regnellii* através de fracionamento biomonitorado;
- ❖ Avaliar os efeitos da associação entre quimioterápicos e os compostos isolados *in vitro*, em linhagens tumorais humanas;
- ❖ Avaliar o efeito do eupomatenóide-5 na atividade das topoisomerasas I e II;
- ❖ Investigar os mecanismos de morte celular *in vitro* desencadeados pelo eupomatenóide-5;
- ❖ Avaliar a participação do apiol no mecanismo de reversão da resistência a múltiplas drogas;
- ❖ Avaliar a atividade anticâncer dos compostos *in vivo* em tumor ascítico de Ehrlich (murino).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Figura 7) foram coletadas no mês de junho de dois espécimes (denominados acessos A e B) no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. A coleta foi supervisionada pela Dra. Glynn Mara Figueira e as folhas identificadas pela Dra. Elsie Franklin Guimarães. Sua exsicata está depositada no herbário do CPQBA (nº 221).

Figura 7. Espécime de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* no campo experimental do CPQBA.



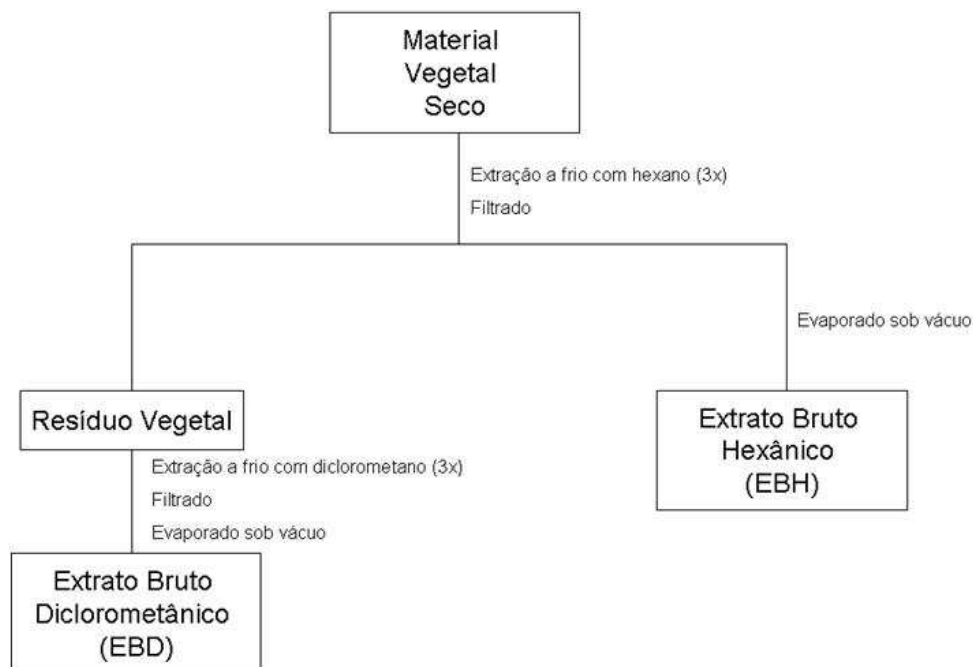
A : arbusto B : folhas C : inflorescência do tipo espiga.

2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

A obtenção dos extratos e as etapas de fracionamento foram realizadas na Divisão de Fitoquímica do CPQBA, sob orientação da Dra. Mary Ann Foglio.

Inicialmente foram coletados 3000 g de folhas frescas de *P. regnellii* de cada espécime. Os procedimentos a seguir foram realizados separadamente para os diferentes acessos. As folhas foram secas em estufa (Stephen, modelo UM40) a 45°C, moídas em triturador de facas (Metalúrgica Roma, modelo RM-20) e maceradas primeiramente com hexano (Merck®, Darnstadt, Alemanha) na proporção 1:5 (planta:solvente) durante 2h. Os resíduos vegetais deste processo foram retomados em diclorometano (Merck®, Darnstadt, Alemanha) na mesma proporção durante 2h. Esse procedimento foi repetido 3 vezes sendo que, ao final de 6h, os volumes resultantes foram reunidos e filtrados. Os solventes orgânicos foram eliminados sob vácuo a 37°C, fornecendo então os extratos brutos hexânico (EBH) e diclorometânico (EBD), conforme Figura 8.

Figura 8. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos brutos (EBH e EBD) das folhas de *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *regnellii*.



3. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS EUPOMATENÓIDE-5 E APIOL

O EBD do acesso A (EBDa, 15 g) foi fracionado por meio de coluna filtrante. O gradiente de solventes utilizado para eluição da coluna envolveu hexano, diclorometano e metanol em proporções crescentes de polaridade, originando 52 frações (50 mL). Essas frações foram agrupadas de acordo com o perfil da cromatografia em camada delgada (CCD) e visualizadas com reagente anisaldeído (50 mL ácido acético, 0,5 mL ácido sulfúrico e 0,5 mL anisaldeído) seguido de aquecimento a 110°C.

As frações que continham a lignana eupomatenóide-5 e apresentaram fatores de retenção (R_f – *retention factor*) próximos foram agrupadas e submetidas a processos de cristalização e recristalização, com o objetivo de isolar o composto eupomatenóide-5. Este composto foi enviado para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM). O cromatograma adquirido foi comparado com aqueles previamente obtidos (LONGATO, 2010) para verificação do teor relativo do composto isolado.

O EBD do acesso B (EBDb, 15 g) foi submetido a fracionamento por coluna filtrante. O gradiente de solventes utilizado para eluição da coluna envolveu hexano, diclorometano e metanol em proporções crescentes de polaridade, originando 48 frações (50 mL). As frações foram agrupadas de acordo com o perfil da cromatografia em camada delgada (CCD) e visualizadas com reagente anisaldeído (50 mL ácido acético, 0,5 mL ácido sulfúrico e 0,5 mL anisaldeído) seguido de aquecimento a 110°C.

As frações que apresentaram R_f próximos foram agrupadas, originando 7 novas sub-frações (FRA a FRG), sendo que a FRD continha o fenilpropanol apiol. Esta fração foi submetida a processo de refractionamento por coluna clássica isocrática, tendo como fase móvel a mistura de hexano e acetato de etila (90:10). Deste processo foram obtidas 9 frações.

As frações 5-8 foram enviadas para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM), uma vez que os dados de CCD indicavam ser um único composto. Este composto, denominado inicialmente de composto-2, foi testado *in vitro* para avaliação da atividade antiproliferativa, em cultura de células tumorais humanas e a confirmação de sua estrutura química foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN).

4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados no IQ-UNICAMP e obtidos em espectrômetro Brüker, modelo Avance DRX-500, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e a 125 MHz na frequência do carbono-13. O sinal residual do solvente ou do TMS foi usado como referência interna. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Isotec - INC). Os resultados foram comparados com dados espectrais descritos para compostos isolados de *Piper regnellii* (BENEVIDES, SATORELLI e KATO 1999).

5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY" (HRESIMS)

A amostra foi injetada por inserção direta no espectrômetro de massas com auxílio de uma bomba seringa (Havard Aparatus) com fluxo de $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 min. Os espectros ESI-MS foram extraídos no modo positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester - Reino Unido) de configuração ESI-QqToF. As condições de operação do equipamento foram: 2.5 kV de voltagem do capilar, 100°C de temperatura da fonte, temperatura de dessolvatação de 100°C , e voltagem do cone de 20 V. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa

de m/z 50 a 1000. Este estudo foi realizado no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do IQ-UNICAMP.

6. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VITRO*

6.1 Triagem farmacológica

Princípio do teste

O objetivo do *screening in vitro* é a busca por substâncias que sejam capazes de inibir a proliferação de células tumorais, direcionando os compostos ativos para estudos em modelos experimentais de câncer em animais de laboratório (*in vivo*).

Procedimento experimental

Os compostos isolados foram avaliados quanto à potencial atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB Sigma®) para avaliação do crescimento celular, desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos (SKEHAN *et al.*, 1990).

Foram empregadas até 10 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1). Estas linhagens foram cedidas pelo NCI e mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm² (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc® - Figura 9), da suspensão celular com densidade de inoculação variando entre 4 a 7x10⁴ céls/mL, de acordo com linhagem celular (Tabela 2) em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina (LGC Biotecnologia). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100

µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas: 0.25, 2.5, 25 e 250 µg/mL.

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

Sigla	Tecido	Características
U251	Glioblastoma	Astrocitoma. Expressa GFAP e vimentina ¹
UACC-62	Melanoma	Originária de melanócitos ¹
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Produce proteínas insulina- <i>like</i> (liga fatores de crescimento) ¹ e superexpressa gene P2P-R ² . TNF-α inibe seu crescimento ¹
NCI-ADR/RES	Adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas	O receptor de estrógeno está ausente nesta linhagem ¹ . Expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) ³ traduzindo para glicoproteína-P ⁴ . Proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas ⁵
786-O	Adenocarcinoma de rim	Produce peptídeo semelhante à ação do hormônio paratireoidiano ⁶ . Mutações no gene HVL ⁷ e da prolina oxidase ⁸ propiciam a formação do tumor
NCI-H460	Adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células	Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático ⁹ . Apresenta características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas ¹⁰ e é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico ³
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5-α redutase, cromossomo Y anormal detectado ¹ . É uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos ¹¹
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais representados. É adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal ¹ . Apresenta alta produção da enzima 24-OHase e baixa de 1-αOHase ¹²
HT-29	Adenocarcinoma colorretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2 ¹³
K-562*	Leucemia Mielóide Crônica	Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica ¹ . Possui o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose ¹⁴

*Célula em suspensão. ¹ATCC, 2014; ²Gao e Scott, 2003; ³Yang *et al.*, 2003; ⁴Xu *et al.*, 2002; ⁵Weinstein-Oppenheimer *et al.*, 2002; ⁶Thiede *et al.*, 1988; ⁷Iliopoulos *et al.*, 1995; ⁸Maxwell e Rivera, 2003; ⁹Takahashi *et al.*, 2002; ¹⁰Schüller *et al.*, 1987; ¹¹Van Bokhoven *et al.*, 2003; ¹²Miettinen *et al.*, 2004; ¹³His, Back e Eling, 2000; ¹⁴Cen *et al.*, 2002.

Figura 9. Placa de 96 compartimentos utilizada no ensaio da SRB.

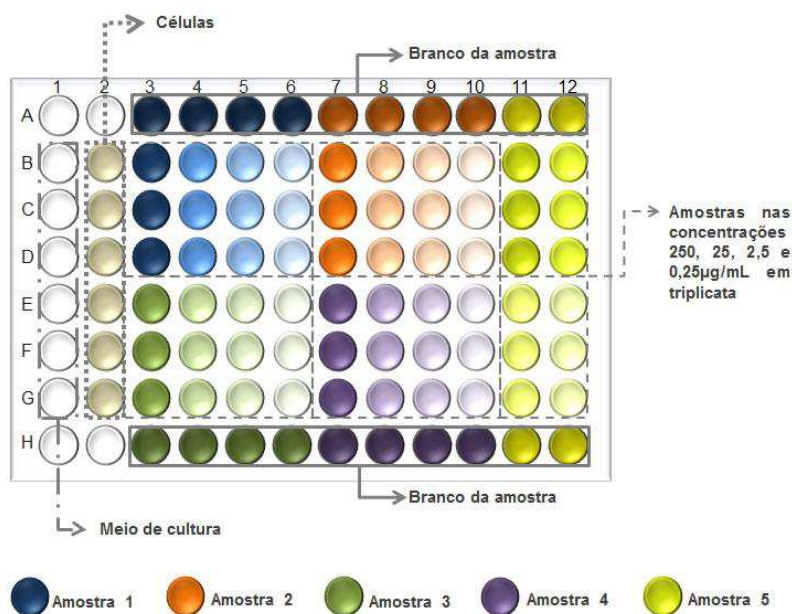


Tabela 2. Densidade de inoculação das linhagens celulares tumorais .

Linhagem	Densidade de Inoculação (x10 ⁴ células/mL)*
U251	4.0
UACC-62	4.0
MCF-7	6.0
NCI-ADR/ RES	5.0
786-O	4.5
NCI-H460	4.0
PC-3	5.0
OVCAR-3	7.0
HT-29	4.0
K-562	5.0

* Placas de 96 compartimentos. Estas densidades foram previamente estabelecidas em nosso laboratório por meio de ensaios de curva de crescimento.

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg foi dissolvida em 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO Synth[®]). Em seguida, 50 μ L dessa solução-mãe foram dispersos em 950 μ L de meio RPMI/5% SFB, para preparação da solução de trabalho, que foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para a preparação das concentrações finais de 0,25, 2,5, 25 e 250 μ g/mL. A concentração final de DMSO (0,1%) não interfere no crescimento celular (SACOMAN *et. al.*, 2008).

Como controles positivos foram utilizados os quimioterápicos Doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina[®] - Europharma) e Vincristina (Tecnocris Sulfato de Vincristina[®] - Zodiac) nas concentrações 0,025, 0,25, 2,5 e 25 μ g/mL e Etoposídeo (Posidon[®] - Pierre Fabre) nas concentrações 0,25, 2,5, 25 e 250 μ g/mL. Uma placa controle denominada T0, que continha todas as linhagens tumorais a serem avaliadas nas densidades de inoculação previamente descritas, foi fixada no momento da adição das amostras, conforme descrição abaixo, a fim de determinar qual a quantidade de células no início do experimento.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 μ L/compartimento de TCA (ácido tricloroacético Sigma[®]) a 50% e incubadas por 1h a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com 50 μ L/compartimento de SRB 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1% e mantidas por 20 min. à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma[®]) 10mM e pH 10,5. A SRB é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade

antiproliferativa da amostra em teste (MONKS *et. al.*, 1991; RUBISTEIN *et. al.*, 1990; SKEHAN *et. al.*, 1990).

Análise dos dados

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 540 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices[®], modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando-se o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se $TA > T1$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T1 \geq TA > T0$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0) / (T1 - T0)]$.

Se $TA < T0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(TA - T0) / (T0)]$.

Sendo TA a média da absorbância da célula tratada, T1 o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, obteve-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do *software* Origin[®], foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados o TGI (*total growth inhibition*): a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (utilizado para amostras citocidas) e o GI50 (*50% growth inhibition*): concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (utilizado para amostras citostáticas). Esses parâmetros são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas.

6.2 Avaliação da associação entre quimioterápicos e compostos em linhagens tumorais humanas

Princípio do teste

O uso de medicamentos combinados com a finalidade de contornar a resistência tumoral é um princípio bem estabelecido da terapia contra o câncer (DANCEY e CHEN, 2006). Considerando os resultados positivos que os estudos envolvendo associações entre medicamentos na terapia contra câncer têm demonstrado, urgiu-se a necessidade de um estudo de associação entre os compostos isolados e quimioterápicos utilizados na clínica.

Procedimento experimental

A atividade antiproliferativa foi realizada por meio do ensaio da SRB, previamente descrito, para avaliação do crescimento celular.

Doxorrubicina, Vincristina e Apiol

O composto apiol e os quimioterápicos doxorrubicina e vincristina foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa em linhagem de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES). Foram testados os compostos: apiol, nas concentrações de 10, 25, 50, 100 μ M e 1 mM (2,5 – 250 μ g/mL); doxorrubicina, nas concentrações de 0,045, 0,45, 4,5 e 45 μ M (0,025 - 25 μ g/mL); vincristina, nas concentrações de 0,03, 0,3, 3 e 30 μ M (0,025 - 25 μ g/mL) e tratamentos conjuntos entre apiol-doxorrubicina e apiol-vincristina, em 48h de incubação. Também foram avaliados em linhagem tumoral de ovário (OVCAR-3), sendo padronizada a concentração de 100 μ M para o composto apiol e os quimioterápicos avaliados nas concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 μ M, bem como tratamentos conjuntos entre apiol e quimioterápicos, em 48 h de incubação.

Eupomatenóide-5 e Etoposídeo

O composto eupomatenóide-5 e o quimioterápico etoposídeo foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa em linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES). O eupomatenóide-5 foi avaliado nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 μM (0,75 – 6 $\mu\text{g/mL}$) e o etoposídeo em 2,5, 5 e 10 μM (1,5 – 6 $\mu\text{g/mL}$), além de tratamentos conjuntos entre etoposídeo e eupomatenóide-5, sendo 48h de incubação.

Eupomatenóide-5 e Apiol

A associação dos dois compostos isolados também foi avaliada no teste de atividade antiproliferativa *in vitro*, em linhagens tumorais de mama (MCF-7) e rim (786-0). Os tratamentos consistiram nas concentrações de 4,25, 8,5, 17, 34 e 68 μM (1,25 – 20 $\mu\text{g/mL}$) de eupomatenóide-5, na presença e na ausência de 100 μM de apiol, sendo 15h de incubação.

Análise dos dados

As leituras espectrofotométricas das absorbâncias foram realizadas a 540nm em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas e, através do *software* Origin®, foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados o TGI e GI₅₀, além de confeccionados os gráficos.

De acordo com CHOU e CHOU (1988), a análise do efeito combinatório pode ser realizada empregando-se o índice de redução de dose (DRI – *dose reduction index*), também chamado de relação de reversão. O DRI é uma medida de quantas vezes a dose pode ser reduzida em comparação com as doses de cada fármaco isoladamente e é calculada como se segue:

$$\text{DRI} = \frac{\text{GI}_{50}^* \text{ da droga citotóxica sozinha}}{\text{GI}_{50}^* \text{ da droga em combinação com o parceiro}}$$

*GI50, TGI

O DRI é importante em situações clínicas, em que a redução da dose conduz à toxicidade reduzida, enquanto a eficácia terapêutica é mantida. DRI > 1 é benéfico, indicando sinergismo.

6.3 Teste de inibição das topoisomerases I e II-alfa

Princípio do teste

As topoisomerases são enzimas nucleares requeridas durante a replicação do DNA e a disjunção cromossômica na mitose, devido à sua habilidade em alterar a helicoidização do DNA (WALSBY *et. al.*, 2011). Alguns quimioterápicos agem inibindo esta enzima, impedindo assim a progressão do crescimento tumoral. Esta metodologia foi realizada em colaboração com o Departamento de Farmácia e Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob orientação da Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo.

Procedimento experimental

Teste de inibição da topoisomerase I humana

A atividade catalítica da topoisomerase I foi avaliada pela conversão de 0,125 µg de DNA plasmidial superenovelado (Invitrogen, Cat. nº. 15367-014) em DNA relaxado quando incubado com 4 U de enzima topoisomerase I purificada (Sigma, EUA) por 30 minutos a 37°C em tampão (Tris-HCl pH 7,9 contendo 10 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 1% Albumina de Soro Bovino (BSA), 1 mM espermidina e 50% glicerol) na presença ou

ausência do eupomatenóide-5 nas concentrações de 100 e 200 μM . A reação foi interrompida com a adição, no gelo, de 4 μL de solução contendo 5% de dodecilsulfato de sódio (SDS), 0,025% de azul de bromofenol e 40% de glicerol (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2006).

Teste de inibição da topoisomerase II alfa humana

A atividade catalítica da topoisomerase II foi avaliada pela conversão de 0,125 μg de DNA plasmidial superenovelado (Invitrogen, Cat. nº. 15367-014) em DNA relaxado quando incubado com 4 U de enzima topoisomerase II (Sigma, USA) por 1h a 37°C em tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo KCl 120 Mm, MgCl_2 10 Mm, DTT 0,5 Mm e ATP 10 mM) na presença ou ausência do composto eupomatenóide-5 na concentração de 200 μM . A reação foi interrompida com a adição, no gelo, de 4 μL de solução contendo 5% de SDS, 0,025% de azul de bromofenol e 40% de glicerol (ESTEVES-SOUZA *et. al.*, 2006). Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico etoposídeo (BALLOT *et. al.*, 2012).

Análise dos dados

A atividade da enzima foi analisada pela presença das bandas de DNA após eletroforese gel de agarose 1%, tampão TBE 1X por 45 min. a 80V (2,0 V/cm) e visualizadas em luz U.V. pela presença do intercalante no DNA (*Gel Red*TM 10X, diluído 1:500, 0,025% final).

6.4 Citometria de fluxo

Os estudos acerca do mecanismo de ação dos compostos foram realizados no citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini Flow Cytometry System, Millipore®, Billerica, MA, EUA. Para otimização dos ensaios, as concentrações celulares finais para leitura foram padronizadas entre 5×10^4 e 5×10^5 células/mL. As concentrações (17 e 51 μM) dos compostos

escolhidas para avaliação basearam-se em testes antiproliferativos prévios, levando-se em conta os valores de TGI. As linhagens escolhidas para os estudos do mecanismo de ação foram 786-0 (rim) e MCF-7 (mama), por estarem entre as linhagens mais sensíveis ao tratamento com eupomatenóide-5.

6.4.1 Quantificação de células em fases do ciclo celular

Princípio do teste

Esse ensaio baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. Essa análise só é permitida após a permeabilização da membrana com o etanol 70% à 4°C.

As células na fase G_0/G_1 contêm duas cópias dos cromossomos, ou seja, apresentam ploidia típica ($2n=2c$) de células que ainda não entraram em mitose. Já as células que entraram em processo de divisão celular e iniciaram a síntese de material genético na fase S, apresentam uma maior quantidade de DNA ($>2c$) e, conseqüentemente, uma maior intensidade de marcação. As células que já tiveram seu material genético duplicado ($4c$) e estão prestes a sofrer citocinese (fase G_2/M), apresentam o dobro de fluorescência comparado à população G_0/G_1 .

Quando há fragmentação de DNA, característico de processos apoptóticos, há a presença da fase sub- G_1 (KAJSTURA *et. al.*, 2007).

Procedimento experimental

Para este ensaio, foram utilizadas as linhagens MCF-7 e 786-0. Foram inoculados 1000 μ L por compartimento, em placas de 6 compartimentos (Nunc[®]), de uma suspensão com densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5%

de CO₂, o meio foi aspirado e foi adicionado 1mL de meio RPMI sem SFB para o carenciamento, ou seja, a sincronização das células para o início do ciclo celular. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido e, após 24h de sincronização, foram tratadas com 12,5 e 25 µM do composto eupomatenóide-5 em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico etoposídeo, na concentração de 10 µM, que causa parada do ciclo em S ou G2/M (GONZÁLEZ-SARRÍAS *et. al.*, 2013; WALSBY *et. al.*, 2011).

Após 24h de tratamento, o meio foi coletado em tubo para centrífuga de 15 mL, os compartimentos foram lavados com 500 µL de PBS, o conteúdo coletado e as células aderidas foram desprendidas com auxílio de 500 µL de tripsina (0,25%), sendo posteriormente inibidas com 1000 µL de meio com SFB 5%. As células soltas foram coletadas e o tubo levado à centrífuga (Eppendorf® 5403) por 5 min. a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspensionado em 500 µL de PBS e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi aspirado de forma a deixar 100 µL de PBS, o qual foi utilizado para ressuspender o precipitado de células. Cuidadosamente essa solução de células foi adicionada a outro microtubo contendo 500 µL de etanol 70% gelado. O microtubo foi homogeneizado e mantido a 4°C por no mínimo 12h antes do procedimento de marcação. Procedeu-se então com a centrifugação das amostras a 2500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 500 µL de PBS, a fim de retirar todo o etanol. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado celular foi ressuspensionado em 200 µL do reagente *Guava® Cell cycle* (Merck/Millipore 4500-0220). As amostras foram incubadas por 30 min. protegidas da luz e a seguir analisadas em citômetro de fluxo (5000 eventos adquiridos).

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 650-670 nm (PI). As células que não tinham sido expostas ao kit de ciclo celular foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. A análise da quantidade celular presente em cada fase permitiu a confecção dos gráficos.

6.4.2 Quantificação de células em estágios de apoptose

Princípio do teste

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para detectar a quantidade total de células em apoptose, conforme descrito por Van Oostveldt (1999). Para este experimento, foi utilizado o kit Guava[®] Nexin Reagent (Merck/Millipore 4500-0450), que contém anexina V-PE e 7-AAD. Durante a apoptose, as células modificam a estrutura de suas membranas plasmáticas, o que sinaliza o início do processo de morte. A exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície celular é uma das mudanças estruturais que ocorre, sendo reconhecida pelos fagócitos, que captam este sinal e fagocitam a célula. Anexina V é uma proteína de ligação para fosfolípidos e, na presença de íons de cálcio, ela exibe alta afinidade para ligação seletiva a PS. PE é um fluorocromo e está acoplado à anexina V, portanto evidencia as células que tem a PS exposta. O 7-AAD é um composto químico fluorescente que tem alta afinidade pelo DNA, se intercalando nas regiões ricas em G-C. É impermeável quando a membrana plasmática está íntegra, ou seja, sua marcação evidencia o comprometimento da estrutura celular, fato que está associado com um estágio tardio de apoptose ou necrose (TELFORD *et. al.*, 2011).

Procedimento experimental

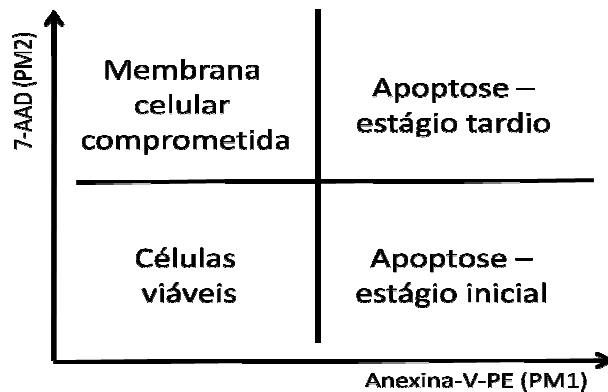
As linhagens 786-0 e MCF-7 foram inoculadas (1 mL por compartimento) em placas de 6 compartimentos (Nunc®), em uma densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e foram adicionados 2000 µL/compartimento do eupomatenóide-5 em duas concentrações distintas (17 e 51 µM). Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0,25% de DMSO, diluente dos compostos.

As leituras em citômetro de fluxo foram realizadas em dois tempos: 12 e 24h após a adição dos compostos. Após este período de tratamento, o meio foi coletado em tubo para centrifuga de 15 mL, os compartimentos foram lavados com PBS e as células aderidas foram desprendidas com auxílio de 500 µL de tripsina (0,25%), sendo posteriormente inibidas com 1000 µL de meio com SFB. As células soltas foram coletadas e o tubo levado à centrifuga por 5 min. a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspenso em 300 µL de meio, dos quais 100 µL foram adicionados a 100 µL do Guava Nexin Reagent em tubo eppendorf. A incubação foi realizada por 20 min. em ambiente escuro, à temperatura ambiente e a leitura feita em citômetro de fluxo (2000 eventos adquiridos).

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 525-575 nm (PE) e 650-670 nm (7-AAD). As células que não tinham sido expostas ao kit de anexina foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. A análise da quantidade celular presente em cada quadrante permitiu a confecção dos gráficos, conforme Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática dos quadrantes do gráfico de apoptose.



Quadrante inferior esquerdo: duplo negativo; quadrante inferior direito: AnexinaV-PE(+)/7AAD(-); quadrante superior direito: duplo positivo; quadrante superior esquerdo: AnexinaV-PE(-)/7AAD(+).

6.4.3 Detecção de caspases ativas

Princípio do teste

As enzimas caspases têm papel central no processo de morte celular por apoptose. Essas proteases formam uma família de enzimas que iniciam a cascata apoptótica (caspases -2, -8, -9 e -10), são responsáveis pelo colapso celular (-3, -6 e -7) e processam citocinas (-1, -4, -5, -11 a -14) (SALVESEN e DIXIT, 1997). O kit Guava® Multicaspase Detection Kit (4500-0101) utiliza um inibidor de caspase conjugado a um fluorocromo denominado *sulforhodamine-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone* (SR-VAD-FMK). Este inibidor é permeável à célula e não citotóxico. Uma vez dentro da célula, este inibidor se liga covalentemente às caspases que foram ativadas pela via apoptótica (BUTEAU, SPATZ e ACCILI, 2006). Células com marcação positiva para SR-VAD-FMK correspondem a células em estágio de apoptose. Incluído neste kit está também o corante 7-AAD, que é impermeável às células viáveis, mas permeável às células em estágio final de apoptose.

Procedimento experimental

As linhagens 786-0 e MCF-7 foram inoculadas (1 mL por compartimento) em placas de 6 compartimentos (Nunc®), numa densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/eestreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e foram adicionados 2000 µL/compartimento do eupomatenóide-5 em duas concentrações distintas (17 e 51 µM). Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0,25% de DMSO, diluente dos compostos.

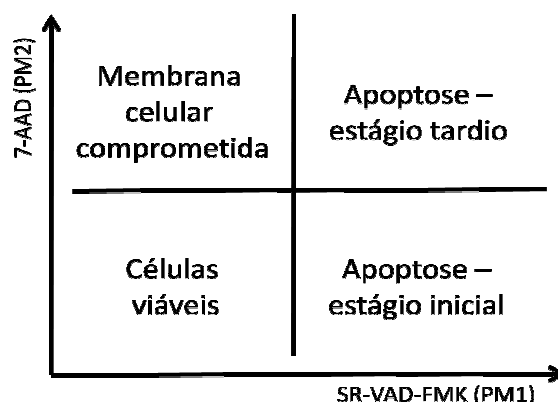
Após 6h de tratamento, o meio foi coletado em tubo para centrífuga de 15 mL, os compartimentos foram lavados com PBS e as células aderidas foram desprendidas com auxílio de 500 µL de tripsina (0,25%), sendo posteriormente inibidas com 1000 µL de meio RPMI/5%SFB. As células soltas foram coletadas e o tubo levado à centrifuga por 5 min. a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspense em 300 µL, dos quais 100 µL foram adicionados a 10 µL de *Guava Caspase Reagent Working Solution* em tubo eppendorf. A incubação foi realizada por 60 min. em ambiente escuro, à temperatura ambiente. Após incubação, 100 µL de 1x *Apoptosis Wash Buffer* foram adicionados para cada amostra. Posteriormente, os eppendorfs foram centrifugados a 300xg, por 5 min., sendo o procedimento repetido três vezes. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular ressuspense em 200 µL de *Caspase 7AAD Reagent Working Solution*, sendo as amostras incubadas por 10 min. à temperatura ambiente no escuro. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (2000 eventos adquiridos).

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 525-575 nm (SR-VAD-FMK) e 650-670 nm (7-AAD). As células que não tinham sido expostas ao kit foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob

estas mesmas condições. A análise da quantidade celular presente em cada quadrante permitiu a confecção dos gráficos, conforme Figura 11.

Figura 11. Representação esquemática dos quadrantes do gráfico de multicaspase.



Quadrante inferior esquerdo: duplo negativo; quadrante inferior direito: SR-VAD-FMK(+)/7AAD(-); quadrante superior direito: duplo positivo; quadrante superior esquerdo: SR-VAD-FMK (-)/7AAD(+).

6.4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Princípio do teste

Este teste baseia-se na capacidade da mitocôndria em sequestrar o corante fluorescente rodamina 123. Quando esta organela apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células que sequestram a rodamina emitem alta fluorescência. Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos com menor fluorescência quando comparados às células que possuem mitocôndrias que não sofreram alteração de potencial (PETIT, 1992).

Procedimento experimental

As linhagens 786-0 e MCF-7 foram inoculadas (1 mL por compartimento) em placas de 6 compartimentos (Nunc[®]), numa densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em meio

RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e foram adicionados 2000 µL/compartimento do eupomatenóide-5 em duas concentrações distintas (17 e 51 µM). Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0,25% de DMSO, diluente dos compostos.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C ao longo de 1,5h, 3h e 4,5h e, posteriormente, 1 µg/mL de rodamina-123 (Sigma®) em meio RPMI acrescido de 10% de SFB foi adicionado aos compartimentos. Após um período de 15 minutos de incubação a 37°C, o conteúdo foi aspirado e os compartimentos lavados 3 vezes com RPMI + SFB 10%, sendo posteriormente as células tripsinizadas e recolhidas em meio RPMI para a leitura do acúmulo de rodamina intracelular (5000 eventos), realizada em citômetro de fluxo.

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a análise de fluorescência a 550 nm. As células que não tinham sido expostas à rodamina-123 foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. Através da análise dos dados de intensidade de fluorescência, foi possível confeccionar os gráficos.

6.4.5 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Produção de peróxidos de hidrogênio (H₂O₂)

Princípio do teste

As células constantemente geram ROS durante o metabolismo aeróbico, exercendo papel protetivo e funcional importante no sistema imune e equilibram esta produção por meio de um sistema de defesa que combate a sua produção excessiva. ROS e estresse oxidativo desenvolvem papéis importantes em doenças como câncer, arterosclerose e diabetes. Portanto, para estabelecer seu papel preciso é necessário mensurar a quantidade de ROS

presente na célula, bem como o dano oxidativo causado por estes compostos químicos (ERUSLANOV e KURSMATSEV, 2010).

Existem muitos métodos que mensuram a produção de radicais livres na célula. Uma das técnicas mais utilizadas para quantificar o estado redox da célula envolve o uso de uma sonda fluorescente denominada 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Esta sonda é estável, fluorogênica, apolar e pode ser rapidamente difusa nas células e desacetilada por esterases intracelulares em uma molécula de DCFH não fluorescente, que é posteriormente oxidada por peróxido de hidrogênio intracelular a DCF, que é altamente fluorescente. Portanto, a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de peróxido de hidrogênio intracelular (MAHALINGAIAH e SINGH, 2014).

Procedimento experimental

As linhagens 786-0 e MCF-7 foram inoculadas (1 mL por compartimento) em placas de 6 compartimentos (Nunc®), em uma densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e foram adicionados 2000 µL/compartimento do eupomatenóide-5 nas concentrações de 17 µM de 51 µM, diluído em meio HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*), sendo as placas novamente incubadas em estufa ao longo de 1,5h, 3h e 4,5h. Após este período, as células foram lavadas com tampão HBSS, sendo novamente incubadas por 30 min. com 10 µM de DCFH-DA (Molecular Probes/Invitrogen), tomando o cuidado de protegê-las da luz. Para a leitura da quantidade de ROS intracelular (5000 eventos), o conteúdo foi aspirado, os compartimentos lavados com tampão HBSS e as células tripsinizadas e ressuspensas em HSBB. Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0,25% de DMSO, diluente dos compostos.

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a análise de fluorescência a 530 nm. As células que não tinham sido expostas à sonda foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. Através da análise dos dados de intensidade de fluorescência, foi possível confeccionar os gráficos.

Produção de ânions superóxido (O_2^-)

Princípio do teste

A mitocôndria exerce um papel crítico no balanço energético das células, na regulação de proteínas apoptóticas e são fontes de ROS (ARONIS *et. al.*, 2003). A produção de íons superóxido ocorre durante as etapas de fosforilação oxidativa da respiração celular, em um processo de redução do oxigênio molecular pela cadeia transportadora de elétrons (LAMBERT e BRAND, 2009). Os íons superóxido produzidos podem iniciar uma cascata de reações que levam à produção de peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. Estresse oxidativo e danos às estruturas celulares podem levar à morte celular por apoptose ou a um declínio celular energético, culminando em senescência (CADENAS e DAVIES, 2000).

MitoSOX Red é um corante fluorescente permeável às células vivas, ligando-se seletivamente às mitocôndrias. Este corante é rapidamente oxidado pelo íon superóxido, mas não por outras espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Portanto, a intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de radicais superóxido presentes nas células (MUKHOPADHYAY *et. al.* 2007).

Procedimento experimental

As linhagens 786-0 e MCF-7 foram inoculadas (1 mL por compartimento) em placas de 6 compartimentos (Nunc®), em uma densidade de inoculação de 1×10^5 céls/mL em

meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, o meio foi aspirado e foram adicionados 2000 µL/compartimento do eupomatenóide-5 nas concentrações de 17 e 51 µM, sendo as placas novamente incubadas em estufa ao longo de 1,5h, 3h e 4,5h. Após este período, as células foram lavadas com tampão 1x *Assay Buffer* HSC, sendo novamente incubadas por 15 min. com 100 µL de *MitoStress Working Solution* [2 µL de *Mitosox Red Reagent* (Merck/Millipore 4700-1335) + 98 µL de 1x *Assay Buffer* HSC (Merck/Millipore 4200-0131)], tomando o cuidado de protegê-las da luz. Para a leitura da quantidade de radicais superóxido (5000 eventos), o conteúdo foi aspirado, os compartimentos lavados com tampão HSC e as células tripsinizadas e ressuspensas em 200 µL de HSC. Como controle negativo foram utilizadas apenas células e meio de cultura RPMI contendo 0.25% de DMSO, diluente dos compostos.

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a análise de fluorescência a 550-580 nm. As células que não tinham sido expostas à sonda foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. Através da análise dos dados de intensidade de fluorescência, foi possível confeccionar os gráficos.

6.4.6 Teste do efluxo de rodamina-123 intracelular por meio da glicoproteína-P (P-gp)

Princípio do teste

A resistência aos quimioterápicos promovida pela P-gp é a forma de resistência mais estudada *in vitro*, *in vivo* e na clínica e, conseqüentemente, um grande número de fármacos e compostos recentemente sintetizados é investigado pelas suas habilidades em afetar o

fenômeno (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010). A atividade da P-gp foi determinada pelo efluxo de rodamina-123, corante fluorescente que serve como substrato para P-gp, através da técnica de citometria de fluxo, em linhagem tumoral de ovário que expressa fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), caracterizada pela alta expressão de P-gp em suas membranas celulares (LISCOVITCH e RAVID, 2007).

Procedimento experimental

Células da linhagem NCI/ADR-RES numa densidade de 1×10^5 céls/mL foram semeadas (1 mL/compartimento) e incubadas em meio RPMI/5%SFB acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C por um período de 24h em placas de 6 compartimentos. Após este período, 2.5 µg/mL de rodamina-123 (Sigma®) em meio RPMI acrescido de 10% de SFB foram adicionados aos compartimentos, sendo as placas incubadas por mais 30 min. a 37°C. Posteriormente o conteúdo foi aspirado e os compartimentos lavados 3 vezes com RPMI + SFB 10%. Finalmente, as células foram tratadas, sendo o controle positivo verapamil utilizado na concentração de 10 µM e o composto apiol na concentração de 100 µM. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e a leitura do acúmulo de rodamina intracelular (5000 eventos) foi realizada após 60 e 90 min. do tratamento.

Análise dos dados

A excitação foi realizada por um laser de argônio de operação a 488 nm e a análise de fluorescência a 550 nm. As células que não tinham sido expostas à rodamina-123 foram utilizadas para determinar a autofluorescência sob estas mesmas condições. Através da análise dos dados de intensidade de fluorescência, foi possível confeccionar os gráficos.

6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Princípio do teste

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca. O MEV é um aparelho que fornece rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é muito comum em biologia celular. Esta metodologia foi realizada em colaboração com o Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, sob responsabilidade do prof. Dr. Luiz Carlos Alves e técnico Rafael José R. Padilha.

Procedimento experimental

Células das linhagens 786-0 e MCF-7 na concentração de 1×10^5 céls/mL foram plaqueadas e no dia seguinte tratadas com 51 μ M de eupomatenóide-5 por 6h a 37°C. As células foram recolhidas e centrifugadas por 5 min. a 2500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular lavado com PBS até total remoção do meio de cultura, sendo centrifugado novamente. O precipitado foi então fixado *overnight* em 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato (0,1 M pH 7.4) a 4°C. Após fixação o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,2) e pós-fixado com 1% (p/v) de tetróxido de ósmio por 1h. Posteriormente o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e seco ao ponto crítico em dessecador de CO₂ (Hitachi HCP-2). O espécime seco foi montado em suporte (stub) ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de elétrons e ao

coletor e posteriormente coberto com ouro (QUORUM Q150T ES - Quorum Technologies Ltd, UK).

Análise dos dados

Os espécimes foram analisados usando microscópio de varredura EVO LS15 ZEISS (Carl Zeiss Microscopy - Jena, Germany) operando a 5 kV.

7. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO* – Tumor ascítico de Ehrlich

Princípio do teste

O tumor de Ehrlich é de origem murina, transplantável, originado de um adenocarcinoma mamário. De crescimento rápido, é capaz de se desenvolver tanto na forma ascítica quanto na forma sólida (NASCIMENTO *et. al.*, 2006).

Procedimento experimental

O ensaio farmacológico *in vivo* foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/Unicamp 2163-1, ANEXOS II).

As células de Ehrlich foram descongeladas, ressuspensas em tampão fosfato-salina (PSB) e centrifugadas por 5 min. a 2500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular novamente ressuspendido em PBS, em um volume suficiente para que cada animal recebesse $8,75 \times 10^5$ células em uma proporção de 10 mL/kg (via i.p.). Dois animais receberam essas células e foram considerados doadores. Após sete dias sofreram eutanásia por deslocamento cervical e seu líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento.

Foram coletados 2 mL de líquido ascítico, adicionados a 2 mL de ficoll e a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 15 min., a 18°C, para precipitar granulócitos e eritrócitos

e obter as células tumorais. Nessas condições formou-se um anel celular, que foi coletado em PBS e submetido à centrifugação, nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* livre de hemácias e células brancas ressuspenso em PBS em quantidade suficiente para a inoculação de 1×10^4 células/ 100 μ L, via i.p., em cada animal.

Foram utilizados 35 camundongos fêmeas da linhagem BALB/C, pesando entre 20-25 g, com 90 dias de idade, oriundos do Biotério Central (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas individuais identificadas, sendo fornecidas ração e água *ad libitum*.

Os animais foram pesados e divididos em grupos (n=7), sendo tratados com os compostos por via intraperitoneal (i.p.) 4 dias após a inoculação das células. Os grupos foram divididos em: controle negativo (PBS), controle positivo (5-Fu) na dose de 10 mg/Kg e os grupos experimentais eupomatenóide-5 na dose de 10 mg/Kg, apiol na dose de 30 mg/Kg e um grupo de tratamento conjunto entre eupomatenóide-5 e apiol. Os tratamentos foram feitos diariamente ao longo de 1 semana. As doses do eupomatenóide-5 e do apiol foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos com os ensaios de toxicidade aguda previamente realizados.

Análise dos dados

No 11º dia de teste, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e o volume ascítico coletado. Foram avaliadas a contagem do número de células tumorais utilizando o citômetro de fluxo e a variação do peso corporal dos animais.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

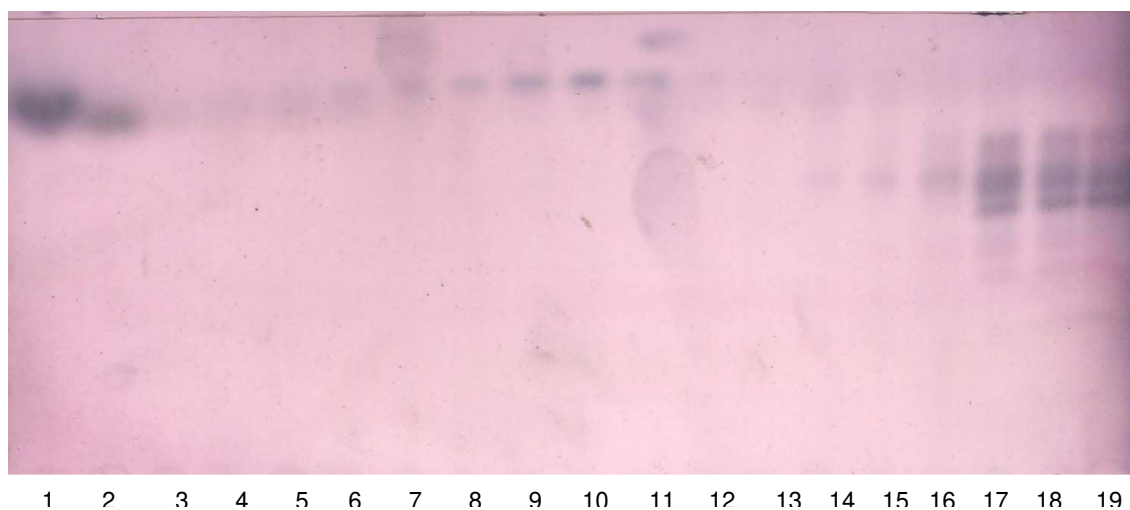
Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* foram expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de p menores que 0.05 ($p < 0.05$) foram considerados estatisticamente significantes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

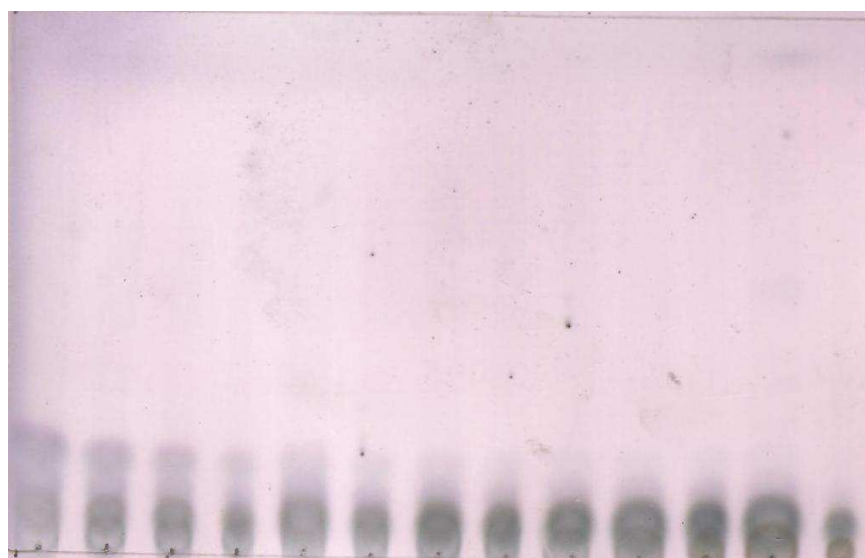
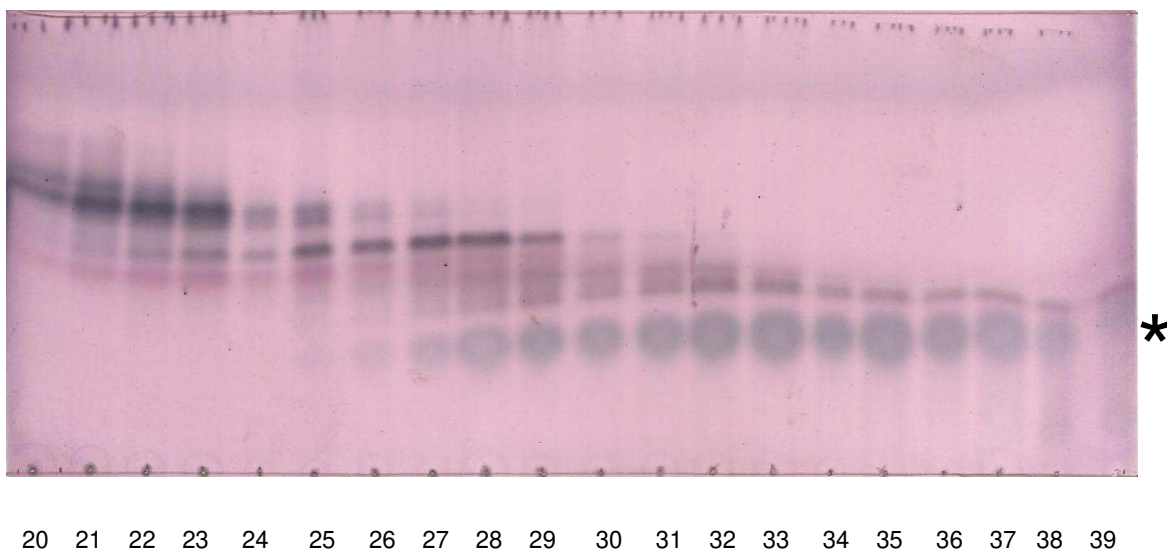
RESULTADOS

1. ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS EUPOMATENÓIDE-5 E APIOL

O EBDa foi fracionado em 52 frações (Figura 12). As frações 27-39 continham a lignana eupomatenóide-5 e apresentaram Rf próximos, podendo ser agrupadas (denominada FRF). A FRF foi submetida a processos de cristalização e recristalização, com o objetivo de isolar o composto eupomatenóide-5, resultando em 841,6 mg de composto puro. Este composto foi enviado para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM). O cromatograma adquirido (Figura 13) foi comparado com aqueles previamente obtidos (PESSINI *et. al.*, 2005) para verificação do teor relativo do composto isolado, confirmando tratar-se do eupomatenóide-5.

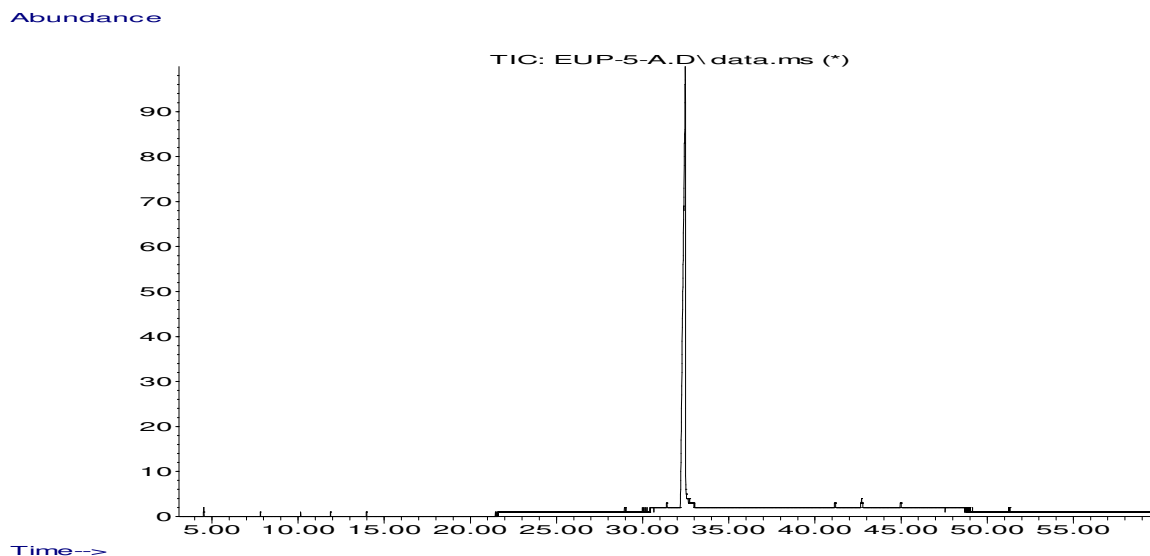
Figura 12. CCD das frações obtidas após fracionamento por coluna filtrante do EBDa.





(Fase móvel: Hexano/acetato de etila 40:60 e revelador: anisaldeído) *Eup-5

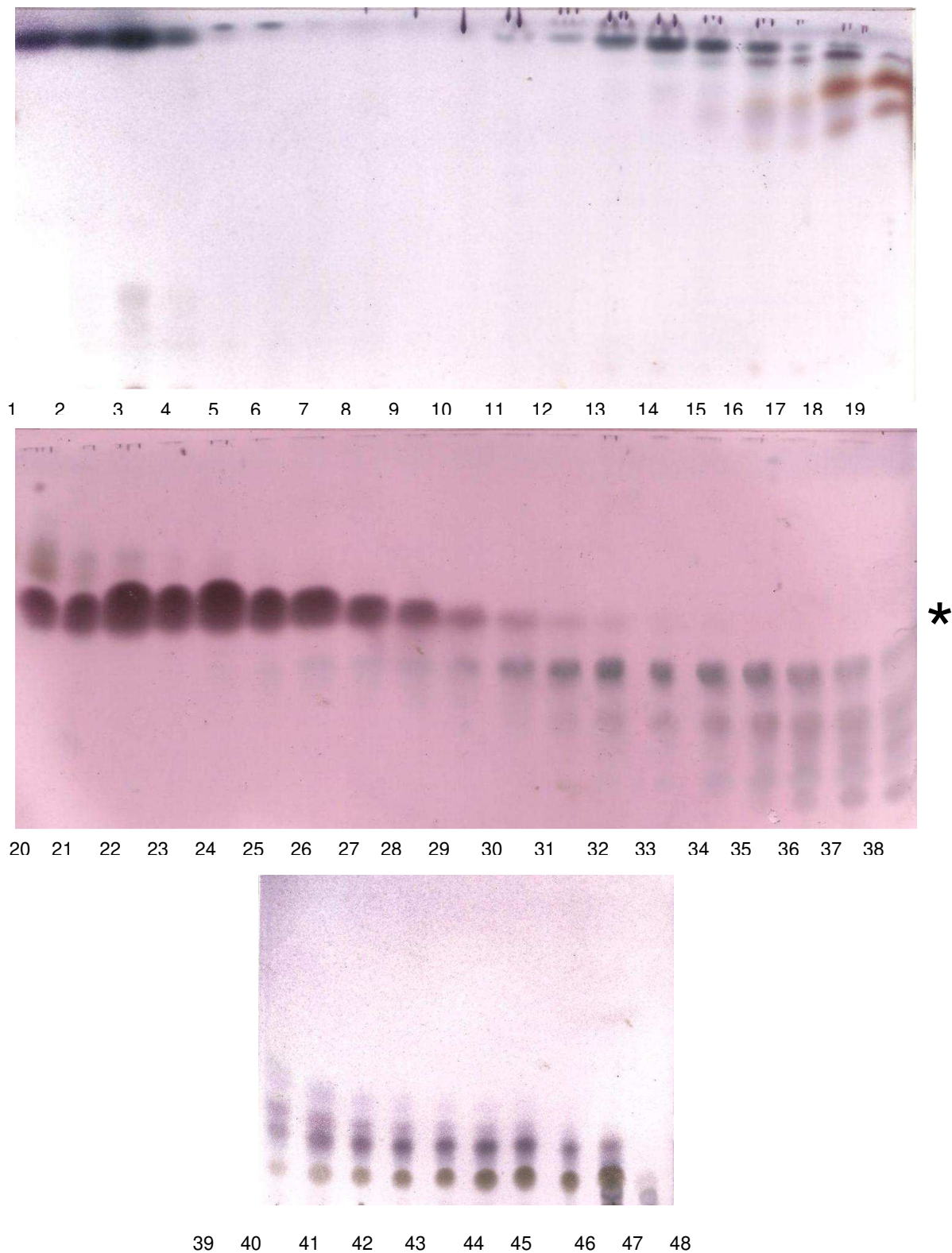
Figura 13. Cromatograma observado por CG/EM (HP 6890/HP 5975) para o eupomatenóide-5.



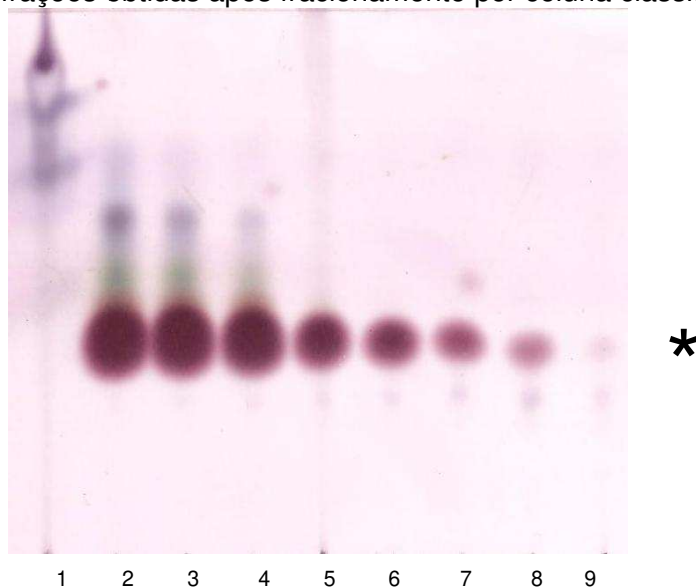
O EBDb foi primeiramente fracionado em 48 frações (Figura 14). As frações que apresentaram R_f próximos foram agrupadas, originando 7 novas sub-frações (FRA a FRG), sendo que a FRD continha um composto de cor roxa. Esta fração foi submetida a processo de refracionamento, originando 9 frações (Figura 15). As frações 5-8 foram enviadas para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG-EM). As frações foram agrupadas, resultando em 345 mg de composto com elevado grau de pureza.

Através dos dados espectrais, HRESI-MS e da biblioteca NIST (Anexos 1-7 e Tabela 3) aliados aos dados publicados por BENEVIDES, SARTORELLI e KATO (1999), o composto-2 foi identificado como sendo o apiol, pertencente à classe de fenilpropanóides. De acordo com dados da literatura (NEUHAUS-CARLISLE, VIERLING e WAGNER, 1997) o apiol é um bloqueador de canal de cálcio. Sua atividade antiproliferativa, bem como sua atividade associada a quimioterápicos, foi comparada com o composto Verapamil (*hydrochloride verapamil* Sigma[®]), por ser um bloqueador clássico dos canais de cálcio, utilizado na clínica como antiarrítmico (MOLENTO *et. al.*, 2013).

Figura 14. CCD das frações obtidas após fracionamento por coluna filtrante do EBDb.



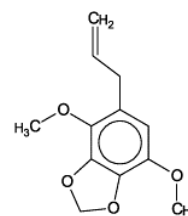
(Fase móvel: Hexano/acetato de etila 40:60 e revelador: anisaldeído) *ApioI

Figura 15. CCD das frações obtidas após fracionamento por coluna clássica da FRD.

(Fase móvel: Hexano/acetato de etila 40:60 e revelador: anisaldeído). *apiool

Tabela 3. Dados espectrais de RMN¹H e RMN¹³C observados para o composto-2 isolado (11 Tesla, CDCl₃).

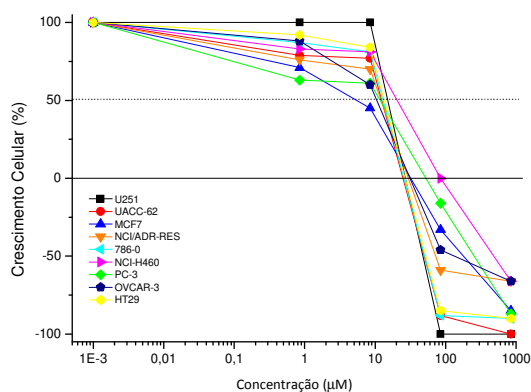
Carbono	Tipo	$\delta^1\text{H}$)	$\delta^{13}\text{C}$)	HMBC
1	CH ₂	3,32	34,01	5, 4, 6, 7
2	CH ₃	3,84	56,78	3, 10
3	CH ₃	3,87	60,03	2, 10
4	CH ₂	5,94	101,43	5
5	CH	6,30	108,17	4
6	CH ₂	5,01	115,27	
7	C ^O	--	125,68	
8	C ^O	--	135,06	
9	C ^O	--	136,19	
10	CH	5,94	137,28	
11	C ^O	--	138,66	
12	C ^O	--	139,00	



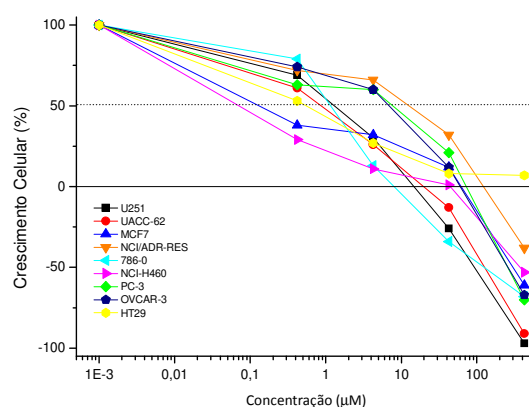
2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO EUPOMATENÓIDE-5

A investigação da atividade anticâncer do eupomatenóide-5 (eup-5) teve início com a avaliação da atividade antiprolifertiva em cultura de células tumorais humanas. Os resultados obtidos demonstraram que o eupomatenóide-5 apresentou atividade antiproliferativa com valores de TGI menores para mama, próstata, rim e ovário. O etoposídeo também apresentou inibição de crescimento e morte celular com seletividade para linhagens de glioma, melanoma, rim e pulmão. Os valores de TGI das linhagens de ovário resistente, próstata, ovário e cólon tratadas com o eupomatenóide-5 foram menores que os obtidos com o tratamento pelo quimioterápico etoposídeo (Figura 16 e Tabela 4).

Figura 16. Gráficos da atividade antiproliferativa do composto eupomatenóide-5 **(A)** e do quimioterápico etoposídeo **(B)** em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48h de incubação.



A



B

U251 – glioma, UACC-62 – melanoma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT-29 – cólon.

Tabela 4. Atividade antiproliferativa do eupomatenóide-5 e do etoposídeo em cultura de células tumorais humanas^a, após 48h de incubação, expressa em TGI^b.

Linhagens	EUP-5^c	ETOP^d
Glioma (U251)	27,21	11,79
Melanoma (UACC-62)	27,89	12,69
Mama (MCF7)	21,32	23,61
Ovário resistente (NCI/ADR-RES)	47,62	110,32
Rim (786-0)	24,00	10,46
Pulmão (NCI-H460)	34,89	12,26
Próstata (PC-3)	22,00	49,19
Ovário (OVCAR-3)	18,70	45,82
Cólon (HT-29)	59,93	233,23

^a Método colorimétrico - SRB

^b Os valores de TGI representam a concentração mínima necessária (μM) para inibição total do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). ^cEupomatenóide-5 (0,5 a 500 μM). ^dEtoposídeo (0,425 a 425 μM).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1 Associação entre eup-5 e etoposídeo em NCI/ADR-RES

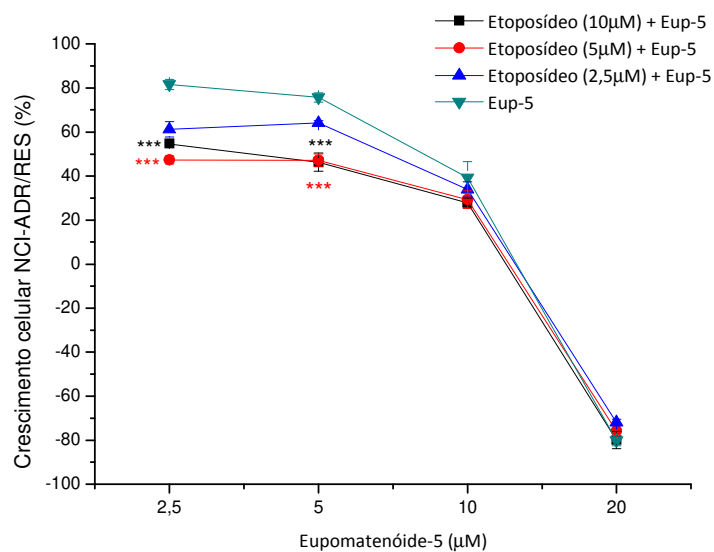
De acordo com a Figura 17A, a associação entre as duas maiores concentrações de eupomatenóide-5 (10 e 20 μM) e etoposídeo não potencializou o efeito antiproliferativo do próprio composto isolado. Da mesma forma a associação entre as duas menores concentrações de eupomatenóide-5 (2,5 e 5 μM) e o etoposídeo não potencializou o efeito antiproliferativo do quimioterápico (Figura 17B), sugerindo que eles estão competindo pelo mesmo sítio de ligação (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade antiproliferativa^a do etoposídeo/eupomatenóide-5 em cultura de células tumorais humanas (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação, expressa em GI₅₀^b.

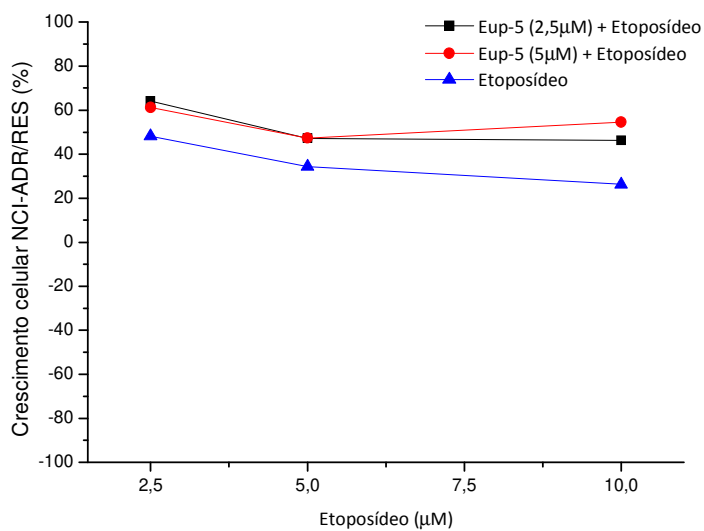
Etoposídeo	Eup-5 5 μM + Etoposídeo	Eup-5 2.5 μM +Etoposídeo
2,18 $\pm$ 0,06	7,66 $\pm$ 2,68	9,20 $\pm$ 1,48

^a Método colorimétrico – SRB ^b Os valores de GI₅₀ representam a concentração mínima necessária (μM) para inibir 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). Concentrações avaliadas: 2.5 e 5 μM (etoposídeo). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 17. Gráficos (A e B) da atividade antiproliferativa do quimioterápico Etoposídeo em associação ao composto Eupomatenóide-5 em NCI-ADR/RES, após 48h de incubação.



A



B

*** $p < 0,001$ (em relação ao grupo tratado apenas com eupomatenóide-5).

Teste de Tukey (ANOVA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

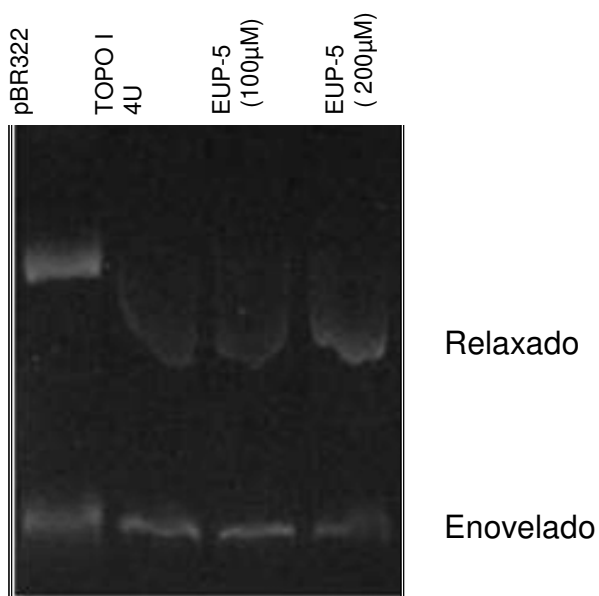
2.2 Teste de inibição das enzimas topoisomerase I e II

Por serem compostos pertencentes à classe das lignanas, era esperado que os perfis de atividade antiproliferativa *in vitro* do eupomatenóide-5 e do etoposídeo fossem semelhantes. Embora os perfis de atividade apresentados na Figura 16 não tenham muita semelhança, a hipótese de que o eupomatenóide-5 poderia agir nas fases do ciclo celular inibindo a enzima topoisomerase II, assim como o composto semi-sintético (NITISS, 2009), não foi descartada. Para essa avaliação foi realizado teste de atividade sobre as enzimas topoisomerasas I e II humanas, na presença e na ausência do eupomatenóide-5.

De acordo com a Figura 18, o eupomatenóide-5, nas concentrações de 100 e 200 μM , não promoveu inibição da atividade da enzima topoisomerase I. Na presença deste composto, e sob ação da topoisomerase I, o DNA assumiu um estado topológico relaxado. A molécula de DNA em estado relaxado tende a ocupar maior espaço, o que dificulta sua translocação entre os interstícios do gel, ficando retida neste.

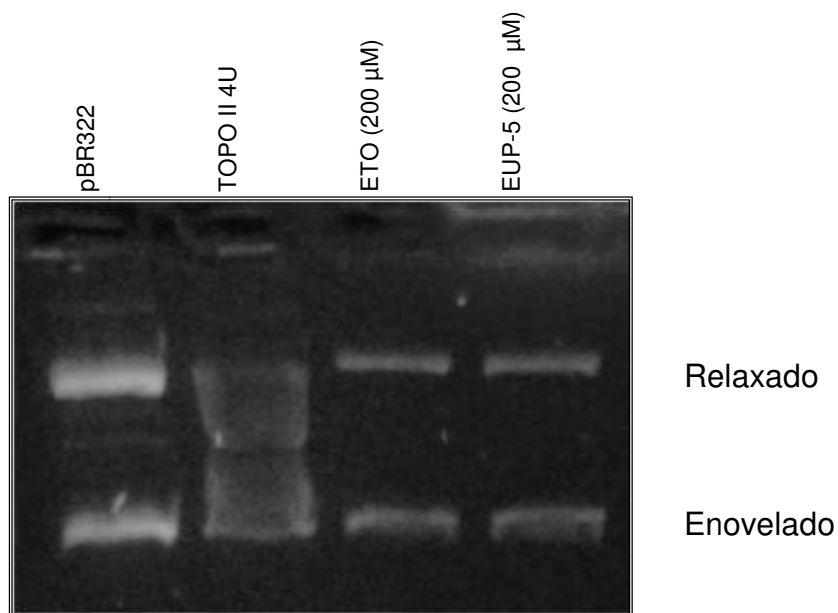
Já na Figura 19 é possível observar que tanto o quimioterápico etoposídeo quanto o eupomatenóide-5, ambos na concentração de 200 μM , inibiram a atividade da topoisomerase II-alfa, de modo que o DNA superenovelado migrou através do gel de agarose.

Figura 18. Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com topo I purificada.



Banda 1: apenas 0,125 µg de pBR322; Banda 2: 0,125 µg de pBR322 + 4U de topo I; Bandas 3 e 4: 0,125 µg de pBR322 + 4U de topo I + Eupomatenóide-5 nas concentrações de 100 e 200 µM, respectivamente.

Figura 19. Produtos do relaxamento do DNA plasmidial com topo II purificada.



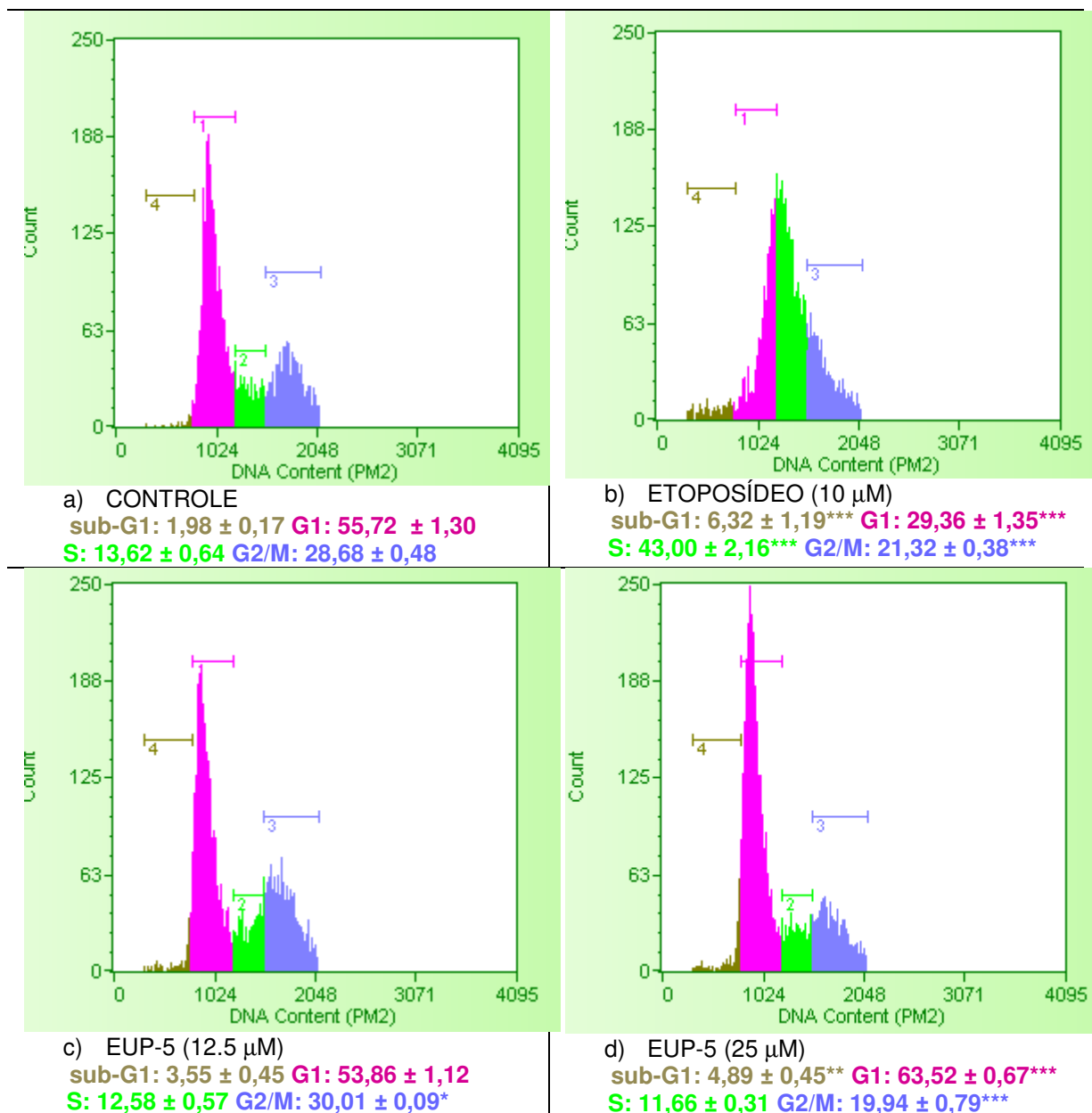
Banda 1: apenas 0.125 µg de pBR322; Banda 2: 0.125 µg de pBR322 + 4U de topo II; Banda 3: 0.125 µg de pBR322 + 4U de topo II + Etoposídeo, na concentração de 200 µM; Banda 4: 0.125 µg de pBR322 + 4U de topo II + Eupomatenóide-5 na concentração 200 µM.

2.3 Quantificação de células em fases do ciclo celular

Como os resultados do ensaio de inibição da topoisomerase-II apontaram para uma atividade bloqueadora do eupomatenóide-5 e, considerando que esta enzima está intimamente relacionada às fases de progressão do ciclo celular, urgiu-se a necessidade de um estudo envolvendo a quantificação de células nas etapas G1, S e G2/M do ciclo celular nas linhagens 786-0 e MCF-7, após 24h de tratamento com eupomatenóide-5 nas concentrações de 12,5 μ M e 25 μ M.

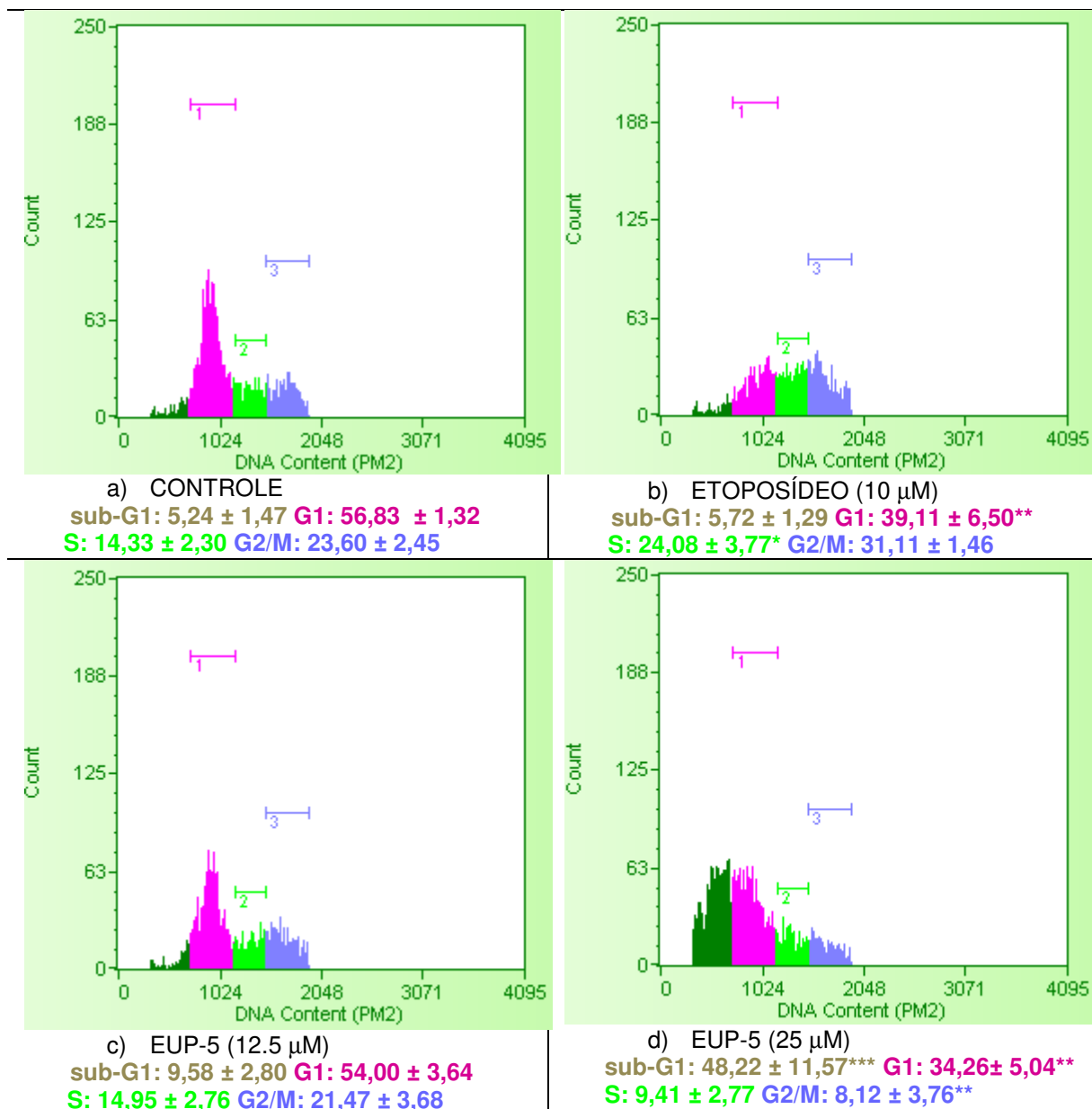
Como controle positivo deste teste foi utilizado o quimioterápico etoposídeo na concentração de 10 μ M. Conforme esperado, o tratamento com etoposídeo levou a um aumento do número de células na fase S da linhagem 786-0 (de 13,62% para 43%, Figura 20), bem como da linhagem MCF-7 (de 14,33% para 24,08%, Figura 21).

Diferentemente dos resultados obtidos para o quimioterápico, o eupomatenóide-5 nas concentrações avaliadas (12,5 μ M e 25 μ M) não elevou o número de células 786-0 e MCF-7 na fase S (Figuras 20 e 21). Entretanto, é possível observar pela Figura 21 que houve um aumento significativo da população de células MCF-7 tratadas com 25 μ M de eupomatenóide-5 em sub-G1 (de 5,24 para 48,22%), o que reflete em fragmentação de DNA, indicativo de apoptose.

Figura 20. Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células 786-0.

Após 24h de tratamento o conteúdo de DNA foi quantificado e as fases do ciclo celular determinadas.
 marrom – sub-G1, rosa – G1, verde – S, azul – G2/M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle).

Teste de Tukey (ANOVA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 21. Histogramas representativos do conteúdo de DNA em células MCF-7.

Após 24h de tratamento o conteúdo de DNA foi quantificado e as fases do ciclo celular determinadas.

rosa – G1, verde – S, azul – G2/M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle).

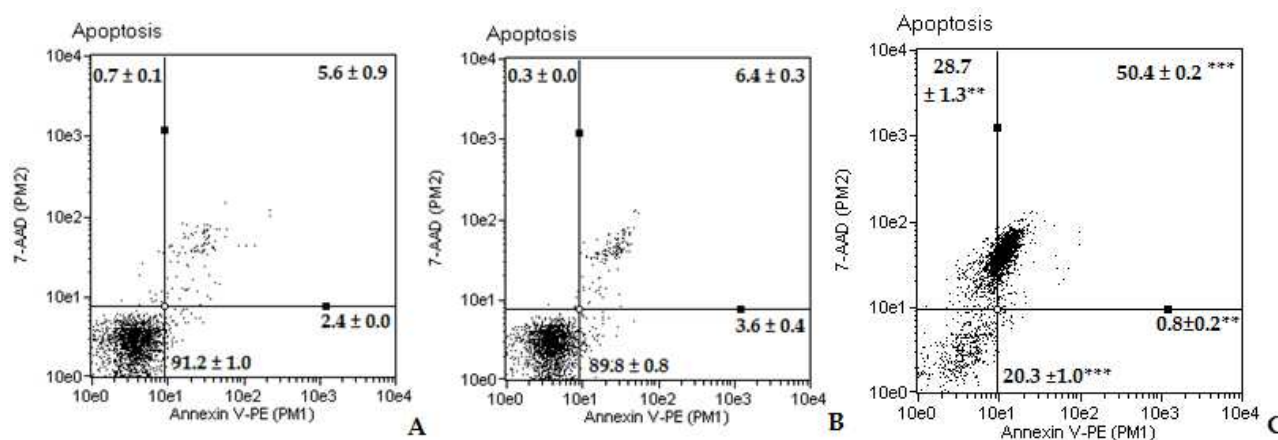
Teste de Tukey (ANOVA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4. Quantificação de células em estágios de apoptose

Eupomatenóide-5 em 786-0 após 24h de incubação

Após 24h de tratamento, a concentração de 17 μM de eupomatenóide-5 não aumentou a quantidade de células da linhagem 786-0 em apoptose, sendo estatisticamente semelhante ao controle de células. A concentração de 51 μM de eupomatenóide-5 diminuiu a quantidade de células viáveis (de 91,2% para 20,3%) e elevou tanto a quantidade de células duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (de 5,6% para 50,4% - apoptose tardia) quanto células marcadas apenas com 7-AAD (de 0,7% para 28,7%), o que evidencia que, no tempo avaliado, esta concentração foi citotóxica, provocando dano celular, sem evidenciar células em estágio inicial de apoptose (Figura 22).

Figura 22. Percentuais de células 786-0 marcadas com anexina-PE e 7-AAD.



Os valores indicam a porcentagem de células em cada estágio após 24h de incubação.

Controle DMSO (A), Eupomatenóide-5 17 μM (B), Eupomatenóide-5 51 μM (C).

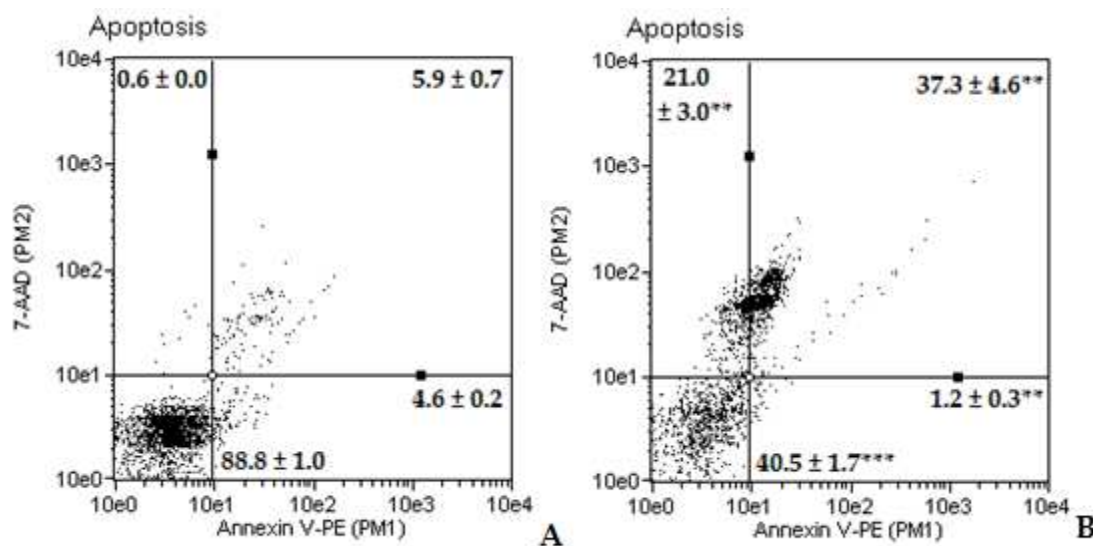
p<0,01, *p<0,001 (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Eupomatenóide-5 em 786-0 após 12h de incubação

Com o intuito de detectar um aumento do estágio inicial de apoptose, a concentração de 51 μM de eupomatenóide-5 foi mantida e o tempo de exposição ao tratamento foi reduzido para 12h; entretanto, assim como no tempo de 24h, esta concentração causou um aumento tanto da quantidade de células duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (de 5,9% para 37,3% - apoptose tardia) quanto de células marcadas apenas com 7-AAD (de 0,6% para 21,0%), sem evidenciar células em estágio inicial de apoptose.

Figura 23. Percentuais de células 786-0 marcadas com anexina-V-PE e 7-AAD.



Os valores indicam a porcentagem de células em cada estágio, após 12h de incubação.

Controle DMSO (A), Eupomatenóide-5 51 μM (B).

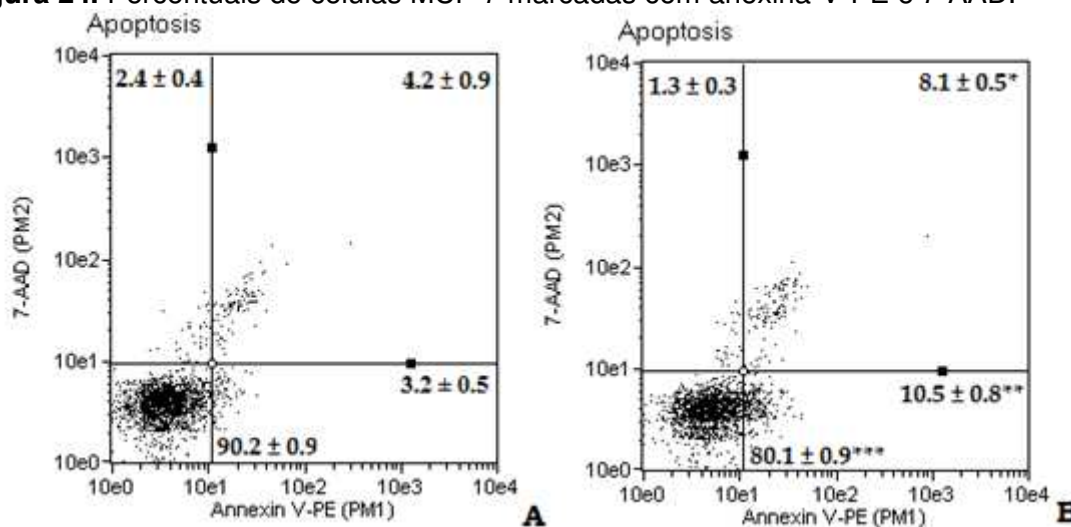
$^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Eupomatenóide-5 em MCF-7 após 24h de incubação

Através da Figura 24 é possível inferir que a concentração de 17 μM de eupomatenóide-5 aumentou a quantidade de células da linhagem MCF-7, tanto em processo inicial (de 3,2% para 10,5%) quanto tardio (4,2% para 8,1%) de apoptose. Não foi possível avaliar o efeito da concentração de 51 μM de eupomatenóide-5, uma vez que após 24h de exposição todas as células encontravam-se desfragmentadas, corroborando com os dados de citotoxicidade observados anteriormente.

Figura 24. Percentuais de células MCF-7 marcadas com anexina-V-PE e 7-AAD.



Os valores indicam a porcentagem de células em cada estágio, após 24h de incubação.

Controle DMSO **(A)**, Eupomatenóide-5 17 μM **(B)**.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

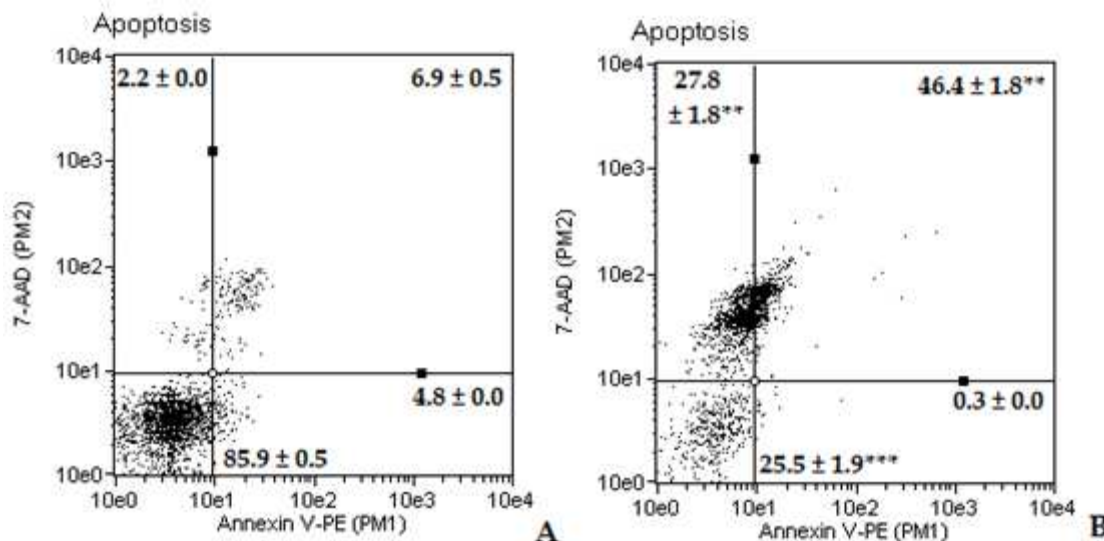
Os experimentos foram realizados em triplicata.

Eupomatenóide-5 em MCF-7 após 12h de incubação

Com o intuito de detectar um aumento do estágio inicial de apoptose, a concentração do eupomatenóide-5 foi elevada e o tempo de exposição ao tratamento foi reduzido para 12h.

Através da Figura 25 é possível afirmar que a concentração de 51 μ M de eupomatenóide-5 aumentou tanto a quantia de células duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (apoptose tardia, de 6,9% para 46,4%) quanto células marcadas apenas com 7-AAD (de 2,2% para 27,8%), o que evidencia que, no tempo avaliado, esta concentração foi bastante citotóxica, levando a um comprometimento da membrana celular, sem evidenciar células em estágio inicial de apoptose.

Figura 25. Percentuais de células MCF-7 marcadas com anexina-V-PE e 7-AAD.



Os valores indicam a porcentagem de células em cada estágio, após 12h de incubação.

Controle DMSO (A), Eupomatenóide-5 51 μ M (B).

p<0,01, *p<0,001 (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

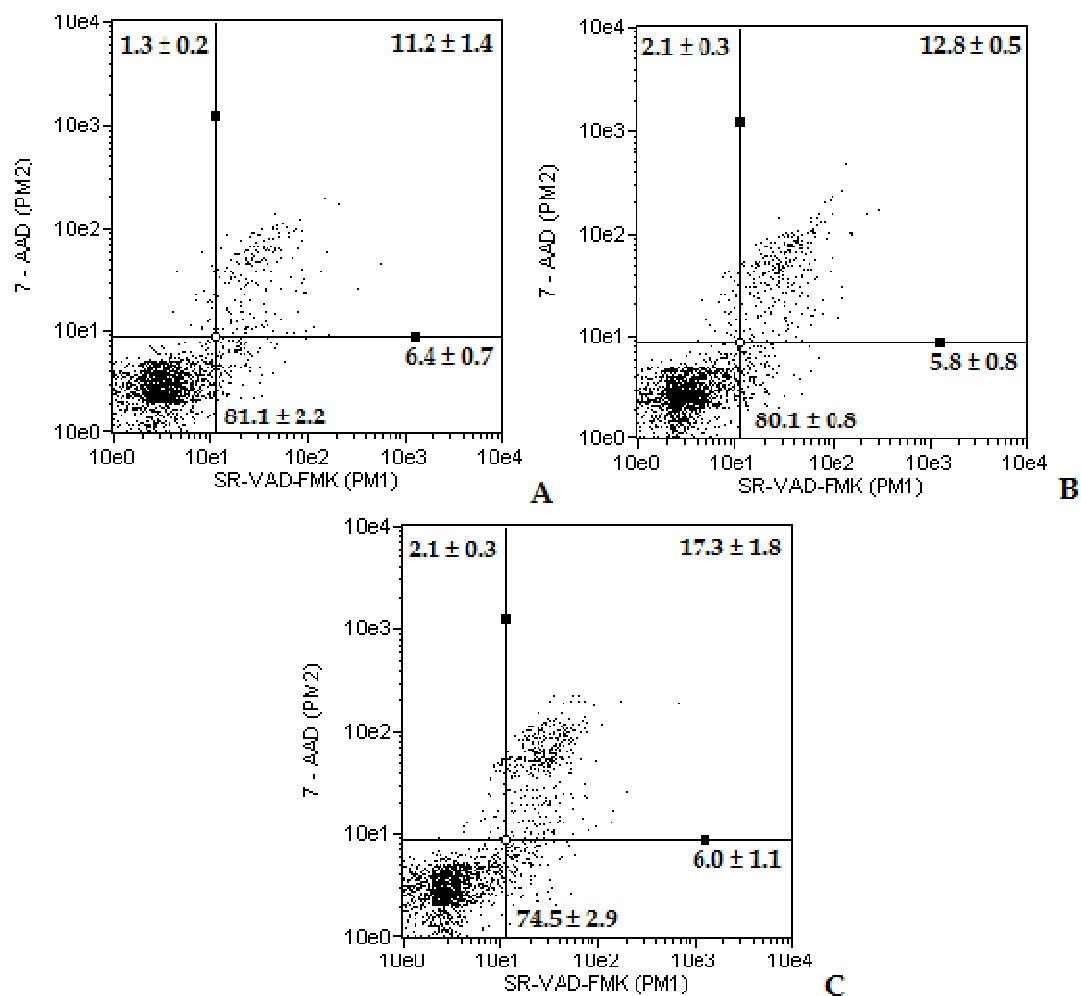
Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 Detecção de caspases ativas

Este ensaio teve como principal objetivo verificar se a morte celular observada nas linhagens MCF7 e 786-0 estava relacionada à ativação da cascata de caspases, enzimas importantes no processo de apoptose. Para isto, foram consideradas as concentrações de 17 e 51 μ M de eupomatenóide-5 e em tempo de tratamento de 6h.

De acordo com a Figura 26 é possível inferir que o eupomatenóide-5, nas concentrações de 17 e 51 μ M, não elevou significativamente o número de células da linhagem 786-0 marcadas com SR-VAD-FMK evidenciando, portanto, a ausência de caspases ativas.

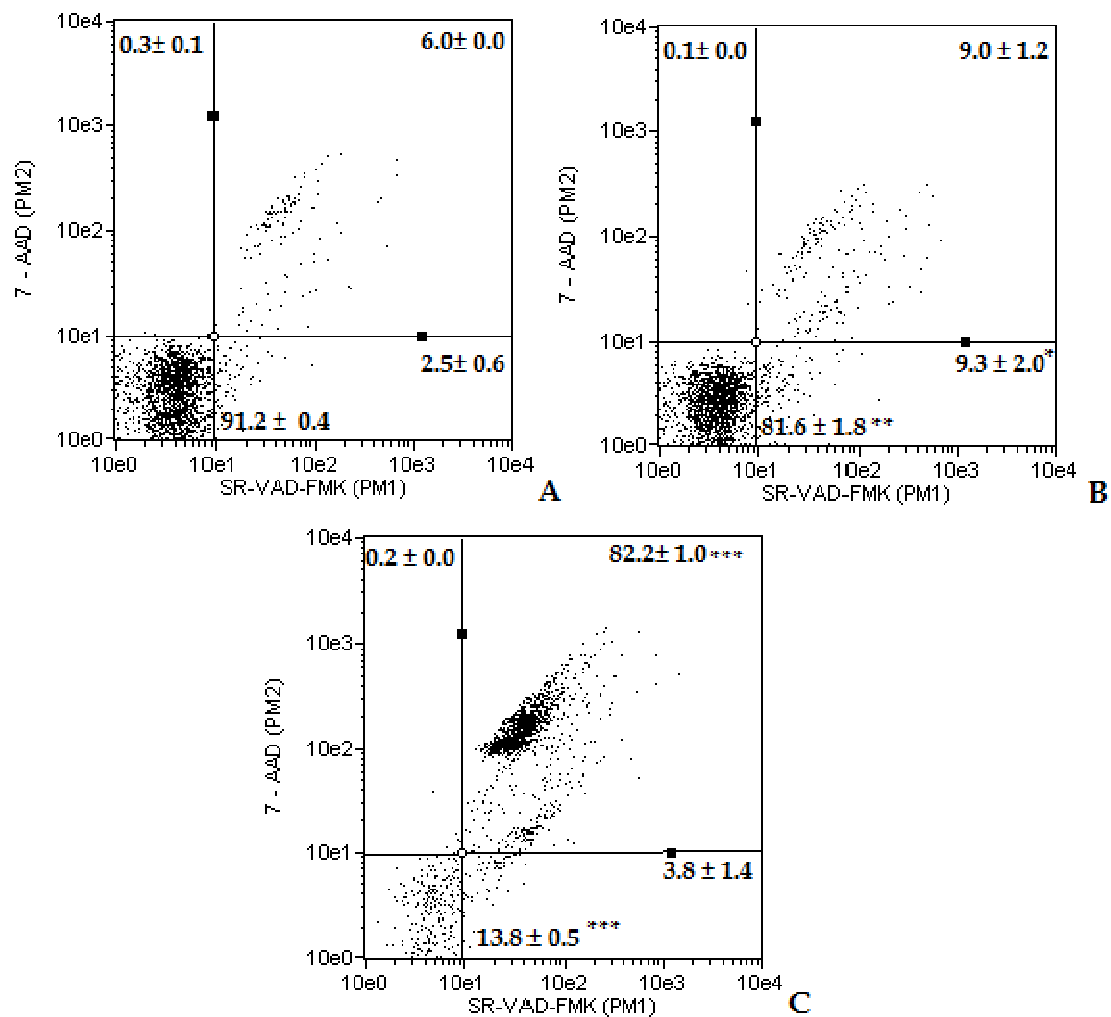
Diferentemente do observado para 786-0, o eupomatenóide-5 na concentração de 17 μ M elevou o número de células da linhagem MCF-7 marcadas apenas com SR-VAD-FMK (de 2,5% para 9,3%) e na concentração de 51 μ M elevou significativamente o número de células duplamente marcadas com SR-VAD-FMK e 7AAD (de 6,0% para 82,2%, Figura 27). Esses dados corroboram com o resultado obtido por meio da marcação da fosfatidilserina pela anexina-V (Figuras 24 e 25) e evidenciam a ação do eupomatenóide-5 sobre as enzimas caspases durante o processo de morte celular das células MCF-7.

Figura 26. Percentuais de células 786-0 marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD.

Os valores indicam a porcentagem de células 786-0 em cada quadrante, após 6h de incubação.

Controle DMSO (A), Eupomatenóide-5 17 µM (B), Eupomatenóide-5 51 µM (C).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 27. Percentuais de células MCF-7 marcadas com SR-VAD-FMK e 7-AAD.

Os valores indicam a porcentagem de células MCF-7 em cada quadrante, após 6h de incubação.

Controle DMSO (A), Eupomatenóide-5 17 μ M (B), Eupomatenóide-5 51 μ M (C).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

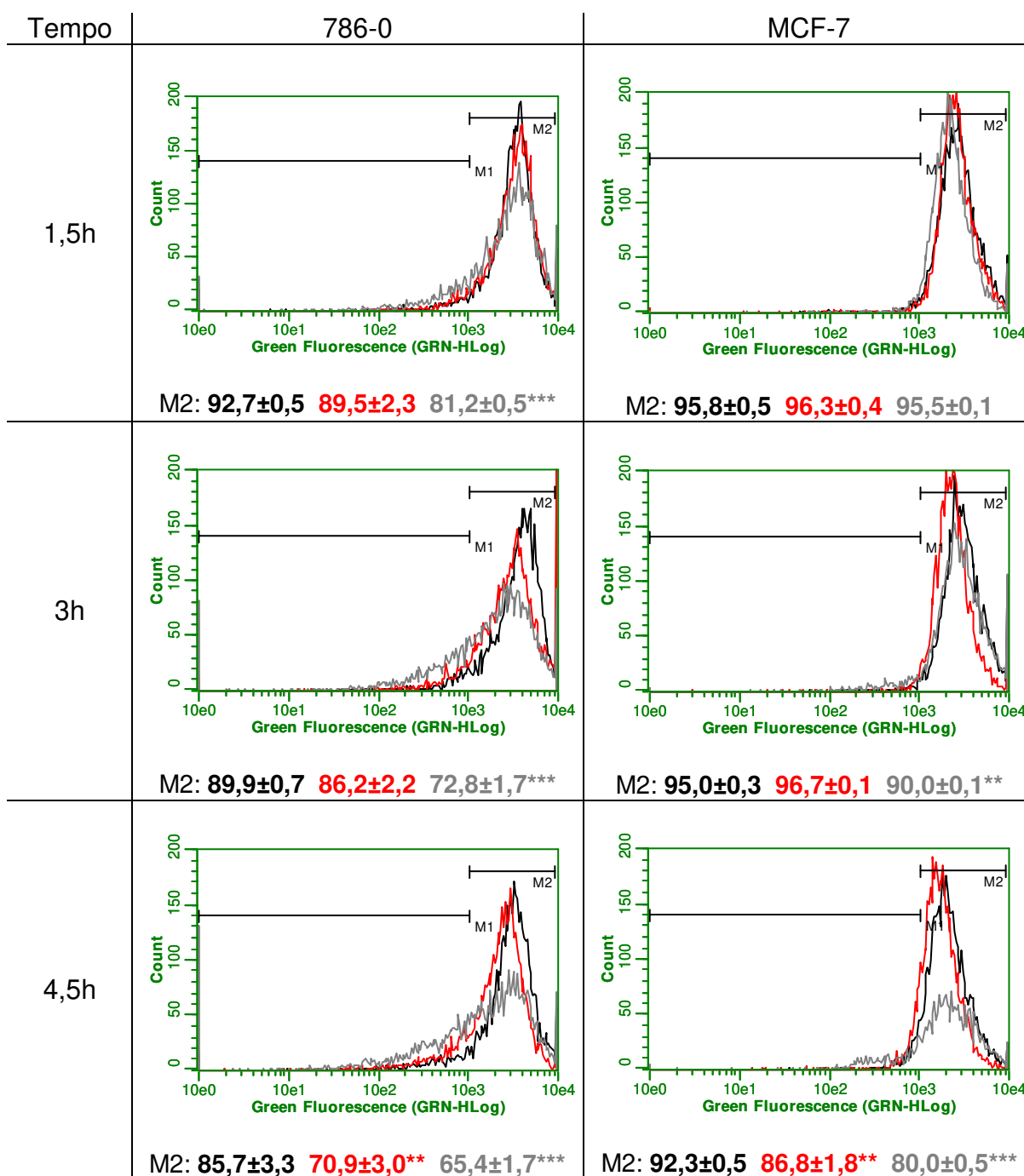
2.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Neste ensaio, a perda da intensidade da fluorescência verde reflete a perda de potencial de membrana mitocondrial e despolarização de membrana, com consequente saída do conteúdo de rodamina-123 de dentro da mitocôndria, baseado na capacidade que esta organela tem em sequestrar este corante (PETIT, 1992).

De acordo com a Figura 28 é possível afirmar que o tratamento com eupomatenóide-5 levou à perda do potencial mitocondrial em ambas as linhagens e a intensidade da perda foi concentração e tempo-dependentes. Após 4,5h de tratamento com a maior concentração de eupomatenóide-5 (51 μ M), o percentual de células com elevada intensidade de fluorescência (10^4) caiu de 85,7% para 65,4% em células da linhagem 786-0 e de 92,3% para 80,0% em células da linhagem MCF-7.

A perda de potencial foi mais intensa no caso da linhagem 786-0. Após 1,5h de tratamento o percentual de células com elevada intensidade de fluorescência (10^4) já havia reduzido de 92,7% para 81,2%. No caso da MCF-7, é possível notar um gradual aumento da perda de potencial de membrana ao longo dos tempos de tratamento com eupomatenóide-5.

Figura 28. Histogramas representativos do conteúdo de rodamina-123 (M2) em células 786-0 e MCF-7 em relação ao tempo de incubação.



Células no gate M2 apresentam fluorescência entre 10^3 e 10^4 , referente ao conteúdo de rodamina-123 intracelular. Os valores referem-se, respectivamente: **Controle**, **Eup-5 17 μ M** e **Eup-5 51 μ M**.

p<0,01, *p<0,001 (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

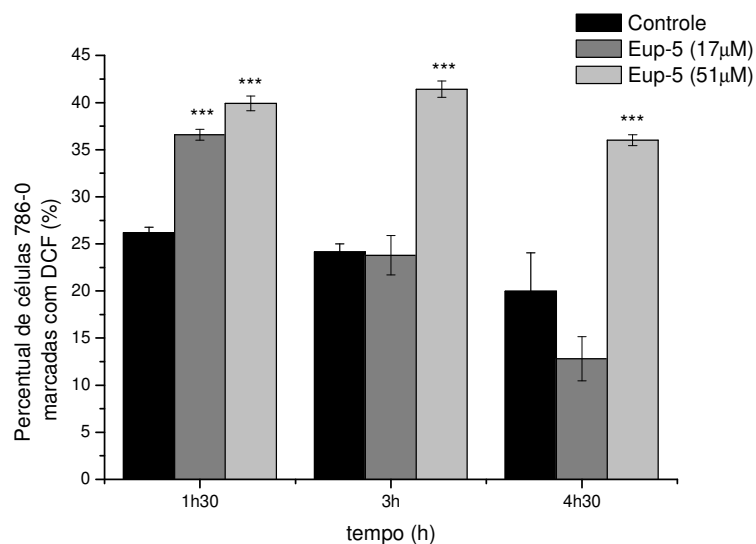
Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Muitos quimoterápicos induzem a morte celular em linhagens tumorais em parte por promoverem um aumento da produção de ROS intracelular (KIM *et. al.*, 2011b). Com o intuito de determinar se a morte celular induzida pelo tratamento das células 786-0 e MCF-7 estaria, em parte, relacionada à produção de ROS, a quantidade de peróxido de hidrogênio foi mensurada com auxílio de uma sonda fluorescente (DCF) em três tempos distintos.

Os gráficos das Figuras 29 e 30 mostram o percentual de células das linhagens 786-0 e MCF-7, respectivamente, com intensidade de fluorescência entre 10^3 e 10^4 , consideradas positivas para a marcação com a sonda DCF. De acordo com esses gráficos, o tratamento das células 786-0 e MCF-7 com 51 μ M de eupomatenóide-5 elevou a concentração intracelular de ROS em relação ao controle negativo já no primeiro tempo avaliado, sendo mais discrepante este aumento após 3h de tratamento, elevando o número de células com fluorescência de 24,14% para 41,43% em 786-0 e de 3,98% para 12,90% em MCF-7.

Figura 29. Percentual de células 786-0 marcadas com a sonda DCF ao longo do tempo de incubação.

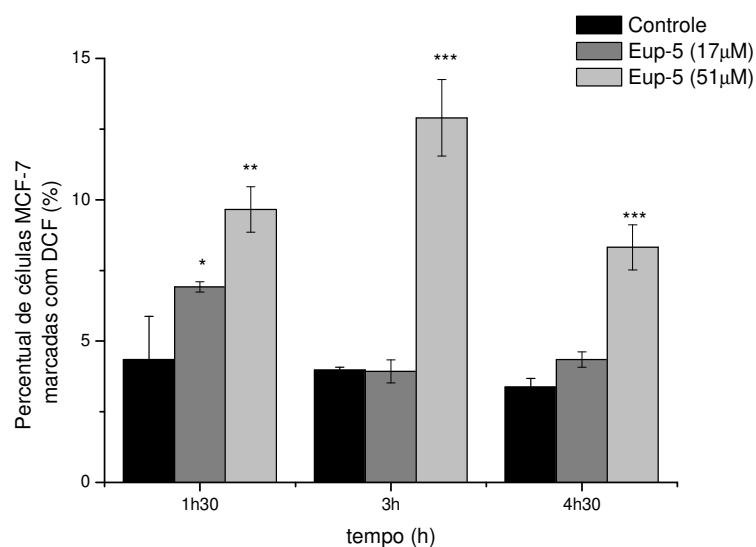


Marcação com sonda DCF está diretamente relacionada à quantidade de peróxido de hidrogeno intracelular.

*** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 30. Percentual de células MCF-7 marcadas com a sonda DCF ao longo do tempo de incubação.



Marcação com sonda DCF está diretamente relacionada à quantidade de peróxido de hidrogeno intracelular.

** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

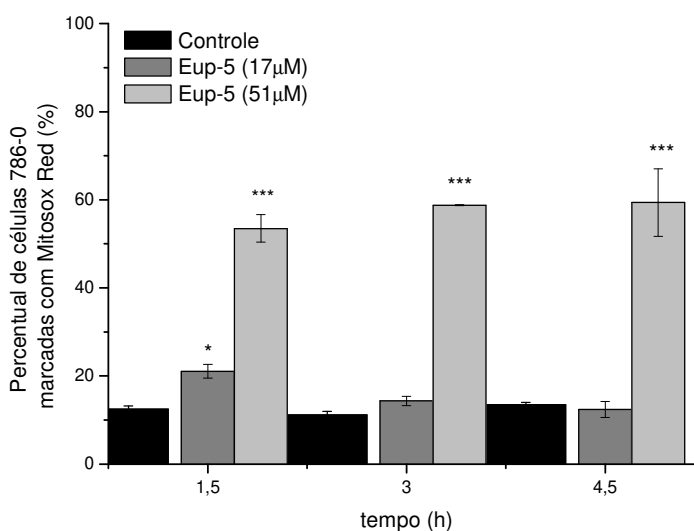
Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8 Produção de ânions superóxido (O_2^-)

A fim de complementar o estudo relacionado à produção de ROS, a quantidade de ânions superóxido foi mensurada com auxílio de uma sonda fluorescente (Mitosox Red) em três tempos distintos.

Os gráficos das Figuras 31 e 32 mostram o percentual de células das linhagens 786-0 e MCF-7, respectivamente, com intensidade de fluorescência entre 10^3 e 10^4 , consideradas positivas para a marcação com a sonda Mitosox Red. De acordo com esses gráficos, o tratamento das células 786-0 e MCF-7 com 51 μ M de eupomatenóide-5 elevou a concentração intracelular de ânions superóxido em relação ao controle negativo já no primeiro tempo avaliado. Após 4,5h de tratamento com 51 μ M de eupomatenóide-5, o número de células com fluorescência aumentou de 13,46% para 59,37% em 786-0 e de 12,24% para 85,91% em MCF-7.

Figura 31. Percentual de células 786-0 marcadas com a sonda Mitosox Red ao longo do tempo de incubação.

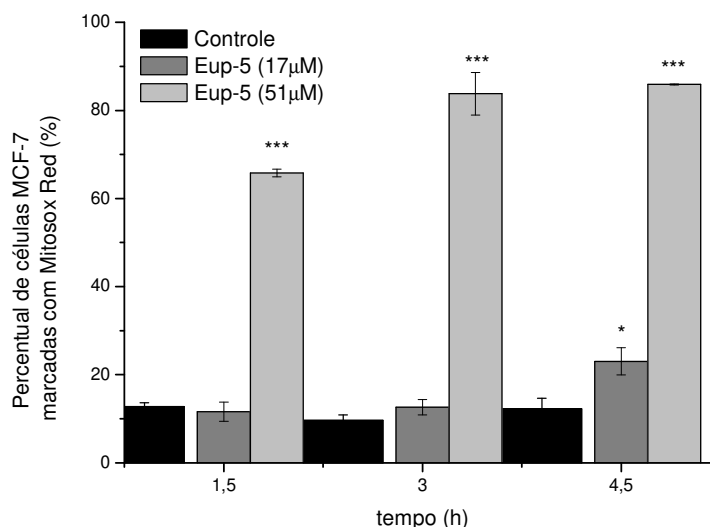


Marcação com Mitosox Red está diretamente relacionada à quantidade de ânions superóxido intracelular.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 32. Percentual de células MCF-7 marcadas com a sonda Mitosox Red ao longo do tempo de incubação.



O percentual de células marcadas com Mitosox Red se refere à quantidade de ânions superóxido.

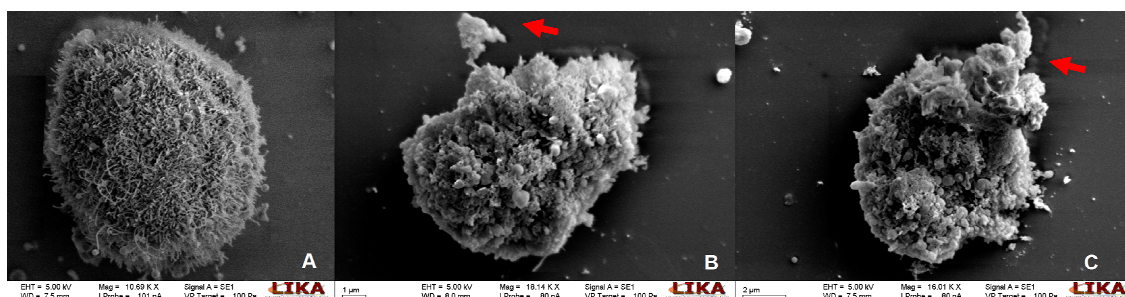
* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.9 Alterações ultramorfológicas das células 786-0 e MCF-7 observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

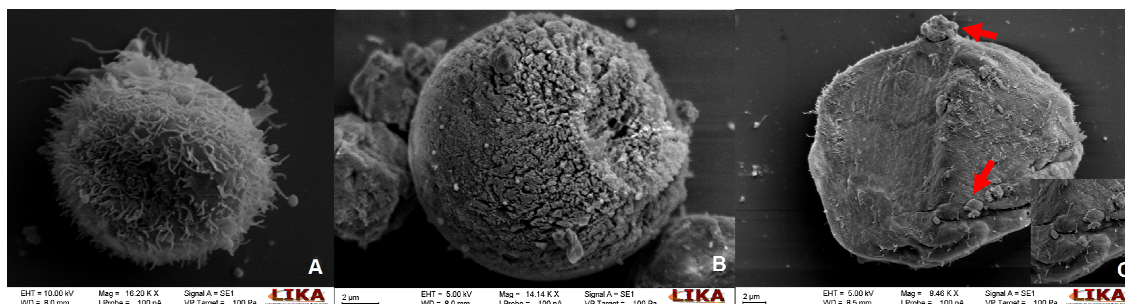
Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura para as células tratadas com 51 μM de eupomatenóide-5 após 6h revelaram, de maneira geral, uma densidade de microvilosidades reduzida. As imagens comprovam que houve extravasamento do conteúdo celular das células 786-0 tratadas, característico de células em processo de necrose (Figura 33) e, no caso das células MCF-7 tratadas, foram observadas alterações morfológicas como arredondamento da célula e fragmentação celular (blebbing da membrana) com evaginação da membrana plasmática, características de células em estágio de apoptose (Figura 34).

Figura 33. Fotoeletromicrografia de varredura do controle de células 786-0 (A) e de células 786-0 expostas a 51 μ M de eupomatenóide-5 por 6 h (B e C).



As setas indicam o conteúdo celular que foi liberado devido ao rompimento da membrana celular.

Figura 34. Fotoeletromicrografia de varredura do controle de células MCF-7 (A) e de células MCF-7 expostas a 51 μ M de eupomatenóide-5 por 6 h (B e C).

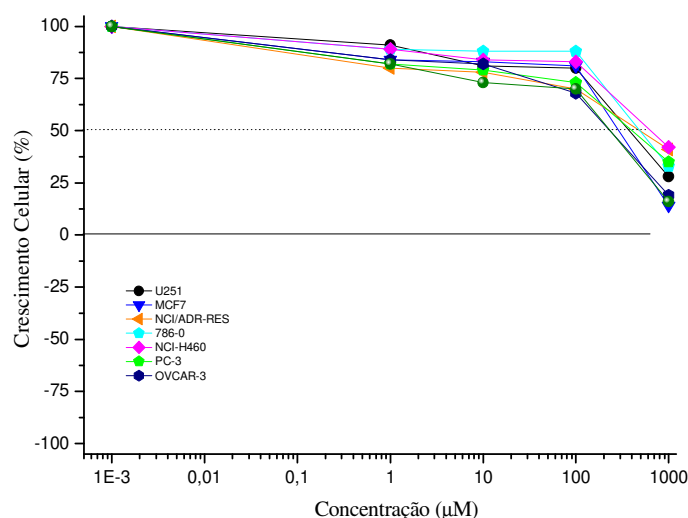


As setas apontam para evaginação da membrana plasmática e a imagem em detalhe evidencia a formação das denominadas “blebs” na membrana plasmática.

3. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO APIOL

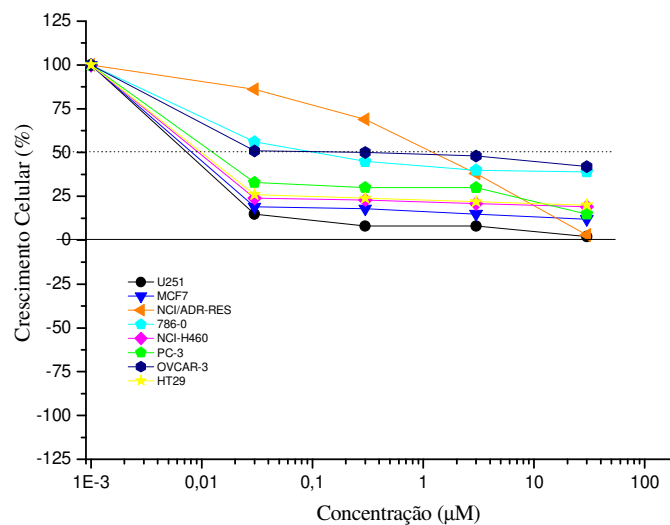
Nas Figuras 35-38 encontram-se os gráficos da atividade antiproliferativa dos compostos e quimioterápicos, relacionando o crescimento celular *versus* a concentração de cada composto, enquanto a Tabela 6 apresenta os valores de GI_{50} (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular) destas amostras.

Figura 35. Gráfico da atividade antiproliferativa do composto apiol em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48h de incubação.



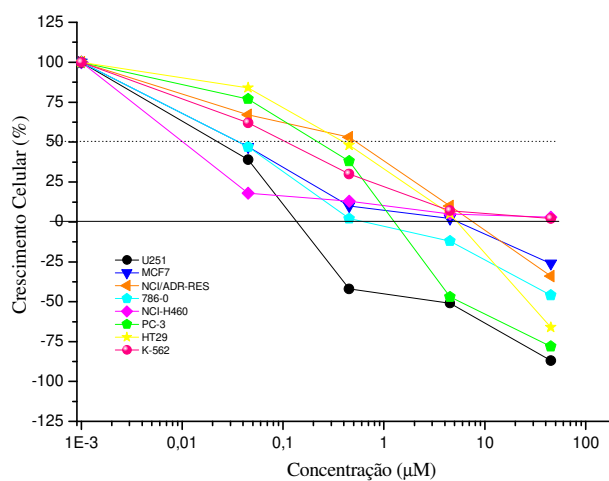
U251 - glioma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário. Concentrações avaliadas: de 1 a 1000 µM.

Figura 36. Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico vincristina em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48h de incubação.



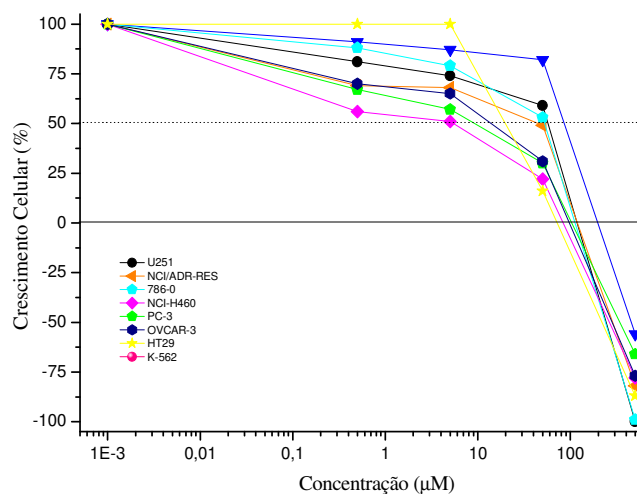
(U251 – glioma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT-29 – cólon). Concentrações avaliadas: de 0,03 a 30 µM.

Figura 37. Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48h de incubação.



U251 – glioma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata e HT-29 - colon. Concentrações avaliadas: de 0,045 a 45 µM.

Figura 38. Gráfico da atividade antiproliferativa do composto verapamil em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48h de incubação.



U251 – glioma, MCF7 – mama, NCI/ADR-RES – ovário resistente a múltiplos fármacos, 786-0 – rim, NCI-H460 – pulmão, PC-3 – próstata, OVCAR-3 – ovário, HT-29 - colon. Concentrações avaliadas: de 0,5 a 500 µM.

Tabela 6. Atividade antiproliferativa^a dos quimioterápicos doxorrubicina e vincristina e dos bloqueadores de canais de cálcio verapamil e apiol em cultura de células tumorais humanas, após 48h de incubação, expressa em GI₅₀^b.

Linhagens	Doxo	Vincristina	Verapamil	Apiol
Glioma (U251)	<0,045	<0,03	52,21	357,63
Mama (MCF7)	0,045	<0,03	59,83	271,69
Ovário resistente (NCI/ADR-RES)	0,27	1,02	49,76	687,63
Rim (786-0)	<0,045	0,59	50,73	529,87
Pulmão (NCI-H460)	0,20	<0,03	1,8	711,04
Próstata (PC-3)	0,20	0,04	4,32	423,26
Ovário (OVCAR-3)	-	1,22	7,52	190,62
Cólon (HT-29)	0,10	<0,03	39,48	-

^a Método colorimétrico - SRB

^b Os valores de GI₅₀ representam a concentração mínima necessária (µM) para inibir 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5[®] (OriginLab Corporation).

- Linhagem em que a amostra não foi avaliada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

De maneira geral, os valores de GI_{50} para o apiol são elevados (Tabela 6), o que demonstra atividade citostática de baixa potência para as linhagens em que este composto foi avaliado. O verapamil, na maior concentração, apresenta atividade citotóxica para todas as linhagens (Figura 38 e Tabela 6). A vincristina apresenta atividade citostática de alta potência com valores baixos de GI_{50} para todas as linhagens (Figura 36 e Tabela 6), sendo as linhagens NCI/ADR-RES e OVCAR-3 as mais resistentes. A doxorrubicina também apresenta valores baixos de GI_{50} para todas as linhagens (Tabela 6), sendo a linhagem NCI/ADR-RES a mais resistente.

A atividade antiproliferativa do apiol em linhagem de adenocarcinoma colorretal (COLO205) tem sido relatada (LIEN *et. al.*, 2011). Embora a sua atividade antiproliferativa não tenha sido promissora, este relato aliado às informações da literatura sobre a atividade bloqueadora de canais de cálcio do apiol (NEUHAUS-CARLISLE, VIERLING e WAGNER, 1997) e a capacidade dos bloqueadores clássicos (fenilaquilaminas e di-hidropiridinas) em reverter o processo de resistência às drogas antitumorais (CHIU *et. al.*, 2010) estimularam o desenvolvimento de metodologia para avaliar a associação entre apiol e os quimioterápicos doxorrubicina e vincristina em linhagens tumorais com ou sem resistência a múltiplas drogas.

3.1 Associação entre apiol e doxorrubicina em NCI/ADR-RES

Os valores de GI_{50} (Tabela 7) obtidos demonstram que o apiol na concentração de 1 mM aumentou a atividade específica da doxorrubicina em 100 vezes. De forma similar, 100 μ M de apiol aumentou essa atividade em 10 vezes, comprovando a reversão da resistência à doxorrubicina. A menor concentração de apiol (10 μ M) não reverteu a resistência, demonstrando uma clara correlação entre concentração e efeito.

Tabela 7. Atividade antiproliferativa^a do apiol, da doxorubicina e da associação entre eles em linhagem de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação, expressa em GI₅₀^b.

Apiol	Doxo	Apiol 1mM + Doxo	Apiol µM + Doxo	Apiol 10µM + Doxo
436,52 ± 27,38***	4,63 ± 0,61	<0,045***	0,55 ± 0,28**	5,85 ± 1,60

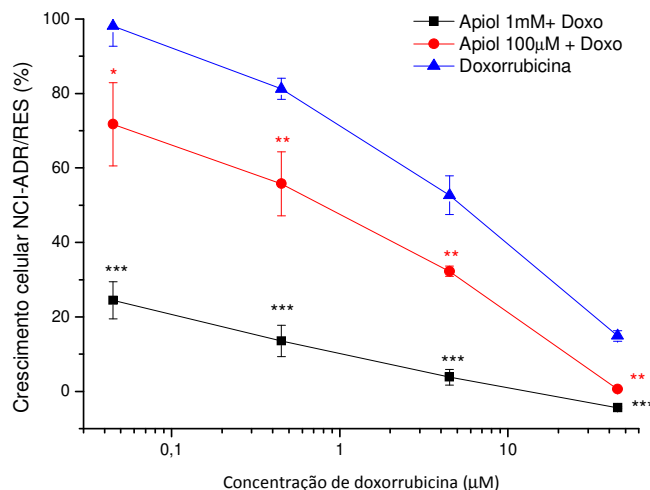
^a Método colorimétrico - SRB

^b Os valores de GI₅₀ representam a concentração mínima necessária (µM) para inibir 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). 10 a 1000 µM para o composto apiol e 0,045 a 45 µM para doxorubicina. *p<0,05, **p<0,01 (em relação ao quimioterápico). Teste de Tukey (ANOVA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

O DRI da associação entre apiol na concentração de 1 mM e doxorubicina foi de 102,88, ao passo que o DRI da associação de 100 µM de apiol e a doxorubicina foi de 8,41, ambos maiores que 1, o que evidencia efeito sinérgico. Já a concentração de 10 µM de apiol não aumentou a atividade específica da doxorubicina, com DRI de 0.79.

De acordo com os resultados obtidos, o gráfico da Figura 39 foi construído, considerando as 2 maiores concentrações de apiol utilizadas: 1 mM e 100 µM em conjunto com as 4 concentrações de doxorubicina. Além disso, um isoblograma foi confeccionado para avaliar a resposta do tratamento conjunto entre apiol e doxorubicina. De acordo com a curva obtida, pode-se afirmar que a resposta foi sinérgica (Figura 40).

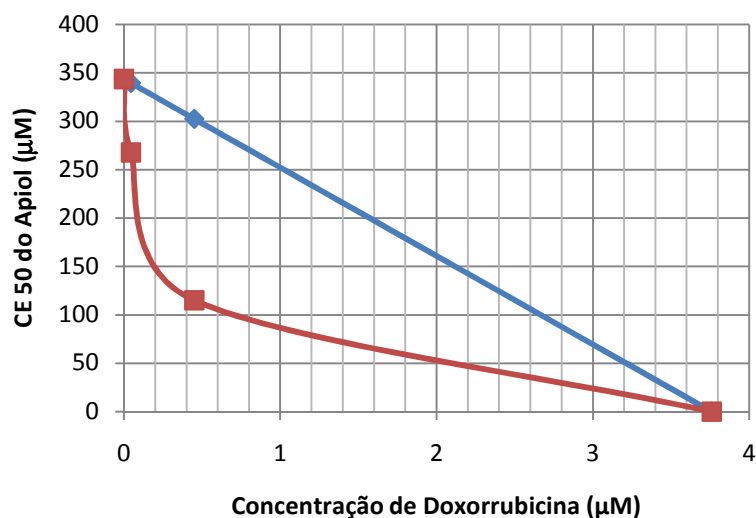
Figura 39. Efeito da associação entre apiol (1 mM e 100 μ M) e doxorrubicina sobre o crescimento celular da linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação.



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação à doxorrubicina). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 40. Isobolograma da associação entre apiol e doxorrubicina em linhagem NCI-ADR/RES, após 48h de incubação.



Isobolograma relacionando a CE50 do Apio (concentração efetiva para se obter 50% da resposta esperada) e a concentração de doxo (μ M). A curva em azul é a isobole e a curva em vermelho representa o tratamento conjunto entre Apio e doxorrubicina.

3.2 Associação entre apiol e vincristina em NCI/ADR-RES

Os valores obtidos e expressos na Tabela 8 demonstram que o apiol nas concentrações de 50 e 100 μM aumentou a atividade específica da vincristina, diminuindo o GI_{50} de 4,71 μM para 0,75 e 2,70 μM , respectivamente, comprovando a reversão da resistência a este quimioterápico. A menor concentração de apiol utilizada (25 μM) não conseguiu reverter a resistência ($\text{GI}_{50} = 4,90 \mu\text{M}$), demonstrando uma clara correlação entre concentração e efeito.

O DRI da associação entre apiol na concentração de 100 μM e a vincristina foi de 6.27, ao passo que o DRI da associação entre apiol na concentração de 50 μM e a vincristina foi de 1,75, ambos maiores que 1, evidenciando sinergismo. Como esperado, o DRI da associação entre apiol na concentração de 25 μM e a vincristina foi menor que 1.

A Figura 41 demonstra esses efeitos, considerando as duas maiores concentrações de apiol testadas: 50 e 100 μM e a curva do quimioterápico vincristina. Pode-se observar que o apiol na maior concentração potencializou o efeito da vincristina nas concentrações menores. Nas concentrações mais elevadas de vincristina o apiol não produziu efeito adicional, provavelmente pelo quimioterápico estar nas concentrações que produzem efeito máximo. Um isoblograma foi confeccionado para avaliar a resposta do tratamento conjunto entre apiol e vincristina. De acordo com a curva obtida (Figura 42), pode-se afirmar que a resposta foi sinérgica.

Tabela 8. Atividade antiproliferativa^a da vincristina, do apiol e da associação entre eles em células tumorais humanas (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação, expressa em GI₅₀^b.

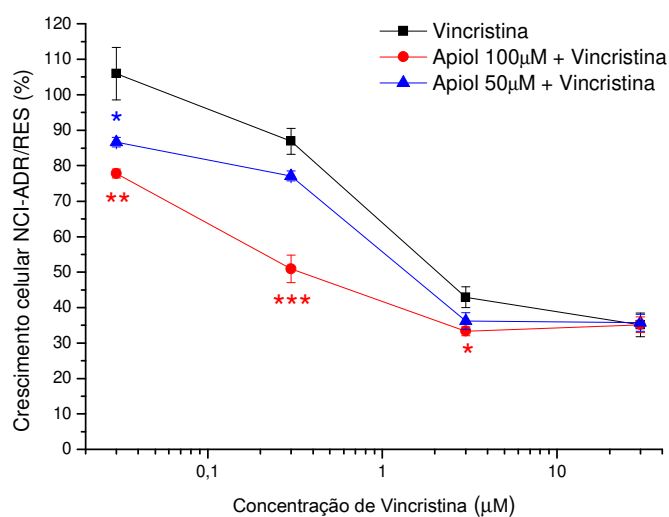
Apiol	Vincristina	Apiol 100 µM + Vincristina	Apiol 50 µM + Vincristina	Apiol 25 µM + Vincristina
>100***	4,71 ± 1,14	0,75 ± 0,08**	2,70 ± 0,21*	4,90 ± 0,77

^a Método colorimétrico – SRB

^b Os valores de GI₅₀ representam a concentração mínima necessária (µM) para inibir 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). Concentrações avaliadas: 25 a 100 µM para o composto apiol e 0,03 a 30 µM para vincristina. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (em relação ao quimioterápico). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

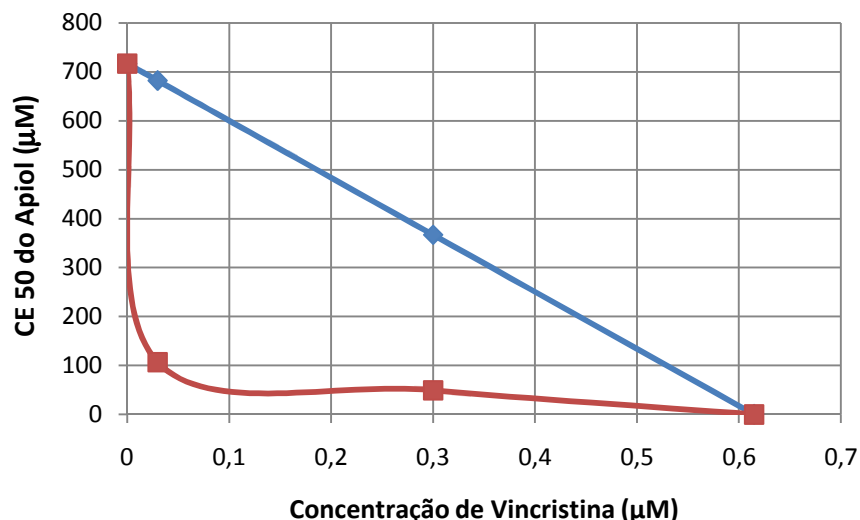
Figura 41. Efeito da associação entre apiol e vincristina sobre o crescimento celular da linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação.



*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (em relação à vincristina). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 42. Isoblograma da associação entre apiol e vincristina em linhagem NCI-ADR/RES, após 48h de incubação.



Isoblograma relacionando a CE50 do apiol (concentração efetiva para se obter 50% da resposta esperada) e a concentração de vincristina (µM). A curva em azul é a isobole e a curva em vermelho representa o tratamento conjunto entre apiol e vincristina.

3.3 Associação entre verapamil e vincristina em NCI/ADR-RES

Com o intuito de comparar a atividade do apiol com um modulador da reversão à resistência, um teste de associação entre o verapamil e a vincristina foi realizado, da mesma forma como descrito acima.

Os valores obtidos e expressos na Tabela 9 demonstram que o verapamil aumentou a atividade específica da vincristina, reduzindo o GI₅₀ de 4,98 µM para um valor abaixo da concentração de 0,03 µM, sem correlação entre concentração e efeito. O DRI da associação entre verapamil e vincristina foi de 164, o que significa que nas concentrações de 25, 50 e 100 µM de verapamil avaliadas, a concentração da vincristina pode ser reduzida em 164 e, ainda assim, promover efeito sinérgico.

Tabela 9. Atividade antiproliferativa^a da vincristina, do verapamil e da sua associação em cultura de células tumorais humanas (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação, expressa em GI_{50} ^b.

Verapamil	Vincristina	Verapamil 100 μ M + Vincristina	Verapamil 50 μ M + Vincristina	Verapamil 25 μ M + Vincristina
>100***	4,98 $\pm$ 0,56	<0,03***	<0,03***	<0,03***

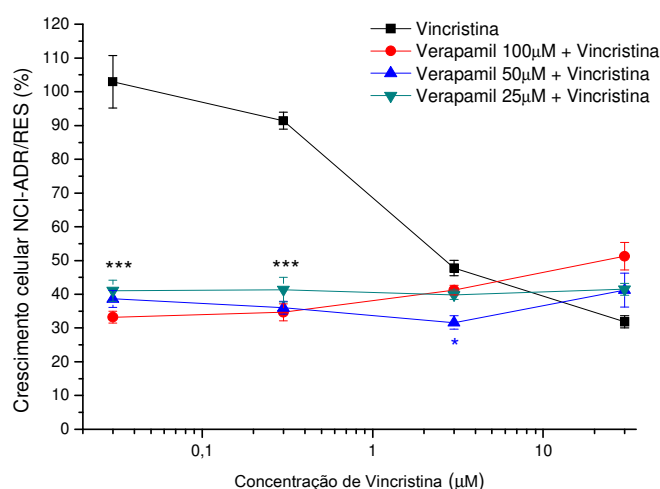
^a Método colorimétrico – SRB

^b Os valores de GI_{50} representam a concentração mínima necessária (μ M) para inibir 50% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5® (OriginLab Corporation). Concentrações avaliadas: 25 a 100 μ M para o composto verapamil e 0.03 a 30 μ M para vincristina. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (em relação ao quimioterápico). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Figura 43 demonstra também que o verapamil consegue aumentar a atividade específica das baixas concentrações de vincristina. Como observado com o apiol, o verapamil também não aumentou a atividade das concentrações maiores de vincristina.

Figura 43. Efeito da associação entre verapamil e vincristina sobre o crescimento celular da linhagem tumoral de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), após 48h de incubação.



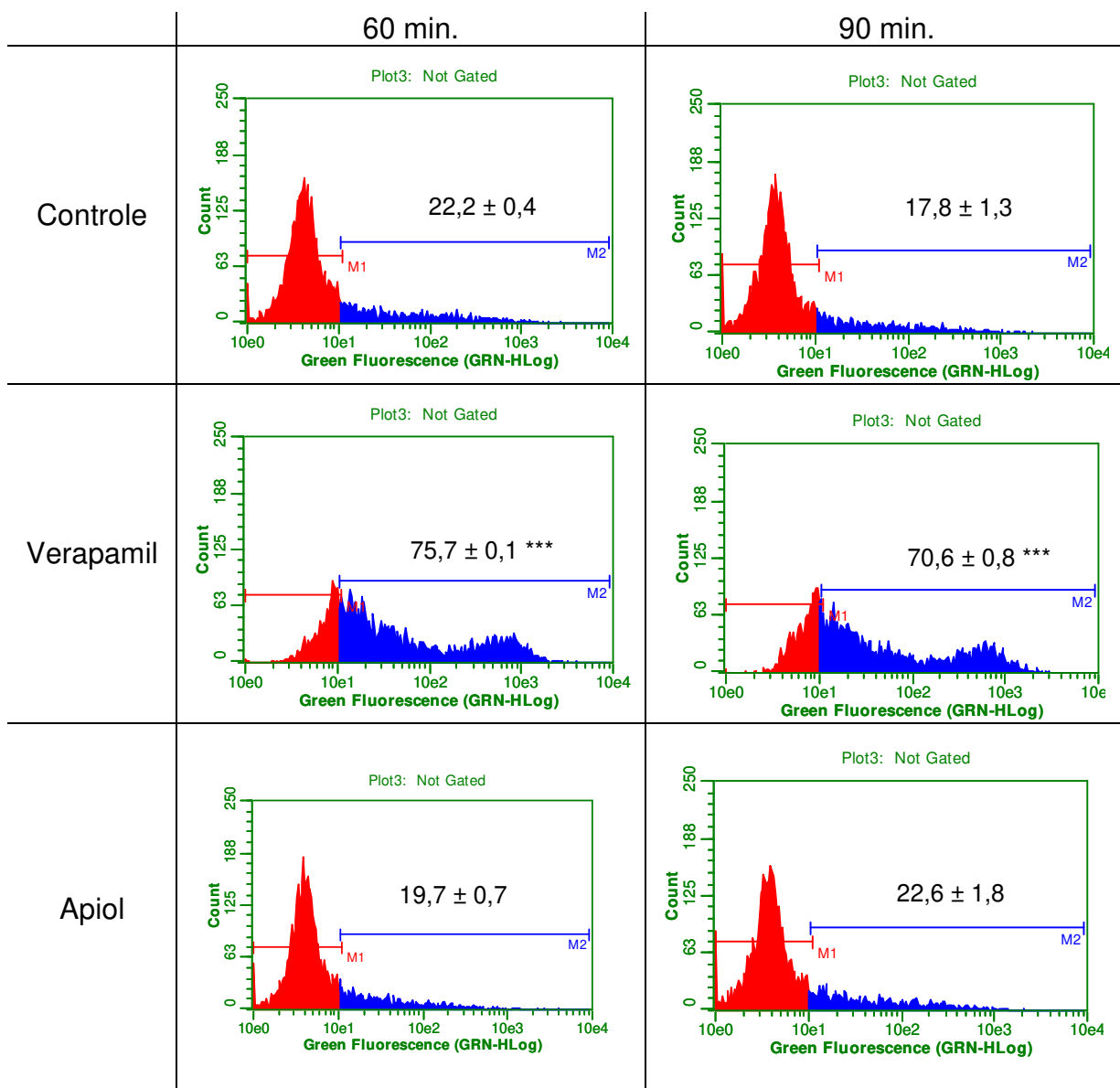
* p <0,05, *** p <0,001 (em relação à vincristina). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Teste do efluxo de rodamina-123 intracelular por meio da glicoproteína-P (P-gp)

De acordo com a Figura 44, o tratamento com verapamil, na concentração de 10 μ M, foi capaz de reter a rodamina no interior celular, em virtude do elevado número de células com fluorescência entre 10^1 e 10^3 . Após 60 e 90 minutos de tratamento, 75,7 e 70,6%, respectivamente, das células tratadas com verapamil continham rodamina em seu interior, ao passo que o apiol, na concentração de 100 μ M, reteve a rodamina em apenas 19,7 e 22,6% das células, respectivamente, ao longo deste período. Na ausência de verapamil e considerando os mesmos tempos, apenas 22,2 e 17,8% das células sem tratamento estavam nesta faixa de fluorescência, evidenciando uma ação da P-gp em bombear a rodamina para fora da célula. Nas condições avaliadas, pode-se afirmar que o apiol não inibiu a ação desta proteína.

Figura 44. Histograma da fluorescência de rodamina intracelular em função do número de células NCI/ADR-RES em diferentes tempos de exposição ao tratamento.



Células no gate M2 (azul) apresentam fluorescência entre 10^1 e 10^4 , referente ao conteúdo de rodamina-123 intracelular. *** $p < 0,001$ (em relação ao controle negativo). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 Associação entre apiol e quimioterápicos em OVCAR-3

Os valores obtidos e expressos na Tabela 10 demonstram que a concentração de 100 μM de apiol aumentou tanto a atividade específica da doxorubicina quanto da vincristina em células da linhagem OVCAR-3.

O DRI da associação entre apiol e doxorubicina foi de 2,5, ou seja, a concentração da doxorubicina pode ser 2,5 vezes reduzida quando associada com 100 μM de apiol e promover o mesmo resultado de quando administrada isoladamente. O DRI da associação entre apiol e vincristina foi de 15, ou seja, a concentração da vincristina pode ser 15 vezes reduzida quando associada com 100 μM de apiol e promover o mesmo resultado de quando administrada isoladamente. Com os resultados obtidos, o gráfico da Figura 45 foi elaborado.

Tabela 10. Atividade antiproliferativa^a dos quimioterápicos doxorubicina e vincristina e da associação com o composto apiol em cultura de células tumorais humanas (OVCAR-3), após 48h de incubação, expressa em TGI^b.

Doxorrubicina	Apiol 100 μM + Doxorrubicina	Vincristina	Apiol 100 μM + Vincristina
6,10 $\pm$ 0,87	2,29 $\pm$ 0,22**	6,32 $\pm$ 0,91	0,42 $\pm$ 0,27***

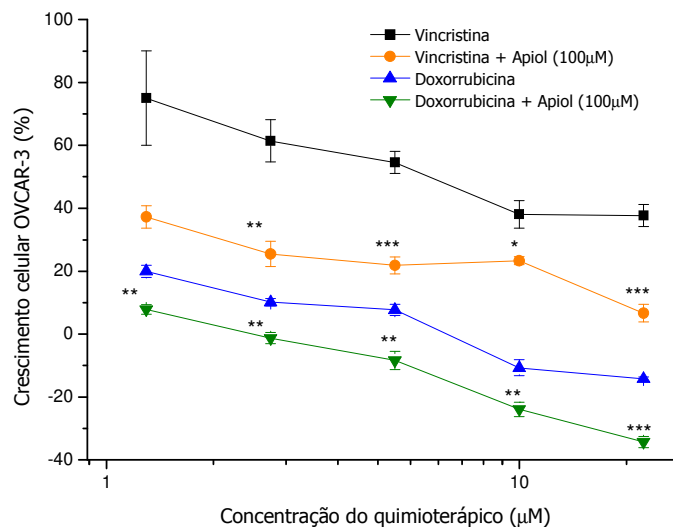
^a Método colorimétrico – SRB

^b Os valores de TGI representam a concentração mínima necessária (μM) para inibir 100% do crescimento celular. Os valores foram determinados através de análise de regressão não-linear usando o ORIGIN 7.5[®] (OriginLab Corporation). Concentrações avaliadas: 1,25 a 20 μM para os quimioterápicos.

**p<0,01 (em relação aos quimioterápicos). Teste de Tukey (ANOVA).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 45. Efeito da associação entre os quimioterápicos doxorubicina e vincristina associados a 100 μ M de apiol sobre o crescimento celular da linhagem tumoral de ovário (OVCAR-3), após 48h de incubação.



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em relação aos quimioterápicos). Teste de Tukey (ANOVA).

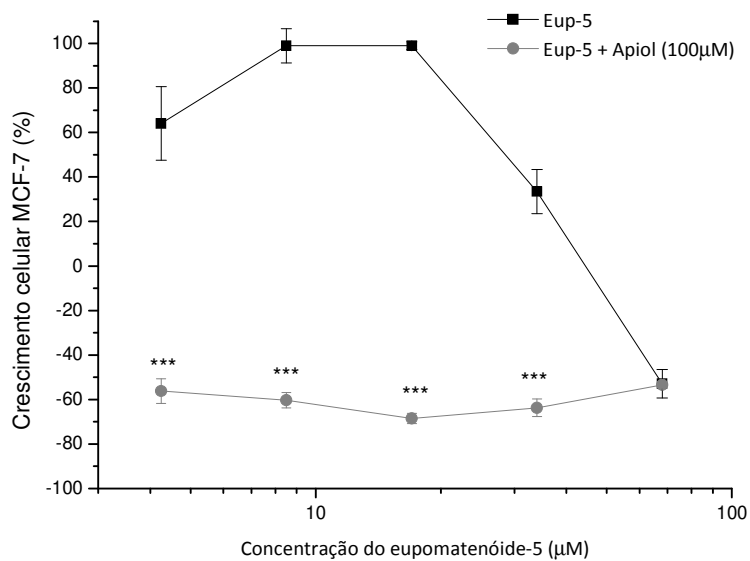
Os experimentos foram realizados em triplicata.

4. ASSOCIAÇÃO ENTRE EUPOMATENÓIDE-5 E APIOL EM MCF-7 E 786-0

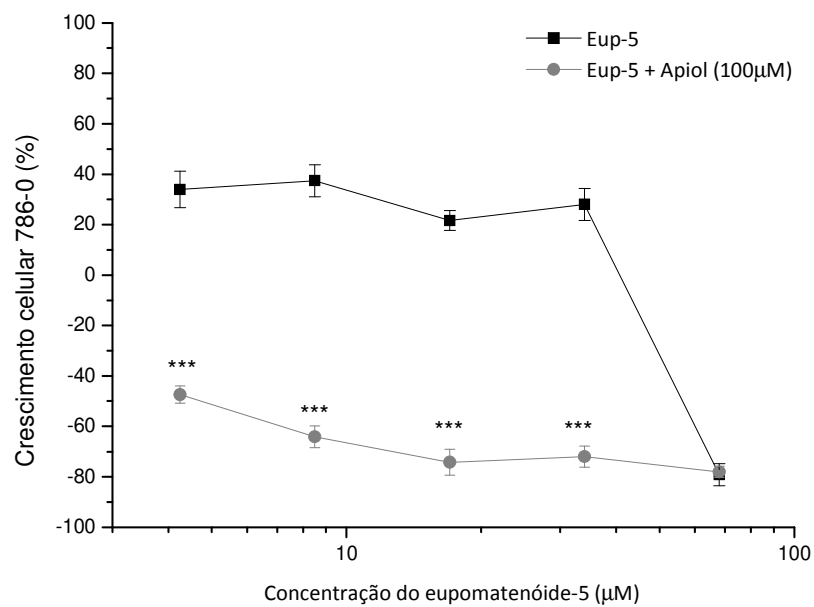
Dentre as linhagens sensíveis ao eupomatenóide-5 (Tabela 11), MCF-7 e 786-0 foram selecionadas para avaliar a associação entre os dois compostos isolados, a fim de identificar uma possível ação de sinergismo.

De acordo com a Figura 46 é possível inferir que o tratamento associado ao apiol (na concentração fixa de 100 μ M) foi capaz de intensificar a atividade antiproliferativa do eupomatenóide-5, tanto em 786-0 quanto em MCF-7, atingindo o efeito máximo já para as concentrações mais baixas de eupomatenóide-5.

Figura 46. Atividade antiproliferativa resultante da associação entre eupomatenóide-5 e apiol em linhagens 786-0 e MCF-7 (**A** e **B**), após 15h de incubação.



A



B

*** $p < 0,001$ (em relação ao eupomatenóide-5). Teste de Tukey (ANOVA).

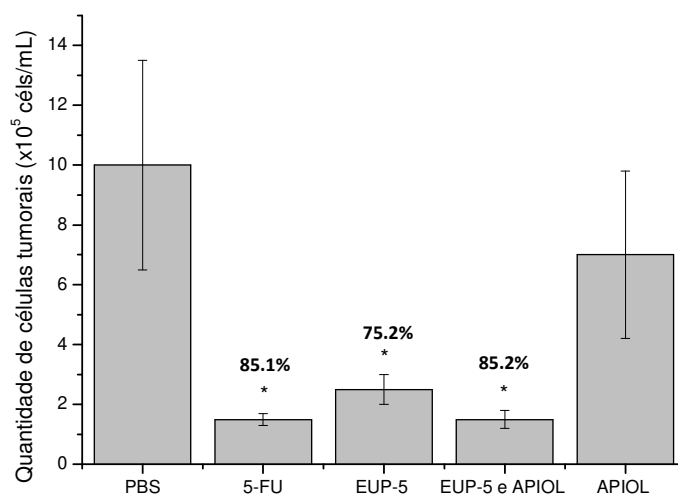
Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* - TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich

O tratamento diário com 10 mg/Kg de eupomatenóide-5 reduziu, ao final de 7 dias, 75,2% da quantidade de células tumorais de Ehrlich presentes no peritônio do animal (Figura 47). Conforme esperado, o tratamento diário com 30 mg/Kg de apiol não reduziu de forma significativa o número de células tumorais; porém, o tratamento conjunto entre apiol e eupomatenóide-5 reduziu em 85,2% o número de células, apresentando uma resposta estatisticamente semelhante a do quimioterápico 5-fluoracil.

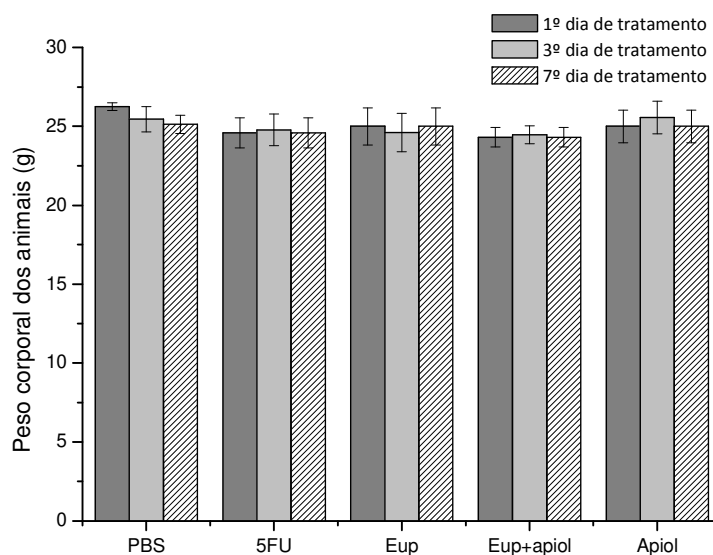
Os animais foram pesados a cada três dias e o gráfico da média de peso corporal dos animais encontra-se na Figura 48. Os animais não perderam peso ao longo do tratamento de uma semana. De acordo com MARIZ *et al.* (2006), alguns dos parâmetros que evidenciam sinais de toxicidade são: piloereção, prostração, contorção abdominal, paralisia do trem posterior, ptose palpebral, dispneia, aumento da evacuação e perda de peso. Nenhum destes sinais foi observado para os animais tratados (Figura 48).

Figura 47. Atividade anticâncer dos compostos eupomatenóide-5 e apiol sobre o tumor ascítico de Ehrlich, após 7 dias de tratamento.



* $p < 0,05$ (em relação ao PBS). Teste de Tukey (ANOVA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 48. Evolução do peso corporal (g) dos animais pelos dias de tratamento.



Os experimentos foram realizados em triplicata.

DISCUSSÃO

Dentre os muitos desafios da medicina, nenhum teve um início tão controverso quanto o da cura para o câncer. Embora o processo neoplásico tenha sido reconhecido há séculos, os conhecimentos sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão tumoral eram escassos até o advento da biologia molecular em meados do século 20 (CHABNER e ROBERTS JR, 2005).

O controle e o tratamento do câncer, a segunda maior causa de morte por doenças nos países em desenvolvimento, têm apontado para a busca de novas diretrizes voltadas para o aprimoramento das terapias anticâncer (SIEGEL, NAISHADHAM, JEMAL, 2013). Fármacos e terapias imunológicas se transformaram no foco dos esforços para a cura do câncer e, desde então, a pesquisa científica tornou-se multidisciplinar e tem trabalhado em conjunto na busca por medicamentos com maior eficácia e baixa toxicidade para o tratamento de tumores (CHABNER e ROBERTS JR, 2005).

As espécies vegetais fazem parte da terapêutica medicamentosa há milhares de anos e a contínua descoberta de novas drogas anticâncer de origem vegetal e microbiológica tem incentivado as pesquisas nessa área (CRAGG e NEWMAN, 2013; MALHOTRA e SINGH, 2009). O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo (PARMAR, 1997) possuindo uma diversidade enorme de princípios ativos com diversos efeitos farmacológicos, entre eles os antitumorais (MARQUES *et al.*, 2013; WIDOWATI *et al.*, 2013)

Dentre as espécies do gênero *Piper*, a *Piper regnellii* é uma planta herbácea conhecida popularmente como caapeba e pariparoba (CORRÊA, 1984). As folhas e raízes são usadas na forma de extratos, infusões ou emplastros para o tratamento de feridas, redução de inchaços, irritações na pele e infecções (SCHIMIDT *et al.*, 2009). A triagem *in vitro* de extratos dessa espécie revelou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico obtido das folhas (KOROISHI *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2007).

Durante o desenvolvimento do projeto de mestrado, foi possível verificar que o extrato bruto diclorometânico (EBD) da *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* produziu efeito antiproliferativo em cultura de células tumorais humanas (LONGATO, 2010). Deste EBD foi isolado o composto eupomatenóide-5, que reproduziu o efeito antiproliferativo *in vitro* de seu extrato, apresentando valores de TGI baixos para a maioria das linhagens, dentre elas, 786-0 (rim) e MCF-7 (mama). Os efeitos observados *in vitro* foram comprovados em modelo *in vivo* de tumor sólido de Ehrlich, sendo que a dose de 30 mg/Kg reduziu o tumor em 30,4% (LONGATO *et. al.*, 2011).

O composto eupomatenóide-5 pertence à classes das neolignananas e, dentre as lignananas conhecidas, pode-se citar a podofilotoxina, cujos derivados Etoposídeo e teniposido são inibidores da topoisomerase II, enzima nuclear essencial para a sobrevivência da célula, sendo, portanto, ferramentas importantes na quimioterapia do câncer (NITISS, 2009; WINK *et. al.*, 2005)

Por pertencerem à mesma classe de compostos, a atividade antiproliferativa *in vitro* do eupomatenóide-5 foi comparada à do quimioterápico etoposídeo (Figura 16). O tratamento associado entre o composto isolado e o quimioterápico não promoveu sinergismo por adição, tampouco sinergismo por potenciação (Figura 17), permitindo inferir a hipótese de que ambos poderiam estar competindo pelo mesmo sítio de ligação. Este fato, aliado ao conhecimento do mecanismo de ação do etoposídeo, direcionou os estudos para a avaliação da atividade do eupomatenóide-5 sobre as enzimas topo I e II.

O eupomatenóide-5 não inibiu a atividade da topo I, fato que pôde ser comprovado pelo estado topológico relaxado do DNA após tratamento com este composto; porém, assim como o etoposídeo, inibiu a atividade da topo II, mantendo o DNA superenovelado (Figuras 18 e 19).

A análise do ciclo celular é um passo importante para a compreensão das vias de ativação e proliferação das células, sendo necessário o conhecimento de suas fases

(ALVES e GUIMARÃES, 2010). Como o etoposídeo inibe a topoisomerase II, agindo principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular (GONZÁLEZ-SARRÍAS *et. al.*, 2013; WALSBY *et. al.*, 2011), estudos envolvendo a quantificação de células nas fases do ciclo celular, após tratamento com eupomatenóide-5, foram realizados a fim de elucidar melhor seu mecanismo de ação.

Diferentemente do esperado, o eupomatenóide-5 nas concentrações avaliadas (12,5 e 25 μ M) não elevou o número de células 786-0 e MCF-7 nas fases S e G2/M, demonstrando, portanto, que a atividade antiproliferativa observada para estas linhagens não estava relacionada à parada do ciclo celular nestas fases (Figuras 20 e 21). Quando incubado diretamente em meio tamponado contendo apenas DNA e a enzima topoisomerase II, o eupomatenóide-5 inibiu a atividade catalítica da enzima; entretanto, este resultado não foi reproduzido quando a atividade do eupomatenóide-5 foi analisada indiretamente em meio contendo as células das linhagens MCF-7 e 786-0, uma vez que não houve aumento de população nas fases S e G2/M, resultado esperado para um composto com ação topII-bloqueadora. Portanto, o mecanismo de ação do eupomatenóide-5 não estaria relacionado à parada do ciclo celular.

Um resultado deste experimento que chamou a atenção foi o aumento da população de células MCF-7 tratadas com 25 μ M de eupomatenóide-5 em sub-G1 (Figura 21d), o que reflete a fragmentação de DNA, característico de apoptose. De acordo com KAJSTURA e colaboradores (2007), células apoptóticas podem ser identificadas nesta fase devido ao baixo peso molecular dos fragmentos de DNA e, conseqüentemente, menor fluorescência.

A importância da apoptose na regulação da homeostase celular tem guiado o desenvolvimento de estudos apurados capazes de avaliar este processo. Os estudos com citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular induzido por drogas antiproliferativas têm sido particularmente úteis, porque são testes rápidos e quantitativos.

A natureza multiparamétrica da citometria de fluxo também permite a detecção de mais de uma característica de morte celular a ser combinada em um único experimento. Por exemplo, testes que utilizam marcadores de DNA como indicadores da permeabilidade de membrana plasmática podem ser combinados com outros que acessam diferentes respostas celulares associadas com a morte celular, incluindo a ligação da anexina V à fosfatidilserina (TELFORD *et. al.*, 2011).

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para detectar a quantidade total de células induzidas à apoptose pelo tratamento com o eupomatenóide-5. Conforme observado na Figura 22, a concentração de 51 μ M de eupomatenóide-5 em linhagem 786-0 elevou tanto o número de células duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (apoptose tardia) quanto células marcadas apenas com 7-AAD, o que evidencia que, no tempo avaliado, esta concentração foi bastante citotóxica, provocando dano celular sem evidenciar células em estágio inicial de apoptose. A redução do tempo de exposição ao eupomatenóide-5 de 24 para 12h também não identificou estágios iniciais de apoptose nesta linhagem (Figura 23).

Diferentemente, a concentração de 17 μ M de eupomatenóide-5 em linhagem MCF-7 triplicou o número de células em estágio inicial de apoptose e duplicou o número de células em apoptose tardia, sem elevar o número de células marcadas com 7-AAD, após 24h de exposição (Figura 24). Com o intuito de detectar um aumento do estágio inicial de apoptose, a concentração do eupomatenóide-5 foi elevada (51 μ M) e o tempo de exposição ao tratamento foi reduzido para 12h, porém sem sucesso, uma vez que esta concentração provocou apenas aumento de células em estágio tardio de apoptose, bem como células marcadas apenas com 7-AAD (Figura 25).

Estudo recente (GARCIA *et. al.*, 2013) revelou efeitos semelhantes para o eupomatenóide-5 (85 μ M) em espécie de *Leishmania*, com aumento de células duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (37,5% *versus* 4,0% do controle de células),

sem evidenciar células marcadas apenas com 7-AAD e células em estágio inicial de apoptose (marcadas apenas com anexina-V).

A partir desses resultados, urgiu-se a necessidade de verificar se a morte celular observada nos ensaios *in vitro* de atividade antiproliferativa para as linhagens 786-0 e MCF7 estava relacionada à ativação da cascata de caspases, enzimas importantes no processo de apoptose. Para isto, foi utilizado o kit Guava Multicaspase para detecção das caspases ativas, por meio da técnica de citometria de fluxo.

A ativação de caspases, na maioria dos casos, precede a degradação da permeabilidade celular, a fragmentação do DNA, o colapso citoesquelético e a externalização da fosfatidilserina (GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007). A combinação de estudos de ativação de caspase com os responsáveis pela detecção das características tardias de morte celular (como externalização da fosfatidilserina e perda da integridade da membrana) provêm informações importantes sobre o tipo de morte celular. Para o ensaio de detecção de caspases ativas foram consideradas as concentrações de 17 e 51 μM de eupomatenóide-5 e o tempo de tratamento foi reduzido em relação ao considerado para o ensaio de anexina-V para 6h.

O tratamento das células da linhagem MCF-7 com 51 μM de eupomatenóide-5 resultou na ativação das enzimas caspases, fato que pode ser comprovado pelo aumento de células marcadas com o inibidor SR-VAD-FMK (Figura 27). Os resultados obtidos por meio do teste de anexina-V, que revelaram a exposição de fosfatidilserina em células da linhagem MCF-7 tratadas por 12h com 51 μM do composto, aliados aos dados positivos para marcação de caspases ativas com 6h de tratamento, permitem inferir que o composto eupomatenóide-5 induz apoptose nas células desta linhagem.

A indução de apoptose pelas drogas anticâncer pode ocorrer pelas vias extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca da apoptose está associada à união de alguns ligantes específicos aos seus receptores de morte correspondentes, presentes na membrana

celular. As duas vias de receptor de morte mais bem compreendidas incluem o receptor Fas e o receptor de morte DR-5, que são acoplados aos ligantes extracelulares Fas e o TRAIL, respectivamente. A ação dos ligantes deflagra a ativação da caspases -8 e -10, que, indiretamente, leva à liberação de citocromo c da mitocôndria e, eventualmente, à apoptose (BORNER e ANDREWS, 2014; SAWAI, 2014).

A via intrínseca, denominada mitocondrial, é independente de receptor e está relacionada com a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, provocada pela translocação de moléculas pró-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 (bax, bak, bcl-Xs) do citoplasma para a mitocôndria e inibição das moléculas antiapoptóticas, causando dano à mitocôndria e liberação do citocromo c para o espaço intermembrana da mitocôndria no citoplasma. O citocromo c, por sua vez, se associa a Apaf-1 e procaspase-9 para formar o complexo denominado apoptossoma, resultando na ativação da caspase-9, que ativa proteolicamente as caspases executoras -3, -6 e -7 (BORNER e ANDREWS, 2014; SAWAI, 2014).

Conforme relatado, a ativação da enzima caspase-3 é extremamente importante para a promoção da apoptose, estando entre as enzimas (juntamente com caspase-6 e -7) que são ativadas após a abertura do poro mitocondrial (KAGAWA *et. al.*, 2001; LIANG, YAN e SCHOR 2001). As células da linhagem MCF-7 perderam a expressão desta enzima, como resultado da deleção do par-de-base 47 dentro do exon 3 do gene *CASP-3*. O que ocorre nesta linhagem é que a redução dos níveis de bcl-2 e o aumento dos níveis de bax permitem a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, com consequente liberação de citocromo c. Este, por sua vez, se associa ao apoptossoma, resultando na ativação da caspase-9, que induz a ativação sequencial das caspases -7 e -6, respectivamente, levando à apoptose nestas células (LIANG, YAN e SCHOR 2001).

A caspase-3 é uma enzima fundamental que participa das alterações apoptóticas nucleares, entretanto esta enzima parece não estar relacionada à morte celular

desencadeada pela superexpressão de Bax, demonstrando que Bax pode mediar apoptose independente da ativação de caspase-3 (KAGAWA *et. al.*, 2001). O mecanismo de ação do composto eupomatenóide-5 em linhagem MCF-7 provavelmente está relacionado à ativação das caspases efetoras -6 e -7 por meio de Bax. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

A liberação do citocromo c está frequentemente associada à inibição da respiração mitocondrial, perda do potencial de membrana e ao estímulo da geração de espécies reativas de oxigênio, que levam ao estresse oxidativo (KIM *et. al.*, 2011b). Com o intuito de investigar se a geração de ROS estaria diretamente associada à apoptose induzida pelo eupomatenóide-5, dois experimentos foram realizados para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio e ânions superóxido, dois membros ROS.

Houve um aumento significativo do conteúdo de ROS intracelular das células MCF-7 tratadas com 51 μ M de eupomatenóide-5 em comparação ao controle negativo, principalmente dos ânions superóxido (Figuras 30 e 32). Pesquisas têm mostrado que ROS pode induzir a apoptose por ativar a via de sinalização de JNK (Jun N-terminal kinases), que pertence à família das MAP-quinases. Estas enzimas exercem papel fundamental na apoptose tanto intrínseca quanto extrínseca. Elas ativam a via da apoptose por regularem fatores de transcrição de genes pró-apoptóticos ou diretamente por modularem as atividades das proteínas pro e anti-apoptóticas através de fosforilações (MA *et. al.*, 2014).

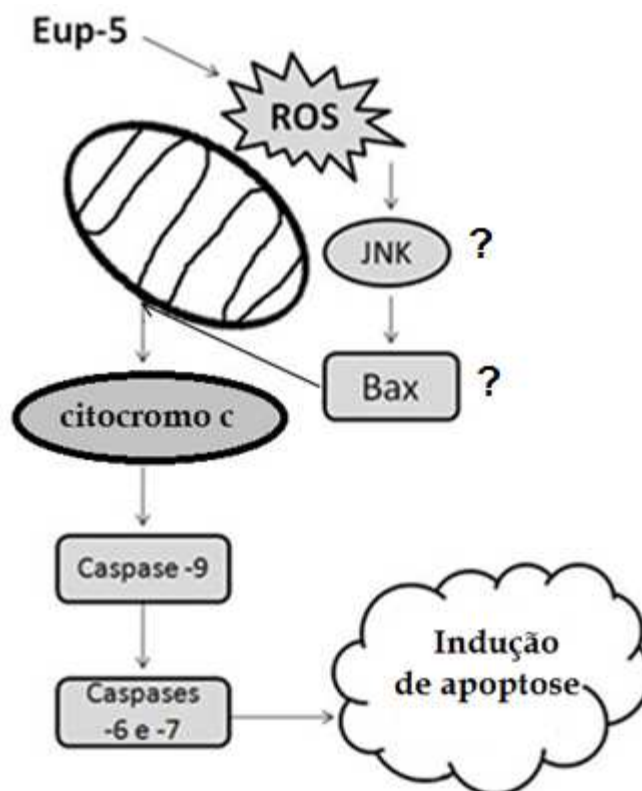
Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 são normalmente encontrados no citosol e quando ativados se translocam para a mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana dessa organela. A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, liberação de citocromo c e ativação das caspases (potencialmente levando à apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando necrose). Essa disputa entre a ativação das caspases e a depleção de ATP irá orientar a morte celular,

seja por apoptose, seja por necrose. Quando o poro de permeabilidade se abre em apenas algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP, a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade é aberto rapidamente e a célula não pode obter energia suficiente a partir da glicólise anaeróbia, a depleção do ATP impede que a apoptose se instale (por ser um processo ativo que requer energia) e a célula morre por necrose (RASOLA e BERNARDI, 2011; PAROLIN e REASON, 2001).

No caso da linhagem MCF-7, é possível notar um gradual aumento da perda de potencial de membrana ao longo dos tempos de tratamento com eupomatenóide-5 (Figura 28). No caso da linhagem 786-0, é possível observar uma perda brusca de potencial de membrana, que já se inicia após 1,5h de tratamento (Figura 28). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos para o teste de anexina-V e de caspase e demonstram claramente que existe um mecanismo de ação diferente para cada linhagem celular.

Considerando os resultados obtidos e previamente discutidos, o mecanismo de ação do eupomatenóide-5 proposto para as células da linhagem MCF-7 é o apresentado na Figura 49.

Figura 49. Esquema proposto para o mecanismo de ação do composto eupomatenóide-5 em células da linhagem MCF-7.



O eupomatenóide-5 provoca aumento dos níveis de ROS intracelular, ativando Bax pela via JNK. A ativação de Bax e a abertura dos poros de transição da permeabilidade mitocondrial, com consequente queda do potencial de membrana, liberam citocromo-c para o citosol, que por sua vez ativa a caspase promotora 9 e as caspases efetoras 6 e 7, culminando em apoptose. Adaptado de Kim *et. al.*, 2011 (b).

A apoptose tem sido estabelecida como um mecanismo de morte celular programado e evolutivamente conservado, entretanto, muitos estudos têm mostrado que este não é o único mecanismo que regula a morte celular. Um outro mecanismo, até pouco tempo atrás considerado como uma forma passiva de morte celular, tem sido bastante considerado. O termo “necroptose” tem sido usado para descrever uma morte celular por necrose controlada, diferenciando-a da necrose acidental.

Durante a necroptose, a exposição de fosfatidilserina coincide com a permeabilização da membrana celular externa. Consequentemente, as células imediatamente passam do quadrante inferior esquerdo (controle de células, duplo negativo) para o quadrante superior direito (duplo positivo), sem passar pelo estágio intermediário (apoptose inicial, anexina-V positivo/7AAD negativo) (KRYSKO *et. al.*, 2008). Diferentemente dos resultados obtidos para MCF-7, os tratamentos da linhagem 786-0 com eupomatenóide-5 não evidenciaram população de células neste quadrante intermediário, mesmo com as tentativas de variações de tempo e concentrações (Figuras 22 e 23) e tampouco induziram ativação de caspases (Figura 26), descartando a via apoptótica dependente de caspases como mecanismo de morte celular para esta linhagem.

As caspases são as enzimas executoras da apoptose. Entretanto, estas proteases não tem nenhum papel positivo na necroptose. Sabe-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) está intimamente relacionada a este processo de morte celular, e tem sido proposto que ela seja dependente do tipo celular e não um mecanismo geral de execução (CHRISTOFFERSON e YUAN, 2010).

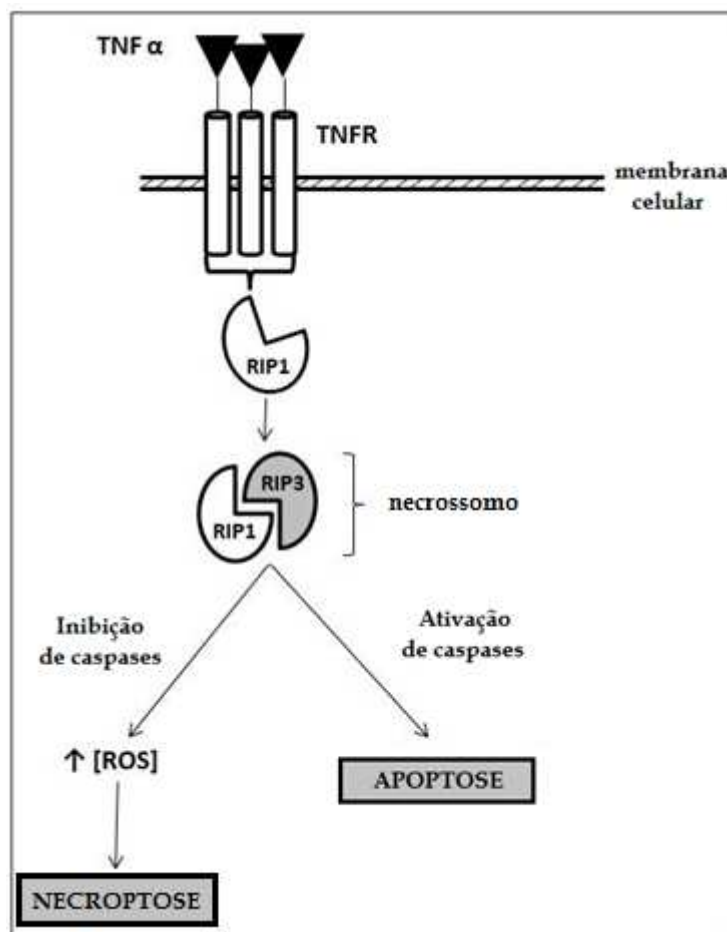
Houve um aumento significativo do conteúdo de ROS intracelular das células 786-0 tratadas com 51 μ M de eupomatenóide-5 em comparação ao controle negativo, tanto dos radicais peróxido de hidrogênio (Figura 29) quanto dos ânions superóxido (Figura 31). A entrada desta sonda na mitocôndria é ditada pelo equilíbrio de Nerst, ou seja, é necessário que a membrana mitocondrial esteja intacta para que estas sondas possam se acumular internamente na matriz mitocondrial (ROGERS *et. al.*, 2014). A produção de ânions superóxido foi relativamente menor em 786-0 quando comparada aos resultados obtidos com MCF-7, entretanto, os resultados para 786-0 podem ter sido subestimados, uma vez que as mitocôndrias estavam despolarizadas.

A necroptose está intimamente associada à perda de potencial de membrana, mas não apresenta nenhuma relação com ativação de Bak/Bax ou calcineurina, como a apoptose (SAWAI, 2014). A necroptose pode ser ativada pelos mesmos ligantes que a apoptose, sendo eles: TNFalfa, FasL e TRAIL. O mecanismo que dita a decisão celular de seguir a via da apoptose ou da necroptose ainda está em estudo (WALSH, 2014; VANDENABEELE *et. al.*, 2010; GALLUZZI E KROEMER, 2008); entretanto, sabe-se que TNFalfa pode ativar a resposta necrótica por meio da inibição das caspases (principalmente a -8) e consequente acúmulo das quinases RIP-1 e RIP-3, que são então fosforiladas, levando ao aumento da formação de necrossomo (BORNER e ANDREWS, 2014; KACZMAREK, VANDENABEELE e KRYSKO, 2013). O necrossomo, por sua vez, leva à produção de ROS (VANDENABEELE *et. al.*, 2010).

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura para as células tratadas com 51 μ M de eupomatenóide-5 revelaram uma densidade de microvilosidades reduzida. Além disso, as imagens comprovam que houve extravasamento do conteúdo celular das células 786-0 tratadas (Figura 33), característico de células em processo de necrose; e evaginação da membrana plasmática das células MCF-7 tratadas (Figura 34), característico de células em estágio de apoptose.

O câncer é uma doença complexa, portanto a descoberta de compostos com ação múltiplo-alvos tem sido uma estratégia terapêutica bastante atraente (CHEN *et. al.*, 2013). Considerando os resultados obtidos, é possível inferir que o eupomatenóide-5 pode atuar nestas duas vias de morte celular distintas, apoptose ou necroptose, dependendo da ativação/inibição de caspases, porém o mecanismo exato de escolha por determinada via ainda é incerto. A Figura 50 mostra as vias de ativação desses dois tipos de morte celular pelo receptor TNF, pelas quais o eupomatenóide-5 pode estar atuando. Estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de elucidar estas respostas.

Figura 50. Esquema das vias de ativação da necroptose e apoptose pelo receptor TNF.



A ativação da necroptose pelo TNF requer inativação de caspases e organização do complexo de proteínas RIP (RIP1-RIP3), também denominado necrossomo. O necrossomo, por sua vez, leva à produção de ROS, culminando em morte celular. Havendo ativação de caspases, a morte celular ocorre pela via apoptótica.

Na tentativa de isolar outros compostos previamente identificados no EBD de *Piper regnellii* (LONGATO, 2010) o mesmo passou pelas etapas de fracionamento e refracionamento biomonitorado e de uma de suas frações foi isolado o composto apiol. Pertencente à classe dos fenilpropanóides, um estudo revelou que o apiol bloqueia os canais de cálcio (NEUHAUS-CARLISLE, VIERLING e WAGNER, 1997). Nesse sentido, a literatura tem relatado a capacidade dos bloqueadores de canais de cálcio em reverter a resistência celular a múltiplas drogas (JUNG *et. al.*, 2012; CHIU *et. al.*, 2010). No caso do

câncer, principalmente, o fenômeno da resistência a quimioterápicos tem sido foco de intensa pesquisa, cujo objetivo é compreender seu mecanismo e descobrir novas terapias para superá-la, uma vez que essa resistência é a maior causa de falhas na quimioterapia (RAGUZ e YAGUE, 2008).

O desenvolvimento do fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) é um dos principais entraves no tratamento quimioterápico contra tumores (SALEH *et. al.*, 2012). Essa resistência é multifatorial, podendo resultar, entre outros fatores, da ativação ou superexpressão de proteínas da família de transportadores ABC (*ATP Binding-Cassette*). Tem sido intensa a busca de novos quimioterápicos que não sejam substratos das proteínas transportadoras e de substâncias que possuam atividade reversora (SALEH *et. al.*, 2012; HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010; SHUKLA, 2006).

Muitas drogas, incluindo bloqueadores de canais de cálcio, interagem com a proteína transportadora P-gp e bloqueiam esse mecanismo de resistência, fazendo com que o quimioterápico volte a produzir o seu efeito antiproliferativo (ADOVELANDE, DELEZE e SCHREVEL, 1998). Dentre os bloqueadores de canais de cálcio que são potencialmente moduladores de 1ª geração, o verapamil é o mais importante (CHIU *et. al.*, 2010).

Considerando os resultados positivos que os estudos envolvendo associações de medicamentos na terapia contra câncer têm relatado (ONESCHUK e YOUNUS, 2008), urgiu-se a necessidade de um estudo associando o apiol e os quimioterápicos doxorrubicina e vincristina, quimioterápicos empregados frequentemente na clínica, em linhagem NCI/ADR-RES que expressa o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos, caracterizada pela alta expressão da proteína P-gp (LISCOVITCH e RAVID, 2007).

De maneira geral, o apiol promoveu sinergismo tanto quando associado à doxorrubicina (Figura 40), quanto à vincristina (Figura 42), de maneira concentração-dependente (Tabelas 7 e 8), com índices de DRI maiores que 1 para as concentrações mais elevadas de apiol avaliadas (100 μ M e 1 mM). O verapamil, utilizado como controle positivo,

também promoveu sinergismo (Tabela 7), mas sem correlação entre concentração e efeito, uma vez que os índices de DRI foram iguais para as três concentrações de verapamil avaliadas (25, 50 e 100 μM).

Segundo dados da literatura (LIU, LU e FAN, 2011), a concentração efetiva de verapamil para reverter a MDR está entre 6-10 μM ; no entanto, os efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular já podem ocorrer com concentrações séricas em humanos de 1 a 2 μM . Esses efeitos são significativos e, por este motivo, o uso do verapamil ainda é limitado na clínica (HUANG *et. al.*, 2011). Dessa forma, a busca por sensibilizadores menos cardiotoxicos é necessária na tentativa de reversão da resistência a múltiplas drogas em câncer.

Tem sido relatado que o verapamil aumenta o acúmulo intracelular de drogas e a retenção de agentes quimioterapêuticos pela competitiva ligação à P-gp, o que resulta em um aumento da absorção de fármacos pelas células tumorais. O verapamil age impedindo a fosforilação da P-gp, necessária para a sua função de bombeamento (LIU, LU e FAN, 2011).

A resistência a quimioterápicos promovida pela glicoproteína-P é a forma de resistência mais estudada *in vitro*, *in vivo* e na clínica e, conseqüentemente, um grande número de fármacos e compostos recentemente sintetizados são investigados pelas suas habilidades em afetar o fenômeno (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010).

Por ser um bloqueador de cálcio (NEUHAUS-CARLISLE, VIERLING e WAGNER, 1997), o apíol poderia estar agindo pelo mesmo mecanismo de ação que o verapamil, ligando-se à P-gp presente na membrana das células NCI/ADR-RES, inibindo o mecanismo de extrusão dos quimioterápicos, e conseqüentemente, potencializando sua atividade antiproliferativa. Porém, nas condições experimentais avaliadas, o apíol não conseguiu reter o conteúdo de rodamina-123 no interior celular (Figura 44), sugerindo o não envolvimento da P-gp na associação entre apíol e quimioterápicos. Conforme relatado, existem outras proteínas

envolvidas na modulação da resistência, bem como outros fatores não diretamente relacionados com as bombas de efluxo (HAIMEUR *et. al.*, 2004) e, portanto, o mecanismo de ação do apiol ainda deve ser esclarecido.

Considerando que o apiol não inibe a enzima P-gp, os estudos da associação entre quimioterápicos e apiol deram continuidade em linhagem de células tumorais de ovário (OVCAR-3), que não apresenta fenótipo de resistência (ATCC, 2014). De maneira geral, o apiol (100 μ M) também promoveu sinergismo em células OVCAR-3 tanto quando associado à doxorrubicina, quanto à vincristina (Tabela 10 e Figura 45), com índices de DRI maiores que 1.

Em virtude desses efeitos, o apiol foi avaliado em combinação com o eupomatenóide-5 nas linhagens 786-0 e MCF-7. Analisando os resultados obtidos (Figura 46) é possível inferir que a associação eupomatenóide-5/apiol foi capaz de intensificar a atividade antiproliferativa, principalmente nas concentrações menores de eupomatenóide-5.

O uso de medicamentos combinados com a finalidade de contornar a resistência tumoral é um princípio bem estabelecido da terapia do câncer. Com poucas exceções, o sucesso dos tratamentos com quimioterápicos tem sido resultado da combinação de agentes com atividades conhecidas, com diferentes mecanismos de resistência e mínima sobreposição de efeitos citotóxicos nas doses consideradas ótimas (DANCEY e CHEN, 2006). Estudos para elucidar o mecanismo de reversão da MDR pelo apiol devem se intensificar, a fim de que ocorra, a curto prazo, a introdução de um bloqueador de canal de cálcio adjuvante na terapia contra o câncer.

A atividade citocida seletiva sobre células tumorais observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente em uma atividade *in vivo*. Muitas substâncias apresentam excelente atividade em cultura de células, porém, quando administradas em animal, perdem sua atividade por metabolização ou problemas de biodisponibilidade. O modelo *in vivo* permite a obtenção de informações sobre a farmacocinética e

farmacodinâmica do novo composto. Portanto, um estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão apropriada a respeito do potencial anticâncer de uma nova substância (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

Diversos modelos *in vivo* de estudo do câncer foram desenvolvidos com o uso de animais de laboratório para confirmação dos efeitos obtidos em cultura de células. O modelo de tumor de Ehrlich é um exemplo de metodologia prática e transponível para a análise de efeitos antineoplásicos de diversas moléculas e compostos. É um tumor murino, transplantável, originado de um adenocarcinoma mamário (NASCIMENTO *et. al.*, 2006), utilizado nas suas formas ascítica e sólida (SAKAI *et. al.*, 2010).

A atividade anticâncer do eupomatenóide-5 já havia sido avaliada em modelo de Ehrlich sólido com a inoculação das células no coxim plantar e avaliação do desenvolvimento tumoral pela medida do volume da pata (LONGATO, 2010; LONGATO *et. al.*, 2011). O modelo de Ehrlich ascítico proposto para esta fase do trabalho permitiu um diferencial na avaliação da atividade, por mensurar a quantidade de células tumorais presentes na cavidade peritoneal. O tratamento diário com eupomatenóide-5 (10 mg/Kg) reduziu em 75% a quantidade celular, ao passo que o tratamento associado ao apiol (30 mg/Kg) reduziu em 85,2% (Figura 47), sugerindo que novos experimentos devam ser realizados com diminuição da dose do eupomatenóide-5 e manutenção ou aumento da dose de apiol, para verificar se esta interação realmente ocorre.

Embora seja um modelo de avaliação da atividade anticâncer, a administração dos compostos pela via i.p., local onde as células tumorais foram inoculadas, não favorece as conclusões sobre o metabolismo e a farmacocinética dos compostos em questão. Geralmente esta é a via escolhida para tratamento dos animais devido à facilidade de administração. Tentativas de tratamento pela via intravenosa (veia femural) foram feitas porém, já na segunda administração, observou-se edema com aspecto necrótico nas

patas, o que inviabilizou a continuidade do estudo. Para a repetição deste estudo, a escolha da via de administração deve ser melhor discutida.

Um dos resultados positivos deste estudo foi a avaliação de alguns sinais visíveis de toxicidade. Os dados de toxicidade de uma amostra são muito importantes e relevantes, uma vez que as neoplasias são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e muitos dos tratamentos utilizados nessas neoplasias, como os radioterápicos e quimioterápicos, têm efeitos colaterais indesejáveis, que podem levar o paciente a óbito (MACHADO *et. al.*, 2008). Portanto, há uma incessante busca de fármacos eficientes, que tenham baixa toxicidade e, conseqüentemente, causem o mínimo de efeitos adversos (VERÇOSA JR *et. al.*, 2007). O composto eupomatenóide-5 e sua associação com apiol foram eficientes em reduzir a quantidade de células tumorais, sem apresentar sinais de toxicidade nos animais. Considerando também o crescente interesse por novas drogas que, em associação a quimioterápicos ou outros compostos, potencializem sua atividade anticâncer com menor incidência de efeitos adversos, estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação do apiol deverão ser realizados.

Ao longo dos tempos, as plantas tem sido um excelente recurso para o desenvolvimento de potenciais fármacos, principalmente contra o câncer. Embora diversas propriedades farmacológicas da *Piper regnellii* C.DC. var.*regnellii* tenham sido relatadas, o artigo "*In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves" publicado pelo nosso grupo foi o primeiro a relatar a atividade anticâncer (*in vitro*, em linhagens tumorais e *in vivo*, em tumor sólido de Ehrlich) do eupomatenóide-5 (LONGATO *et. al.*, 2011). Além disso, não existem registros de trabalhos envolvendo a associação entre o apiol e quimioterápicos. Os resultados aqui apresentados encorajam o aprofundamento desses estudos visando à elucidação dos mecanismos de ação dos princípios ativos identificados e à introdução destes compostos na quimioterapia contra o câncer num futuro próximo.

CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou a atividade antiproliferativa de dois compostos isolados da espécie vegetal *Piper regnellii* C.DC. var. *regnellii*.

Os resultados obtidos sugerem que o eupomatenóide-5 atua em diversos alvos, em virtude da existência de mecanismos de ação diferentes para cada linhagem celular. Os estudos indicam que o efeito antiproliferativo do eupomatenóide-5 está associado com indução de apoptose em linhagem MCF-7 (mama) e indução de necrose programada em linhagem 786-0 (rim).

A associação de apiol com quimioterápicos doxorrubicina e vincristina, bem como com o eupomatenóide-5 promoveu sinergismo tanto em linhagem resistente (NCI/ADR-RES) quanto não-resistentes (OVCAR-3, MCF-7, 786-0) sendo que esta ação não está relacionada à inibição da glicoproteína-P. A associação apiol/eupomatenóide-5 reduziu a quantidade de células tumorais de Ehrlich sem sinais de toxicidade evidentes.

Os resultados obtidos estimulam a continuidade dos estudos com os compostos eupomatenóide-5 e apiol, com a finalidade de desenvolver novos quimioterápicos para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

- ❖ Adovelande J, Deleze J, Schrevel J. Synergy between Two Calcium Channel Blockers, Verapamil and Fantofarone (SR33557), in Reversing Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, 55: 433-440, 1998.
- ❖ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 5º ed. New York: Garland Science, 1396p., 2008.
- ❖ Alves EA, Guimarães ACR. Cultivo Celular, 5(2): 217-253 in *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde* - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.
- ❖ Aronis A, Melendez JA, Golan O, Shilo S, Dicter N, Tirosh O. Potentiation of Fas-mediated apoptosis by attenuated production of mitochondria-derived reactive oxygen species. *Cell Death and Differentiation*, 10:335 – 344, 2003.
- ❖ American Tissue Cell Collection – The Global Bioresource Center – www.atcc.org (acesso em 18/07/2014)
- ❖ Atjanasuppat K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoop P, Sobbon P, Barlett A, Whitfield. *In vitro* screening for anthelmintic and antitumor activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 475-482, 2009.
- ❖ Balachandran P, Govindarajan R. Cancer – an ayurvedic perspective. *Pharmacological Research*, 51: 19-30, 2005.
- ❖ Ballot C, Jendoubi M, Kluza J, Jonneaux A, Laine W, Formstecher P, Bailly C, Marchetti P. Regulation by survivin of cancer cell death induced by F14512, a polyamine-containing inhibitor of DNA topoisomerase II. *Apoptosis*, 17: 364–376, 2012.
- ❖ Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences*, 78: 431-441, 2005.
- ❖ Benevides PJC, Sartorellii P, Kato MJ. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry*, 52: 339-343, 1999.

- ❖ Berghe TV, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, Vandenabeele P. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *Apoptosis Methods*, 61(2) : 117-129, 2010.
- ❖ Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Alencar NMN, Mesquita RO, Lima MW, Pessoa ODL, Chaves JH, Silveira ER, Costa-Lotufo LV. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. *Journal of Applied Toxicology*, 28: 599-607, 2008.
- ❖ Borner C, Andrews DW. The apoptotic pore on mitochondria: are we breaking through or still stuck ? *Cell Death and Differentiation*, 21: 187-191, 2014.
- ❖ Broker LE, Krzyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11(9): 3155-3162, 2005.
- ❖ Buteau J, Spatz ML, Accili D. Transcription Factor FoxO1 Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Effects on Pancreatic-Cell Mass. *Diabetes*, 55: 1190-1196, 2006.
- ❖ Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med*, 29 :222-230, 2000.
- ❖ Cattaneo D, Ruggerenti P, Baldelli S, Motterlini N, Gotti E, Sandrini S, Salvadori M, Segoloni G, Rigotti P, Donati D, Perico N, Remuzzi G. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J. Am. Soc. Nephrol*, 20, 1404–1415, 2009.
- ❖ Céline V, Adriana P, Eric D, Joaquina AC, Yannick E, Augusto LF, Rosário R, Dionicia G, Michel S. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 413-422, 2009.
- ❖ Cen XN, Zhu P, Shi YJ, Ren YL, Ma MX, Yu JR. Cytokine-induced killer cells induce apoptosis of K562 cells expressed bcr-abl. *Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, 10 (3): 201-204, 2002.

- ❖ Chabner BA, Roberts Jr TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5: 65, 2005.
- ❖ Chen J-Y, Tang Y-A, Li W-S, Chiou Y-C, Shieh J-M, Wang, Y-C. A Synthetic Podophyllotoxin Derivative Exerts Anti-Cancer Effects by Inducing Mitotic Arrest and Pro-Apoptotic ER Stress in Lung Cancer Preclinical Models. *Plos One* 8(4): e62082, 2013.
- ❖ Chiu L-Y, Ko J-L, Lee Y-J, Yang T-Y, Tee Y-T, Sheu G-T. L-type calcium channel blockers reverse docetaxel and vincristine-induced multidrug resistance independent of ABCB1 expression in human lung cancer cell lines. *Toxicology Letters*, 192: 408–418, 2010.
- ❖ Chou JH, Chou TC. Computerized simulation of dose reduction index (DRI) in synergistic drug combinations. *Pharmacologist* 30, A231, 1988.
- ❖ Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22:263–268, 2010.
- ❖ Constantin, MB, Sartorellii P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJP, Ohara MT, Emerenciano VP, Kato MJ. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. *Planta Medica*, 67: 771-773, 2001.
- ❖ Corrêa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 373-374, 1984.
- ❖ Cragg GM, Newman DJ. A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670–3695, 2013.
- ❖ Cragg GM, Newman DJ. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev*, 8: 313-331, 2009.
- ❖ Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, 100 (1-2): 72-79, 2005.

- ❖ Dancey JE, Chen HX. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5: 649-659, 2006.
- ❖ Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castaneda-Corral G, Angeles-Lopez GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 110: 334-342, 2007.
- ❖ Dewick PM. *Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach*, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.
- ❖ Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oil from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 197-201, 2007.
- ❖ Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*, 594:57-72, 2010.
- ❖ Esteves-Souza A, Pissinate K, Nascimento MG, Grynberg NF, Echevarria A. Synthesis, cytotoxicity, and DNA-topoisomerase inhibitory activity of new asymmetric ureas and thioureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 492–499, 2006.
- ❖ Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *Journal of Internal Medicine*, 258: 479-517, 2005.
- ❖ Felipe DF, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAG. Evaluation of the antimicrobial activity of *Piper regnellii* (Miq). C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(4): 618-620, 2008.
- ❖ Fernandez-Perez F, Almagro L, Pedreno MA, Ros LVG. Synergistic and cytotoxic action of indole alkaloids produced from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Pharmaceutical Biology*, 51(3): 304-310, 2013.
- ❖ Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 169:4805-4810, 2002.

- ❖ Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell*, 135: 1161-1163, 2008.
- ❖ Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19: 107-120, 2012.
- ❖ Ganesan A. *Inn Natural Products and Cancer Drug Discovery*. p.3, 2013. Humana Press, New York.
- ❖ Gao S e Scott RE. Stable overexpression of specific segments of the P2PR protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 97(3): 445-52, 2003.
- ❖ Garcia FP, Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. “Eupomatenoid-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*,” Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 940531, 11 pages, 2013.
- ❖ González-Sarriás A, Ma H, Edmonds ME, Seeram NP. Maple polyphenols, ginnalins A–C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chemistry* 136: 636–642, 2013.
- ❖ Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343. 2007.
- ❖ Haimeur A, Conseil G, Deeley RG e Cole SPC. The MRP-Related and BCRP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: Biology, Substrate Specificity and Regulation. *Current Drug Metabolism*, 5:21-53, 2004.
- ❖ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674, 2011.

- ❖ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
- ❖ Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61: 90–97, 2013.
- ❖ His LC, Back SJ, Eling TE. Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 256(2): 563-570, 2000.
- ❖ Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BPD. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, RJ, 97(7): 1027-1031, 2002.
- ❖ Huang J, Duan Q, Fan P, Ji C, Lv Y, Lin X, Qian L, Yu X. Clinical Evaluation of Targeted Arterial Infusion of Verapamil in the Interventional Chemotherapy of Primary Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 59:127–132, 2011.
- ❖ Huber PC, Maruiama CH, Almeida WP. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim. Nova*, 33(10): 2148-2154, 2010.
- ❖ Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature: Medicine*, 1(8): 822-6, 1995.
- ❖ INCA – Instituto Nacional do Câncer. www.inca.gov.br (Acesso em 18/07/2014).
- ❖ Jung HJ, Chen Z, Wang M, Fayad L, Romaguera J, Kwak LW, McCarty N. Calcium blockers decrease the bortezomib resistance in mantle cell lymphoma via manipulation of tissue transglutaminase activities. *Blood*, 119: 2568-2578, 2012.
- ❖ Juntilla MR, Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*: 501, 346-354, 2013.
- ❖ Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity Review - Cell press*, 38: 209-223, 2013.

- ❖ Kagawa S, Gu J, Honda T, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. Deficiency of Caspase-3 in MCF7 Cells Blocks Bax-mediated Nuclear Fragmentation but not Cell Death. *Clinical Cancer Research*, 7:1474-1480, 2001.
- ❖ Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytometry Part A* 71^a: 125-131, 2007.
- ❖ Kim K-Y, Yu S-N, Lee S-Y, Chun S-S, Choi Y-L, Park Y-M, Song CS, Chatterjee B, Ahn S-C. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413: 80–86, 2011. (a)
- ❖ Kim M-O, Moon D-O, Jung JM, Lee WS, Choi YH, Kim G-Y. *Agaricus blazei* Extract Induces Apoptosis through ROS-Dependent JNK Activation Involving the Mitochondrial Pathway and Suppression of Constitutive NF-κB in THP-1 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 838172, 10 pages, 2011. (b)
- ❖ Koroish AM, Foss SR, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BPD. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 270-277, 2008.
- ❖ Krysko DV, Berghe TV, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44: 205–221, 2008.
- ❖ Lago JHG, Chen A, Young MCM, Guimarães EF, Oliveira A, Kato MJ. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 2: 96-98, 2009.
- ❖ Lambert A.J, Brand M.D. Reactive oxygen Species Production by Mitochondria. *Mitochondrial DNA, Methods and Protocols*, 554:165-181, 2009.
- ❖ Lampe JW. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 579 - 583, 2003.

- ❖ Leal SM, Pino N, Stashenko EE, Martínez JR, Escobar P. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia, Journal of Essential Oil Research, 25(6): 512-519, 2013.
- ❖ Lee KH. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. Journal of Biomedical Science, 6: 236-250, 1999.
- ❖ Lemos COT, Svidzinsk TIE, Baeza TC, Miranda N, Nakamura CV, Cortez DAG, Cardozo-Filho L, Cabral VF. Evaluation of antifungal activity of extracts of *Piper regnellii* obtained by supercritical fluid extraction. Natural Product Research, 27:24, 2013.
- ❖ Li S, Jia Y, Li N, Wink M, Ma Y. Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells. Phytomedicine 19: 83– 87, 2011.
- ❖ Liang Y, Yan C, Schor NF. Apoptosis in the absence of caspase 3. Oncogene, 20: 6570- 6578, 2001.
- ❖ Lien HM, Kuo PT, Huang CL, Kao JY, Lin H, Yang DY, Lai YY. Study of the Anti-Proliferative Activity of 5-Substituted 4,7-Dimethoxy-1,3-Benzodioxole Derivatives of SY-1 from *Antrodia camphorata* on Human COLO 205 Colon Cancer Cells. Based complementary and alternative medicine. Article ID 450529, 8p. 2011.
- ❖ Liscovitch M, Ravid D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR- 8 human ovarian carcinoma cells. Cancer Letters, 245:350–352, 2007.
- ❖ Liu Y, Lu Z, Fan P. Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients. Cell Biochemistry and Biophysics, 61(2): 393, 2011.
- ❖ Longato GB, Rizzo LY, Sousa IMO, Tinti SV, Possenti A, Figueira GM, Ruiz ALTG, Foglio MA, Carvalho JE. In vitro and In vivo Anticancer Activity of Extracts, Fractions, and Eupomatenoide-5 Obtained from *Piper regnellii* Leaves. Planta Medica, 77(13): 1482-1488, 2011.

- ❖ Longato GB. Atividade anticâncer de extratos brutos e frações ativas obtidos de *Piper regnellii* (Miq). C. DC. var. *regnellii* [dissertation]. São Paulo. Universidade Estadual de Campinas; 2010.
- ❖ Longley, D. B.; Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. J. Pathol. 205 (2): 275-292, 2005.
- ❖ Ma JQ, Ding J, Zhang L, Liu C-M. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway. Food and Chemical Toxicology, 64: 41–48, 2014.
- ❖ Machado V, Cabral A, Monteiro P, Gonçalves L, Providência LA. O carvediol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas antraciclinas (doxorrubicina). Revista Portuguesa de Cardiologia, 27(10): 1277-1296, 2008.
- ❖ Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast câncer cells. Plos One, 9(1), 2014.
- ❖ Majdalawieh AF, Carr RI. *In vitro* investigation of the potential immunomodulatory and anti-cancer activities of black pepper (*Piper nigrum*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*). Journal of Medicinal Food, 13(2): 371-381, 2010.
- ❖ Malhotra S, Singh AP. A review of pharmacology of phytochemicals from Indian Medicinal Plants. The internet Journal of Alternative Medicine, 5, ISSN: 1540-2584, 2009.
- ❖ Mariz SR, Cerqueira GS, Araujo WC, Duarte JC, Melo AFM, Santos HB, Oliveira K, Diniz MFFM, Medeiros IA. Estudo toxicológico agudo do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 16(3): 372-378, 2006.
- ❖ Marques AM, Paiva RA, Fonseca LM, Capella MAM, Guimaraes EF, Kaplan MAC. Preliminary Anticancer Potency Evaluation and Phytochemical investigation of Methanol Extract of *Piper clausenianum* (Miq.) C. DC. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3 (2):13-18, 2013.

- ❖ Maxwell SA, Rivera A. Proline oxidase induces apoptosis in tumor cells and its expression is frequently absent or reduced in renal carcinomas. *J Biol Chem* 278: 9784–9789, 2003.
- ❖ Meiyanto E, Hermawan A, Anindyajati. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(2):427-36, 2012.
- ❖ Miettinen S, Ahonen MH, Lou Y-R, Manninen T, Tuohimaa P, Syvala H, Ylikomi T. Role of 24-hydroxylase in vitamin D₃ growth response of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 108(3): 367–373, 2004.
- ❖ Molento MB, Veríssimo CJ, Amarante AT, Van Wyk JA, Chagas ACS, Araújo JV, Borges FA. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arq Inst Biol*, On-line version ISSN 1808-1657, 2013.
- ❖ Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766, 1991.
- ❖ Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Haskó G, Pacher P. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358: 203–208, 2007.
- ❖ Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro ESB, Guerra RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences*, 78: 2650-2653, 2006.
- ❖ NCI (National Cancer Institute) www.cancer.gov (Acesso em 18/07/2014).
- ❖ Neuhaus-Carlisle K, Vierling W, Wagner H. Screening of plant extracts and plant constituents for calcium-channel blocking activity. *Phytomedicine*, 4(1): 67–69, 1997.

- ❖ Newman DJ, Cragg GM. Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 75: 311-335, 2012.
- ❖ Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends in Biochemical Sciences, 22(8): 299-306, 1997.
- ❖ Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer, 9: 338-350, 2009.
- ❖ Oneschuk D, Younus J. Natural health products and cancer chemotherapy and radiation therapy. Oncol Ver, 1:233-242, 2008.
- ❖ Ormrod D, Spencer CM. Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung cancer. Drugs, 58(3): 533-551, 1999.
- ❖ Ouyang D-Y, Zeng L-H, Pan H, Xu L-H, Wang Y, Liu K-P, He X-H. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. Food and Chemical Toxicology, 60: 424–430, 2013.
- ❖ Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OM, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry, 46: 597-673, 1997.
- ❖ Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. Arquivos de Gastroenterologia, 38(2): 138-144, 2001.
- ❖ Pelizzaro-Rocha KJ, Veiga-Santos P, Lazarin-Bidoia D, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Ximenes VF, Silva SO, Nakamura CV. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in Trypanosoma cruzi. Microbes and Infection, 13: 1018-1024, 2011.
- ❖ Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Ferreira AG, Cortez DAG. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. Rev Bras Farmacogn, 15: 199-204, 2005.
- ❖ Petit PX. Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane Potential in Plant Mitochondria. Plant Physiology, 98: 279-286, 1992.

- ❖ Raguz S, Yagüe E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *Br J Cancer*, 99: 387-91, 2008.
- ❖ Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. Camptothecin and its analogs, in: G.M. Cragg, D.G.I. Kingston, D.J. Newman (Eds.), *Anticancer agents from natural products*, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, p. 5–21, 2005.
- ❖ Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 50: 222– 233, 2011.
- ❖ Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HMI. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45: 2821– 2831, 2013.
- ❖ Rogers C, Davis B, Neuffer PD, Murphy MP, Anderson EJ, Robidoux J. A transient increase in lipid peroxidation primes preadipocytes for delayed mitochondrial inner membrane permeabilization and ATP depletion during prolonged exposure to fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 67: 330–341, 2014.
- ❖ Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of National Cancer Institute*, 82: 1113-118, 1990.
- ❖ Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Braz J Med Biol Res*, 41: 411-415, 2008.
- ❖ Sakai M, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Ribeiro A, Quinteiro-Filho WM, Rone MB, Martinez-Arguelles DB, Dagli MLZ, Papadopoulos V, Palermo-Neto J. Translocator protein (18kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich solid tumor cells *in vivo*. *European Journal of Pharmacology*, 626(2-3): 131–138, 2010.
- ❖ Saleh EM, El-awady RA, Eissa NA, Abdel-Rahman WM. Antagonism between curcumin and the topoisomerase II inhibitor etoposide. A study of DNA damage,

- cell cycle regulation and death pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 13(11): 1058-1071, 2012.
- ❖ Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91:443-446, 1997.
 - ❖ Sawai L. Characterization of TNF-induced caspase-independent necroptosis. *Leukemia Research*, 38: 706–713, 2014.
 - ❖ Schimidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, Bittencourt CF, Zanetti GD, Heinzman BM, Laufer S, Merfort I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethn*, 122: 523-532, 2009.
 - ❖ Schuller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. Cell type-specific differences in metabolic activation of N- nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. *IARC Science Publications*, 84, 138-40, 1987.
 - ❖ Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 5317-5323, 1992.
 - ❖ Selvendiran K, Singh JPV, Sakthisekaran, D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 19: 107-111, 2006.
 - ❖ Sharom FJ. The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *J Membrane Biol*, 160:161-175, 1997.
 - ❖ Shukla S, Robey RW, Bates SE, Ambudkar SV. The Calcium Channel Blockers, 1,4-Dihydropyridines, Are Substrates of the Multidrug Resistance-Linked ABC Drug Transporter, ABCG2. *Biochemistry*, 45: 8940-8951, 2006.
 - ❖ Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 63:11-30, 2013.

- ❖ Silva EMJ, Machado SR. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). Revista Brasileira de Botânica, 22: 117 - 124, 1999.
- ❖ Singh M, Shakya S, Soni VK, Dangi A, Kumar N, Bhattacharya S-M. The n-hexane and chloroform fractions of *Piper betle* L. trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid *Brugia malayi*. International Immunopharmacology, 9: 716-728, 2009.
- ❖ Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of National Cancer Institute, 82: 1107-1118, 1990.
- ❖ Souza MVN. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. Química Nova, 27(2): 308-312. 2004.
- ❖ Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia in vitro. Cancer Letters, 224: 31-43, 2005.
- ❖ Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JÁ, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat. Rev. Drug Discovery, 5: 219, 2006.
- ❖ Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Achiwa H, Hida T. Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. J. Environm. Pathol., Toxicol. Oncol. 21(2): 177-81, 2002.
- ❖ Telford WG, Komoriya A, Packard BZ, Bagwell CB. Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry p.203 in Teresa S. Howley and Robert G. Hawley (Eds.) Flow cytometry protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 699, Springer Science, LLC, 2011.
- ❖ Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, Coelho J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas

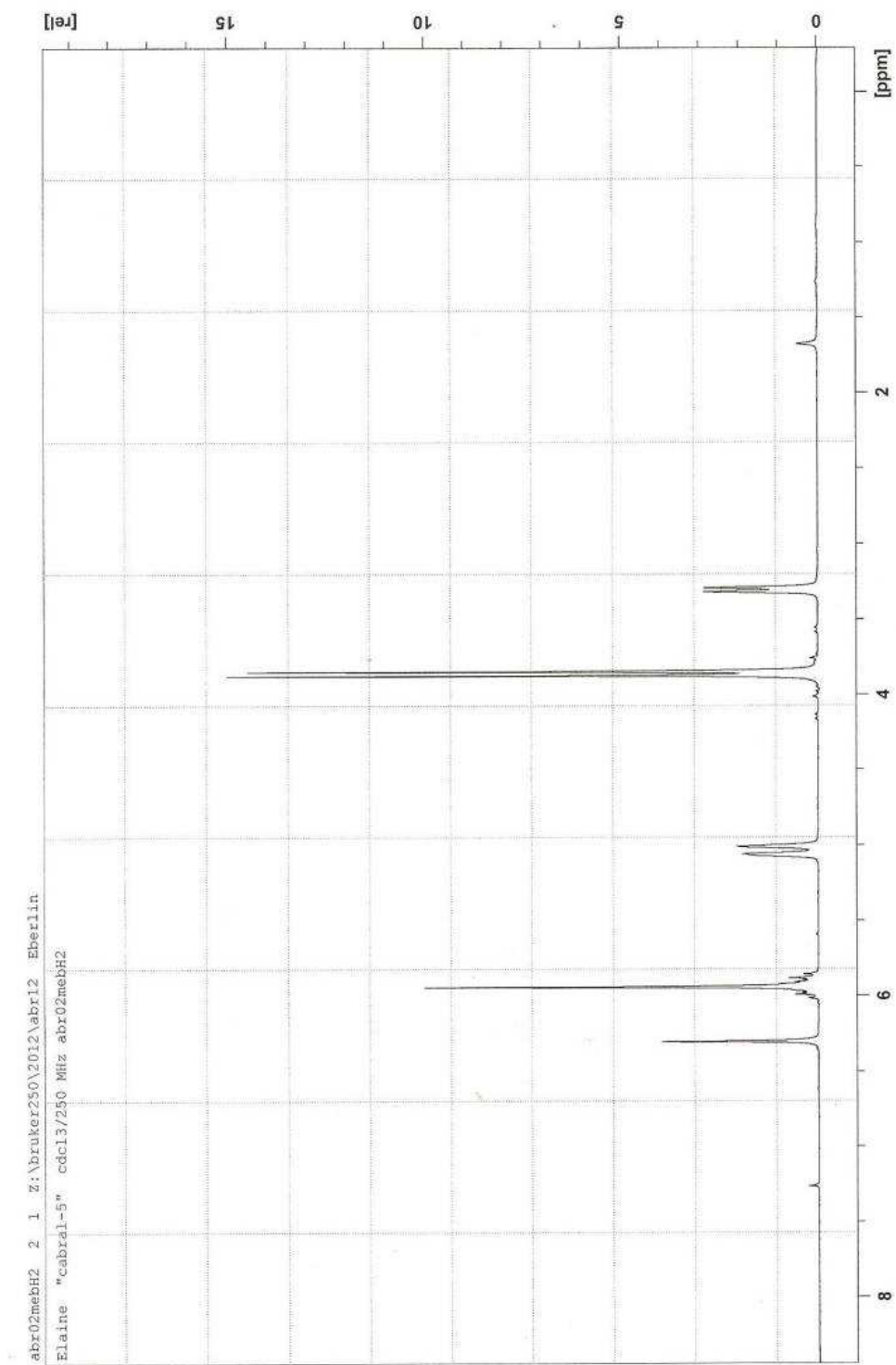
- neoplasias mamárias em cadelas. Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science, 44(2): 96-102, 2007.
- ❖ Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M and Rodan GA. Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormonelike peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. Proceedings of the National Academic of Science of USA, 85(13): 4605-4609, 1988.
 - ❖ Tsai IL, Lee FP, Wu CC, Duh CY, Ishikawa T, Chen JJ, Chen YC, Seki, R. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. Planta Medica, 71: 535 - 542, 2005.
 - ❖ Urrea FA, Cordova-Delgado M, Pessoa-Mahana H, Ramirez-Rodriguez O, Weiss-Lopez B, Ferreira J, Maturana-Araya R. Mitochondria: A Promising Target for Anticancer Alkaloids. Current Topics in Medicinal Chemistry, 13, 2171-2183, 2013.
 - ❖ Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate, 57 (3): 205-25, 2003.
 - ❖ Van Oostveldt K, Dosogne H, Burvenich C, Paape MJ, Brochez V, Eeckhout EVd. Flow cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. Veterinary Immunology Immunopathology 70 (1-2): 125-133, 1999.
 - ❖ Vandenabeele P, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nature Reviews, 11: 700-714, 2010.
 - ❖ Verçosa Jr D, Melo MM, Cassali GD, Dantas-Barros AM, Silva Jr P-GP. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 59(1): 150-154, 2007.
 - ❖ Wai-Leng L, Jeng-Yuan S, Lie-Fen S. Taxol, Camptothecin and beyond for cancer therapy. Inn Advances in Botanical Research. Academic Press Elsevier. p.134 e 177 1ª ed. vol. 62 USA. 2012.

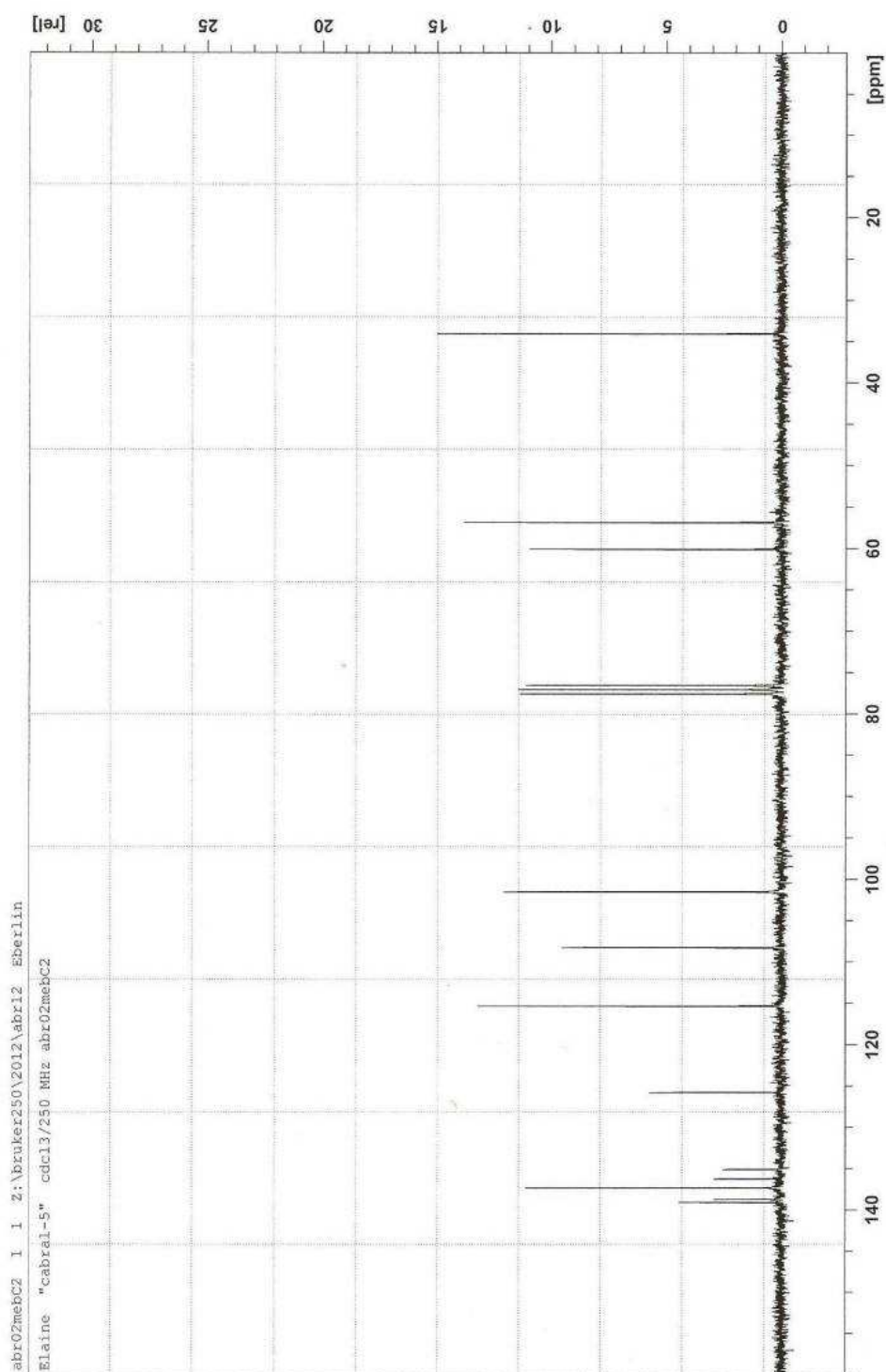
- ❖ Walsby EJ, Coles SJ, Knapper S, Burnett AK. The topoisomerase II inhibitor voreloxin causes cell cycle arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with cytarabine. *Haematologica*, 96(3):393-399, 2011.
- ❖ Walsh CM. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. Necroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology. Cell Death and Survival*, 2(3): 4 pages, 2014.
- ❖ Wang T, Wang H, Soong Y. Paclitaxel-induced cell death. Where the cell cycle and apoptosis come together. *American Cancer Society*, 88 (11): 2619-2628, 2000.
- ❖ Weinberg RA. *A biologia do câncer*. Porto Alegre. Artmed, 864p., 2008.
- ❖ Weinstein-Opppenheimer CR, Burrows C, Steelman LS, McCubrey JA. The effects of beta-estradiol on Raf activity cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biology Therapeutics*, 1(3): 256-62, 2002.
- ❖ Widowati W, Wijaya L, Wargasetia T, Bachtiar I, Yellianty Y, Laksmitawati DR. Antioxidant, anticancer and apoptosis-inducing effects of *Piper* extracts in HeLa cells. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 3(3): 225-230, 2013.
- ❖ Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhovel J, Krohn O, Fuss E, Garden H, Mohagheghzadeh A, Wildi E, Ripplinger P. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resources*, 3(2): 90-100, 2005.
- ❖ Xu D, Ye D, Fisher M, Juliano RL. Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3): 963-971, 2002.
- ❖ Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Research*, 23(4): 3295-301, 2003.
- ❖ Zhao Y, Hui J, Zhu L. Synthesis and bioevaluation of novel aryl-naphthalene lignans as anticancer agents. *Med Chem Res*, 22:2505–2510, 2013.

ANEXOS

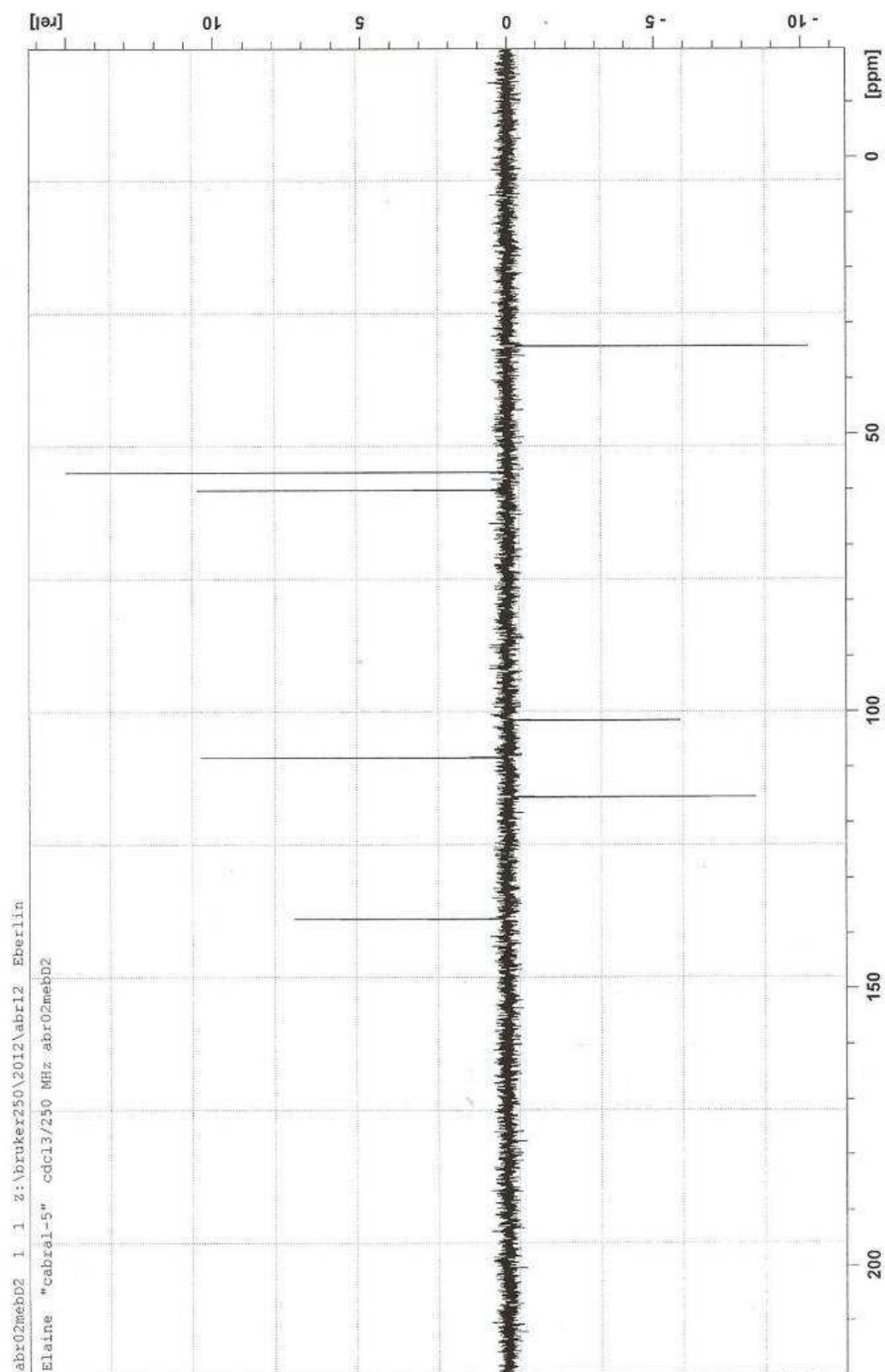
ANEXOS I - Espectros de RMN e dados de HRESI-MS do composto apiol.

Anexo 1. Espectro de RMN¹H (499,88 MHz) em CDCl₃.

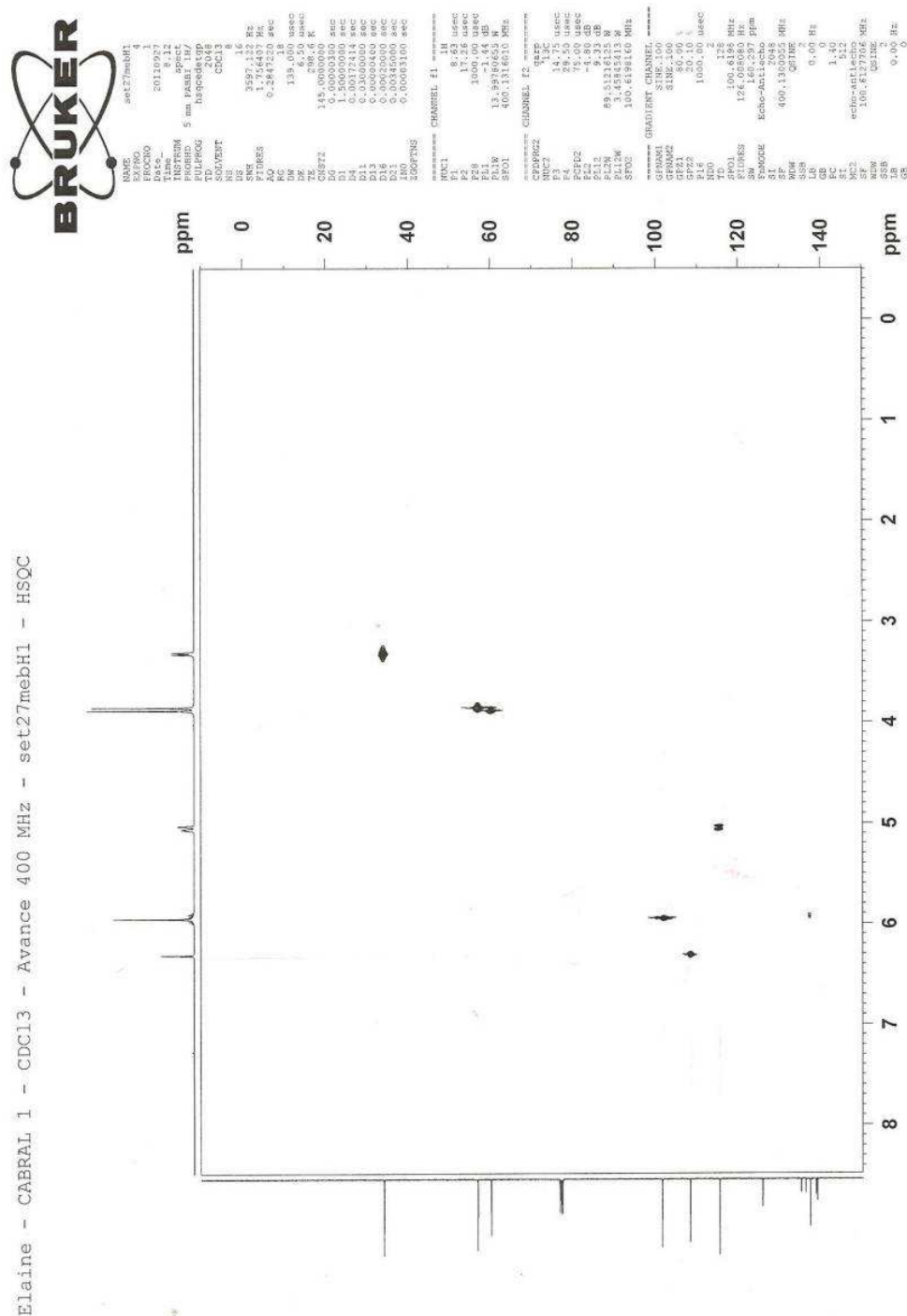


Anexo 2. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃.

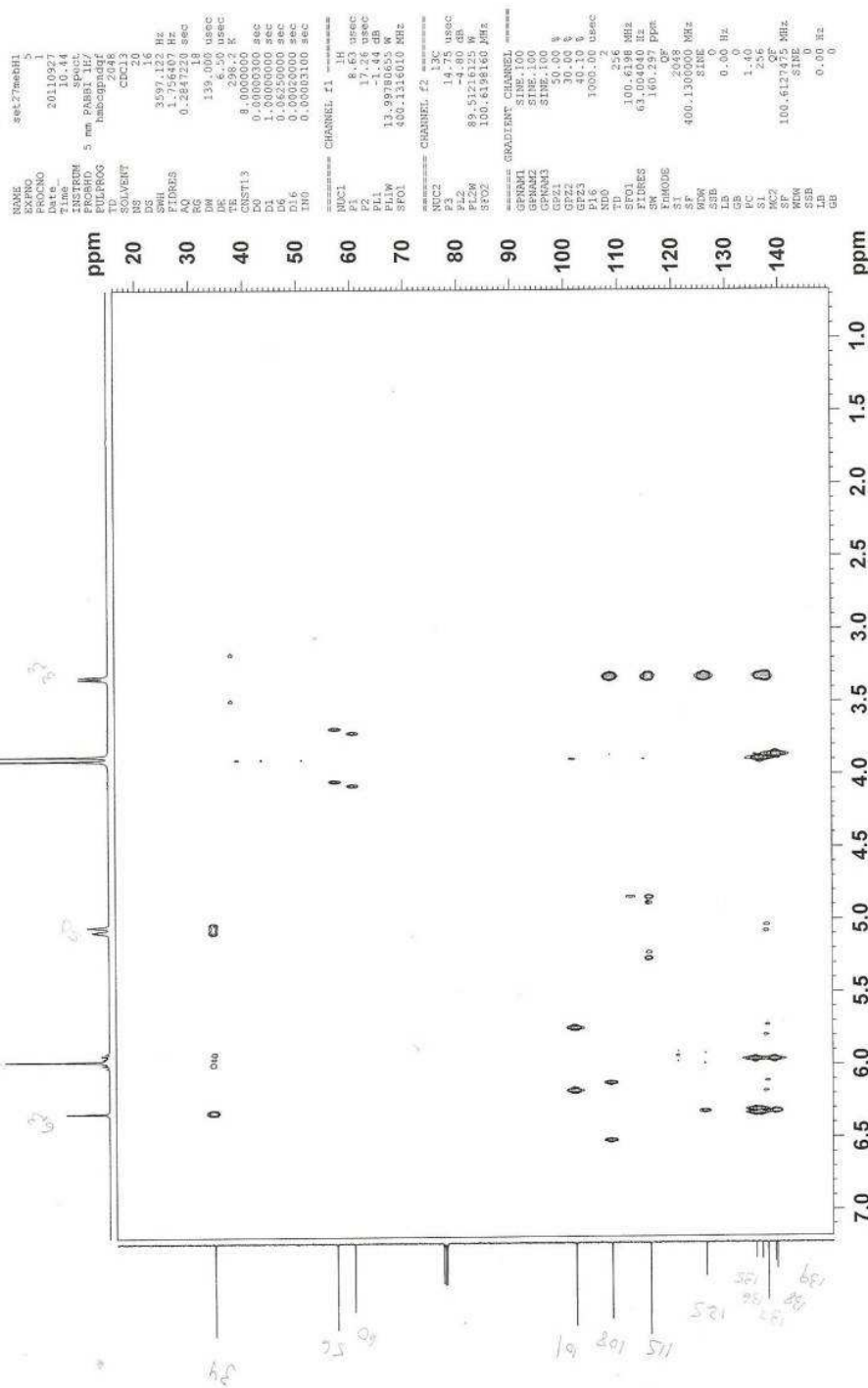
Anexo 3. Espectro de RMN¹³C (125,69 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso DEPT.



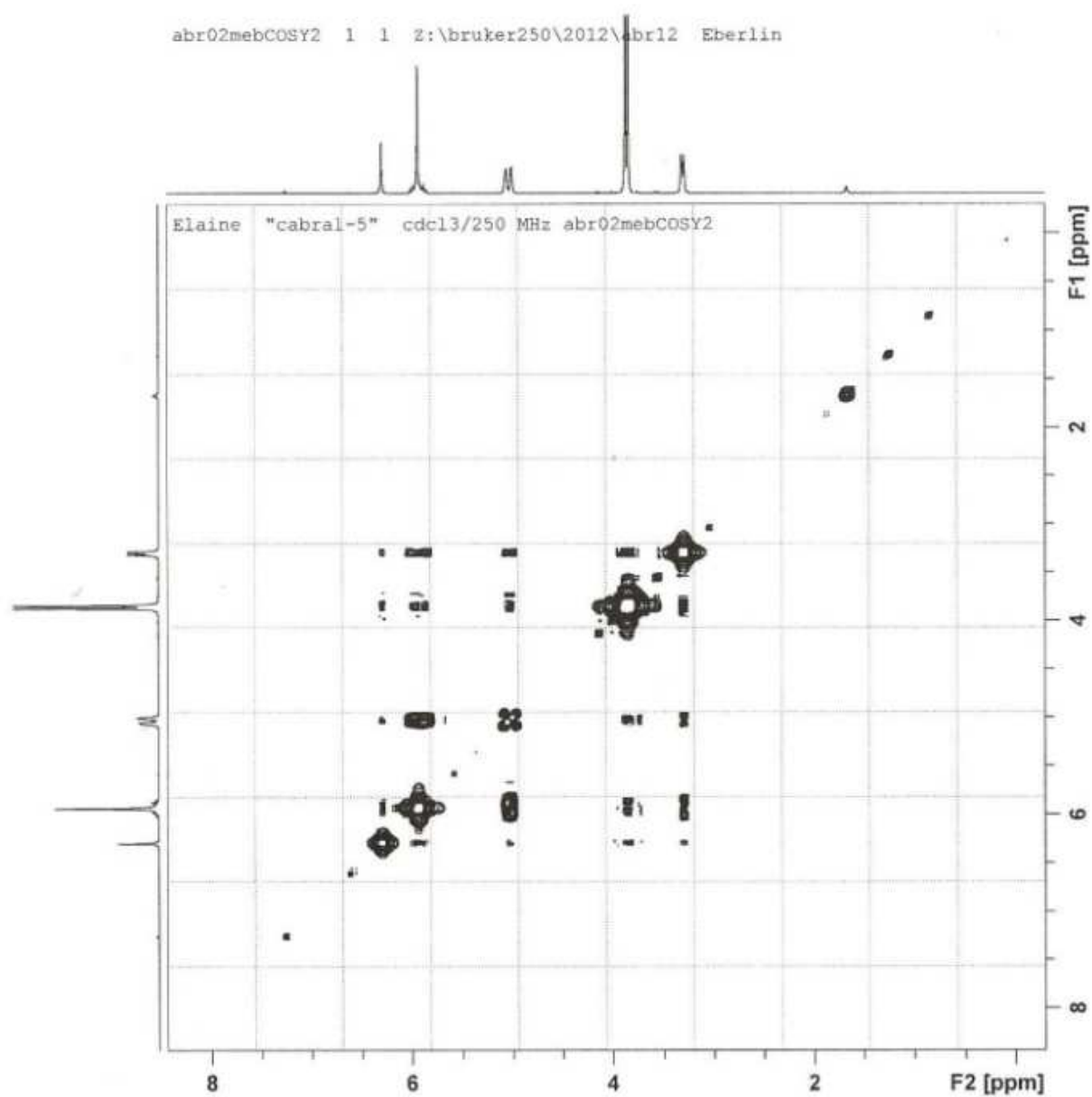
Anexo 4. Espectro de RMN1 H (499,88 MHz) x 13C (125,69 MHz) em CDCl3 obtido na sequência de pulso HSQC.



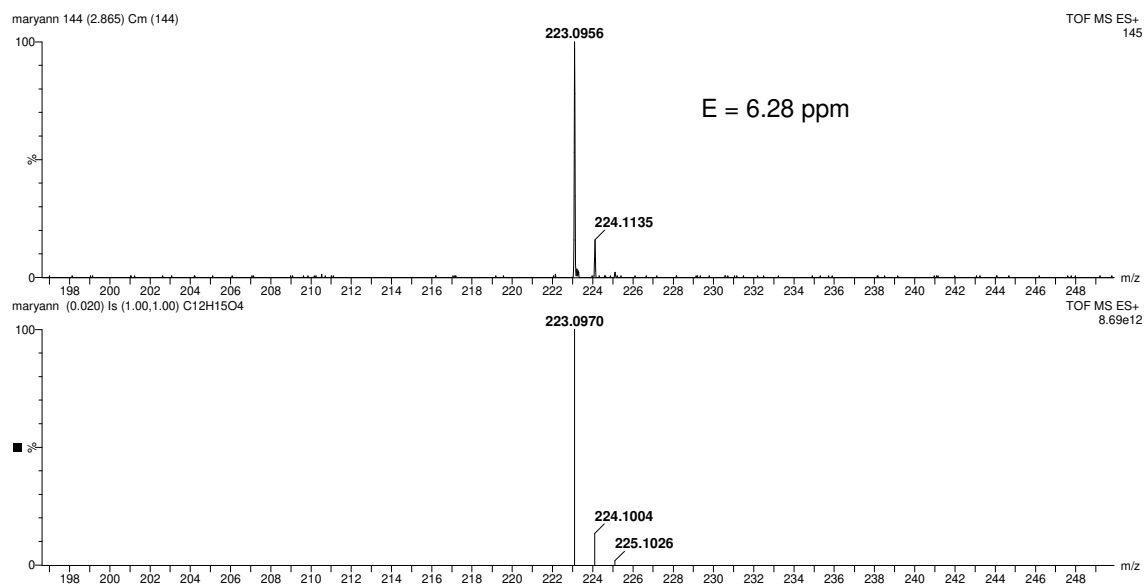
Elaine - CABRAL 1 - CDCl3 - Avance 400 MHz - set27mebH1 - HMBC



Anexo 6. Espectro de RMN1 H x 1H (499,88 MHz) em CDCl₃ obtido na sequência de pulso COSY.



Anexo 7. Dados de HRESI-MS do apiol. a) $\text{Exp}([M + H]^+ = m/z \ 223.0956 = \text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4^+)$ b) Calculado $([M + H]^+ = m/z \ 223.0970 \ (m/z \ 223.0970 = \text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4^+)$ erro de $E = 6.28 \text{ ppm}$.



ANEXO II – Protocolo Comitê de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Atividade anticâncer e mecanismo de ação de compostos isolados das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*"

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

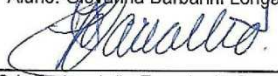
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____.

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2163-1, Instituição: UNICAMP

() CEP – Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Giovanna Barbarini Longato


Orientador: João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. ALEXANDRE LENTE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura