



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELA MENEZES MARCHETTI

**“ATIVIDADE ANTICÂNCER DO EXTRATO BRUTO E DAS
FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *CALEA PINNATIFIDA* BANKS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GABRIELA MENEZES MARCHETTI

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M332a

Marchetti, Gabriela Menezes

Atividade anticâncer do extrato bruto e das frações obtidos de folhas de *Calea pinnatifida* Banks / Gabriela Menezes Marchetti. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: João Ernesto de Carvalho, Mary Ann Foglio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Calea pinnatifida*. 2. Proliferação celular. 3. Agentes antineoplásicos. 4. Células - Cultura e meios de cultura. 5. Carcinoma de Ehrlich. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Anticancer activity of *Calea pinnatifida* Banks leaves crude extract and fractions.

Palavras-chave em inglês: *Calea pinnatifida*; Cell proliferation; Antineoplastic agents; Cell culture; Carcinoma, Ehrlich tumor.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Maria José Queiroz de Freitas Alves, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.

Data da defesa: 28/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

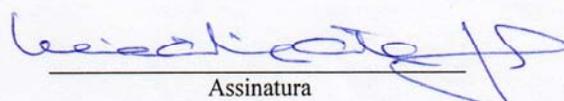
Campinas, 28 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

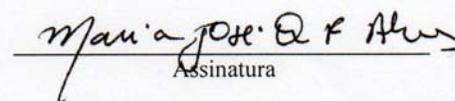
Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


Assinatura

Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves


Assinatura

Profa. Dra. Patricia Correa Dias

Assinatura

Profa. Dra. Luciana Konecny Kohn

Assinatura

“Não procure seguir as pegadas dos mestres.

Procure o que eles procuram.”

(Matsuo Basko)

Agradecimentos

Primeiramente à minha Mãe, pelo apoio e amor incondicional. Ao meu pai, que onde quer que esteja, está muito orgulhoso. À minha irmã de sangue, Fabi, por ter dito sempre as verdades que eu precisava ouvir e aos meus Tios, Tias e primos por estarem sempre presente na vida.

À minha irmã de coração, Pepe, por ter me apoiado, me escutado, e por estar sempre aqui, mesmo quando minha família de verdade não estava.

Às onças da turma 02D da Biologia por dividirem comigo momentos inesquecíveis na faculdade.

Às minhas grandes amigas, Ana Paula, Karen, Mari, Marizinha e Stefanie por compartilharem comigo as minhas conquistas acadêmicas e por estarem comigo sempre que eu precisei, mas principalmente quando eu não precisei.

Às minhas amigas de casa, Taty e Lorryne, mas principalmente a Renatinha, pela companhia.

Aos meus novos amigos de viagem, apesar de não ter viajado com todos eles, Digão, Tânia, Lê, Goiaba, Leo, Gabizão, Maricota, Gelada, Pri, Rosa, Ciça, Joe, Tatu e Maitê, por me distraírem em épocas estressantes e por dividirem comigo momentos inesquecíveis. E ao Cachorro Gago pela trilha sonora.

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

Ao pessoal do laboratório pelas conversas na cozinha e ajuda nos experimentos, com destaque para a Ana Lucia, sempre disposta a elucidar nossas dúvidas, a Sirlene, sempre disposta a ajudar e a Vanessa, Michelle, Débora e Luzinha por serem amigas e por me ensinarem que também existe amizade verdade no laboratório.

Ao pessoal da Dfrito pelas conversas e ajuda, em especial à Arianny, pela extração e fracionamento da *C. pinnatifida*, essencial para o andamento do projeto.

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

Ao Dr. Rodney Alexandre Rodrigues e à Dra. Luciana K. Kohn pela participação na pré-banca e banca examinadora, respectivamente.

À Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves e à Profa. Dra. Patrícia Correa Dias pela participação na pré-banca e banca examinadora.

À Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pela orientação prestada, pelo apoio e por acreditar sempre no meu potencial, mesmo com a minha teimosia. E à Profa. Dra. Mary Ann Foglio, pelas conversas na cozinha e co-orientação, importante para o desenvolvimento desse projeto.

À Capes pela bolsa fornecida nesses dois anos de trabalho.

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

Resumo

Durante muitos séculos, as plantas originaram um grande número de agentes terapêuticos, na qual seus compostos deram origem a medicamentos ou serviram de base para a síntese dos mesmos. Atualmente a biologia do câncer tem sido muito estudada e uma das principais linhas de pesquisas nesta área é o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Partindo do princípio que plantas e drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, está claro que podem ser a fonte de novas drogas para a quimioterapia do câncer, pois, atualmente, mais de 60% delas são derivados de fontes naturais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anticâncer de uma espécie do cerrado brasileira, *Calea pinnatifida* Banks. Os extratos brutos diclorometânico (EBD) e etanólico (EBE) das folhas frescas e secas dessa espécie foram avaliados em ensaio de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais humanas. Como o EBD de folhas secas apresentou o melhor perfil de atividade *in vitro*, foi submetido a diversos procedimentos cromatográficos, sendo as frações obtidas biomonitoradas pelo teste de citotoxicidade. Esses procedimentos deram origem a diversas frações com atividade antiproliferativa com destaque para a fração acetato, fração A, C, D e neutra apolar. Com a finalidade de avaliar a biodisponibilidade do extrato este foi selecionado para avaliação em modelo de câncer murino, o tumor ascítico e sólido de Ehrlich. No modelo de tumor ascítico de Ehrlich, esse extrato apresentou atividade antitumoral através do aumento da sobrevivência dos animais. Já no modelo de tumor sólido de Ehrlich, esse extrato apresentou atividade antitumoral sistêmica, através da inibição do crescimento tumoral. Com isso, a identificação dos princípios responsáveis por essa atividade tornou-se fundamental. Esses resultados estimulam a continuidade dos estudos com a *C. pinnatifida*, com o objetivo de identificar os princípios ativos, determinar o mecanismo de ação anticâncer e comprovar sua atividade em modelos experimentais de câncer *in vivo*.

Abstract

Plants have provided a rich source of therapeutic agents for many centuries useful as themselves or the basis for synthetic drugs. Nowadays, the biology of cancer has been studied mainly for the chemoprevention drug discovery. As plants and drugs based on plants have a lot of different structures and function they could be source of new drugs for cancer chemotherapy because more than 60% of the chemotherapies used today is from natural products. This work aimed the evaluation of the anticancer activity of a Brazilian specie, *Calea pinnatifida* Banks. Dichloromethanic (DCE) and ethanolic (ECE) crude extracts obtained from fresh and dried leaves were tested in an *in vitro* cytotoxicity assay against human cancer cell lines. As long as DCE from dried leaves showed the best anticancer activity profile, it was also evaluated in a murine cancer model, the Ehrlich Ascite Tumor (EAT) and Ehrlich Solid Tumor (EST). In the EAT experiment, DCE also demonstrated an anticancer activity resulted from the increase of the survival time of the animals. Whereas in the EST experiment, this extract have systemic anticancer activity by the inhibition of the tumor growth. Therefore the isolation and identification of the active principle responsible for that activity became the major focus of this work. As a result, DCE was submitted to many chromatographic procedures which were biomonitoring by the anticancer assay *in vitro*. These chromatographic purifications originated a lot of fraction with antiproliferative activity in which the most significant are the acetate, A, C, D and non-polar fractions. These results encouraged following up on studies with *C. pinnatifida*, prioritizing the identification of active principles, the determination of anticancer mechanism of action and to prove the anticancer activity in experimental cancer models *in vivo*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	3
1. DESCOBERTA DE FÁRMACOS ANTICÂNCER	4
2. CÂNCER E O METABOLISMO CELULAR	7
3. MODELOS DE ESTUDO DE CÂNCER <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	11
4. O GÊNERO <i>CALEA</i> E SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO	15
5. METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO DE TERPENOS E ÉSTERÓIDES	17
OBJETIVOS	21
1. OBJETIVO GERAL	22
METODOLOGIA	23
1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO E ENSAIOS ANTICÂNCER <i>IN VITRO</i> DE <i>CALEA PINNATIFIDA</i> BANKS.	24
1.1. <i>Coleta</i>	24
1.2. <i>Preparação do Material Vegetal</i>	24
1.3. <i>Obtenção dos Extratos Brutos</i>	24
1.4. <i>Ensaio in vitro</i>	27
1. 4. 1. Células.....	27
1. 4. 2. Cultivo celular	28
1. 4. 3. Ensaio para a determinação da atividade anticâncer dos extratos e frações.....	29
1. 4. 4. Diluição das amostras.....	30
1. 4. 5. Determinação da citotoxicidade das amostras	30
1. 4. 6. Análise dos resultados	32
2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO	34
2.1. <i>Limpeza com Acetato de Chumbo</i>	34
2.2. <i>Cromatografia em Coluna Filtrante</i>	34
2.3. <i>Extração Ácido-base</i>	35
3. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM O EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO DE <i>C. PINNATIFIDA</i>	36

3.1. Animais	36
3.2. Toxicidade Aguda	36
3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich	37
3.4. Tumor Sólido de Ehrlich.....	40
RESULTADOS.....	41
1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO E ENSAIOS ANTICÂNCER <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>C. PINNATIFIDA</i> ..	42
1.1. Obtenção dos Extratos Brutos	42
1.1.1. Ensaio Anticâncer <i>in vitro</i> com os Extratos Brutos	43
2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO DE <i>C. PINNATIFIDA</i> E ENSAIOS ANTICÂNCER.....	50
2.1. Limpeza com Acetato de Chumbo.....	50
2.1.1. Ensaio Anticâncer <i>in vitro</i> com a fração acetato	51
2.2. Cromatografia em Coluna Filtrante	52
2.2.1. Ensaio Anticâncer <i>in vitro</i> com as frações obtidas em coluna filtrante	54
2.3. Extração Ácido-base.....	59
2.3.1 Ensaio Anticâncer <i>in vitro</i> com as frações obtidas na extração ácido-base	60
3. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM O EXTRATO BRUTO DICLOROMETÂNICO DE <i>C. PINNATIFIDA</i>	65
3.1. Toxicidade Aguda	65
3.2. Tumor Ascítico de Ehrlich	65
3.3. Tumor Sólido de Ehrlich.....	67
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	91
1. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	92
2. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA: INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY.....	94

Introdução

1. Descoberta de Fármacos Anticâncer

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte dos países desenvolvidos e se tornou uma das mais devastadoras doenças do mundo por apresentar mais de 10 milhões de casos por ano. No Brasil, estima-se que no ano de 2008 ocorrerão 466.730 novos casos da doença (INCA 2007).

O corpo humano vive em constante homeostase, fazendo com que todos os processos fisiológicos atuem em conjunto visando o bem estar geral do organismo. As células normais respondem a estímulos internos e externos, que regulam os seus processos de proliferação, diferenciação e morte celular (Alberts *et al*, 2002). O balanço entre divisão e morte celular é de importância fundamental para o desenvolvimento e manutenção dos organismos. Desordens nesse processo têm conseqüências patogênicas muito graves na embriogênese, nas doenças neuro-degenerativas e no câncer (Broker *et al*, 2005).

Atualmente, a biologia do câncer tem sido muito estudada e uma das principais linhas de pesquisas nesta área é o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Partindo do princípio que plantas e drogas derivadas de plantas têm uma impressionante variedade de estruturas e funções, está claro que podem ser a fonte de novas drogas para a quimioterapia do câncer, pois, atualmente, mais de 60% delas são derivados de fontes naturais (Pezzuto, 1997; Cragg & Newman, 2005).

Vários tumores humanos compartilham uma série de alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento maligno como auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, resistência a apoptose, potencial de replicação ilimitado,

angiogênese auto-sustentada, invasão tissular e metástase (Brown & Attardi, 2005; Fadeel & Orrenius, 2005).

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

Grande número de fitofármacos tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais através de alterações na via de transdução de sinais que modula a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a morte celular, o metabolismo e a apoptose (HemaIswarya & Doble, 2006). Exemplos são a camptotecina e seus derivados (topotecan e irinotecan) extraídos da árvore ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, que atua na inibição da topoisomerase I e atualmente é utilizada no tratamento de câncer de ovário e cólon. Semelhante à camptotecina, as epipodofilotoxinas (etoposida e teniposida), isoladas de *Podophyllum peltatum*, são substâncias inibidoras da topoisomerase II. As topoisomerase I e II são responsáveis por facilitar o descondensamento da dupla fita de DNA durante a divisão celular (Srivastava *et al*, 2005; Takimoto, 1997).

O paclitaxel, também conhecido como taxol, foi originalmente isolado da planta *Taxus brevifolia* e atualmente mais de 300 taxóides foram isolados e caracterizados de diferentes espécies do gênero *Taxus*. Enquanto os outros agentes anticâncer desestabilizam o fuso mitótico,

o taxol possui um mecanismo de ação único agindo na estabilidade da microtubulina, impedindo a separação do fuso na anáfase. O taxol mostra-se eficiente contra câncer de pulmão, ovário e mama (Srivastava *et al*, 2005, Rowinsky *et al*, 1997).

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

Diversos agentes anticâncer provenientes de organismos marinhos foram isolados, porém nenhum produto de origem marinha foi licenciado para o uso clínico como quimioterápico. O mais promissor desses agentes é a briostatina 1, isolada do briozoário *Bugula neritina*, que tem atividade em diferentes tipos de câncer. A briostatina 1 é responsável por estimular o sistema imune, aumentar a expressão da proteína p53 e induzir apoptose em células cancerígenas. Essas atividades estão associadas com a sua interação com várias proteínas quinases C (Mann, 2002).

Devido ao complexo sistema de inter-relação e cruzamento de sinais e vias na célula, há dificuldades em estabelecer fármacos que ajam em um único alvo celular promovendo seu efeito terapêutico (Sebolt-Leopold & English, 2006). Muitas vezes o desenvolvimento de mecanismos de resistência a fármacos (ou *multidrug resistance* – MDR) é o principal obstáculo para o tratamento. Para tentar driblar esse problema, a quimioterapia combinada é usada tanto para matar células resistentes quanto para retardar o desenvolvimento de células resistente a fármacos. O sucesso atribuído a esse tipo de tratamento ocorre por diferentes fármacos apresentarem diferentes mecanismos de ação, diferentes níveis de toxicidade e por serem capazes de bloquear dois ou mais pontos da via bioquímica (HemaIswarya & Doble, 2006).

2. Câncer e o metabolismo celular

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

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

A falta desses sinais para a sobrevivência da célula, aliada aos sinais de degeneração, podem levá-la à morte celular programada, que é um evento natural, discreto e prevalente nos organismos multicelulares. A apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico que permite o controle do número de células no indivíduo e, assim, sua homeostase (Plas & Thompson, 2002). O mecanismo anticâncer mais procurado atualmente é o de indução seletiva à apoptose, levando apenas células malignas à morte (Subhashini *et al*, 2005).

A apoptose é uma seqüência de eventos morfológicos em que a morte celular gera a condensação de seu citoplasma e núcleo, com formação de vesículas a partir de sua membrana plasmática (corpos apoptóticos), a exposição de resíduos de fosfatidilserina em sua membrana e a

fragmentação internucleossomal do DNA, em múltiplos de 180pb (pares de base) (Higuchi, 2004; Zhang & Xu, 2002). O processo apoptótico não induz inflamação, fato importante na reciclagem dos tecidos adultos e na embriogênese (Fadeel & Orrenius, 2005).

A ativação de proteases aspartato-específicas, conhecidas como caspases, possui um importante papel na indução da apoptose. Destaca-se nesse processo a caspase-3, molécula comum na maioria das vias apoptóticas em diferentes tipos celulares (Lewis *et al*, 2003). Apesar da morte celular ocorrer sem a presença das mesmas, as características morfológicas que definem a apoptose dependem da ativação de caspases (Ghobrial *et al*, 2005). Além da apoptose via caspases, no câncer diversas vias de transdução de sinais são bloqueadas por fármacos, resultando no seu controle e combate (HemaIswarya & Doble, 2006).

Fatores de crescimento e seus receptores estão envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além disso, são super-expressos em células tumorais humanas. A família dos receptores de fatores de crescimento endotelial é a mais estudada por serem encontrados em estágios avançados de câncer com baixo prognóstico. Por esse motivo, o bloqueio desses receptores com anticorpos monoclonais, por exemplo, aparece como adjuvante no tratamento tumoral (Salomon *et al*, 1995; Bianco *et al*, 2006).

A cascata de transdução de sinais ativada por fatores de crescimento, citocinas e hormônios é mediada através de uma proteína codificada pelo oncogene Ras, cuja ativação media a proliferação celular e a supressão da apoptose. Diversos antagonistas às proteínas Ras são usados no tratamento de câncer e o mais comum deles é o Sorafenib, ativo principalmente em estágios avançados de câncer renal (Bianco *et al*, 2006).

O bloqueio da ciclooxigenase (COX) e da cascata de prostaglandinas pode ter importante impacto no crescimento e no desenvolvimento neoplásico através da inibição da proliferação, angiogênese e metástase (HemaIswarya & Doble, 2006). A angiogênese é um processo complexo

que representa uma etapa crítica na progressão tumoral. Esse processo não é só importante para o crescimento do tumor, mas também para a sua capacidade invasiva de migrar para outros tecidos formando metástase (Folkman, 2003; Bianco *et al*, 2006).

Para ultrapassar um tamanho crítico ou invadir outros órgãos, o tumor necessita recrutar uma rede de novos vasos que são regulados por moléculas pró e anti-angiogênicas. Embora seja um processo complexo, essa sinalização depende principalmente do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que geralmente representa o limite para a etapa patológica da angiogênese (Ferrara *et al*, 2003). A super-expressão de VEGF pode indicar baixo prognóstico de câncer nos mais diversos tipos, incluindo carcinomas de mama, rim, cólon e próstata (Tortora *et al*, 2004; Bianco *et al*, 2006).

O ciclo celular é completamente regulado para encadear o processo normal de divisão celular. Os pontos de verificação nas fases G1 e G2 são responsáveis pelo prosseguimento do ciclo celular e são regulados por uma série de proteínas quinases como as CDK (quinases dependentes de ciclina) (HemaIswarya & Doble, 2006). Quando algum tipo de anormalidade é reconhecida, o ciclo celular pára até a completa reparação celular. Caso essa reparação não seja eficiente, a célula é encaminhada para a morte celular programada (Alberts *et al*, 2002). No câncer, as células são incapazes de pausar em ambos os pontos de verificação, resultando em desregulação do ciclo celular (HemaIswarya & Doble, 2006).

A degradação seletiva de proteínas também é fundamental para regulação dos processos celulares vitais e a via ubiquitina-proteossomo é o principal regulador desse processo. A inibição proteossômica é uma das características das células tumorais que estimulam a liberação de fatores anti-apoptóticos, como o fator nuclear κB (NF- κB) (Adams, 2004; Bianco *et al*, 2006). A via de ativação do NF- κB apresenta importante função na patogênese de diversas doenças inflamatórias

como o câncer, diabete, artrite reumatóide e aterosclerose (Baldwin, 2001). O NF- κ B se liga a sítios específicos κ B na região promotora de diversos genes, como ciclina D1, proteínas supressoras de apoptose como a Bcl-2 e Bcl-X e aquelas requeridas na metástase e na angiogênese, tornando-se um alvo ideal no desenvolvimento de fármacos anticâncer (Subhashini *et al*, 2005; HemaIswarya & Doble, 2006).

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

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

Porém a atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Nesse último modelo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são obtidas, enquanto em testes *in vitro* esses dados não podem ser obtidos. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão mais definitiva a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (Smith *et al*, 2005).

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

Tabela 1. Linhagens Celulares Tumorais Humanas utilizadas nos Ensaio de Atividade Anticâncer *in vitro*.

Sigla	Nome	Características
MCF-7 ^a	adenocarcinoma de mama	Produz proteínas insulina like (liga fatores de crescimento) ¹ ; e superexpressa gene P2P-R ² ; TNF- α inibe seu crescimento ¹
NCI-ADR/RES ^{a,16}	adenocarcinoma de ovário resistente a multidroga	Perdeu o receptor de estrógeno ¹ ; expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) ³ traduzindo para glicoproteína-P que confere essa capacidade ⁴ ; proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas ⁵
NIH: OVCAR-3 ^b	adenocarcinoma de ovário	Possui receptores de estrógeno, andrógeno e progesterona e poucos cromossomos normais representados; adequada em estudos de câncer ovariano e avaliação da terapia hormonal ¹ ; alta produção da enzima 24-OHase e baixa de 1- α OHase ⁶
PC-3 ^b	adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase; sem cromossomo Y normal detectado ¹ ; é uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos ⁷
786-O ^b	adenocarcinoma de rim	Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoidiano ⁸ ; mutações no gene HVL e da prolina oxidase ⁹ propiciam a formação do tumor ¹⁰
K-562 ^c	leucemia mielóide crônica	Células altamente indiferenciadas (blastos multipotentes) que podem se diferenciar em progenitores das séries eritrocítica, granulocítica e monocítica ¹ ; há o gene fusionado Bcr-abl impedindo sua apoptose ¹¹
UACC-62** ^a	melanoma	Originária de melanócitos ¹
HT-29 ^d	adenocarcinoma colorretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2 ¹²
NCI-H460 ^d	Adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células	Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metástico ¹³ ; com características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas ¹⁴ ; é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico ¹⁵

Legenda: Tecido de Origem: ^aEctoderme; ^bMesoderme; ^cMesênquima; ^dEndoderme. Todas as células são aderidas, exceto a K-562*, que é em suspensão. Todas as linhagens apresentam morfologia epitelial, à exceção da K-562* (morfologia linfoblástica) e UACC-62** (morfologia fibroblástica). ¹Disponível online no site do ATCC: www.atcc.org/SearchCatalogs/lo.cfm? Consultado dia 09/12/2007. ²Gao & Scott, 2003; ³Yang *et al*, 2003A; ⁴Xu *et al*, 2002; ⁵Weinstein-Oppenheimer *et al*, 2002; ⁶Miettinen *et al*, 2004; ⁷van Bokhoven *et al*, 2003; ⁸Thiede *et al*, 1988; ⁹Iliopoulos *et al*, 1995; ¹⁰Maxwell & Riviera, 2003; ¹¹Cen *et al*, 2002; ¹²His *et al*, 2000; ¹³Takahashi *et al*, 2002; ¹⁴Schüller *et al*, 1987; ¹⁵Yang *et al*, 2003B; ¹⁶Liscovich & Ravid, 2007.

Quanto aos modelos de estudo *in vivo* para atividade anticâncer, o tumor de Ehrlich é um modelo de tumor murino, prático e transponível para a análise de efeitos antineoplásicos de diversos compostos. Esse tumor foi isolado de um adenocarcinoma mamário murino e pode se manifestar de duas maneiras, a forma ascítica (inoculação de células via intraperitoneal) ou a forma sólida (inoculação via subcutânea) (Nascimento *et al*, 2006).

O tumor de Ehrlich é um carcinoma de rápido crescimento com comportamento muito agressivo. É capaz de crescer em todas as linhagens de camundongos sugerindo que o controle do tumor de Ehrlich esteja relacionado com a imunidade inata, especialmente a resposta inflamatória, ao invés da resposta imune celular (linfócitos T) (Nascimento *et al*, 2006).

Foi demonstrado que a resposta neutrofílica inflamatória é essencial para o controle do tumor de Ehrlich. Entretanto, o grande influxo dessas células para a região promove o crescimento tumoral devido à angiogênese e aos fatores de crescimento induzidos pela resposta inflamatória e que são necessários para o desenvolvimento do tumor (Bergami-Santos *et al*, 2004).

Após a inoculação intraperitoneal dessas células, o volume da ascite e o número de células aumentam progressivamente e rapidamente (Vincent & Nicholls, 1967). A ascite se forma provavelmente pela indução de inflamação, aumentando a permeabilidade vascular do peritônio (Fastaia *et al*, 1976). Os camundongos com esse tumor morrem após um curto período de tempo devido a diversos fatores como a pressão mecânica exercida pelo fluído ascítico e a hemorragia intraperitoneal (Mayer, 1966; Hartveit, 1965). Além disso, a progressão do tumor de Ehrlich é caracterizada por profundas alterações na resposta imune, levando a um quadro de declínio da imunocompetência do organismo (Melo *et al*, 2004).

O tumor ascítico de Ehrlich provoca uma inflamação local, com aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema intenso, migração celular e formação progressiva

de mais fluido ascítico. Esse fluido que permanece na cavidade peritoneal murina é essencial para o crescimento do tumor, sendo fonte de nutrientes para as células tumorais (Nascimento *et al*, 2006). A inflamação local é gerada também pela presença de prostaglandinas E_2 , notadamente aumentadas em casos de tumores malignos em geral (Salgado Oloris *et al*, 2002).

O modelo de tumor sólido de Ehrlich tem como função a análise da atividade anticâncer sistêmica do fármaco, já que no tumor ascítico a administração da substância teste ocorre, assim como as células tumorais, na cavidade peritoneal (Nascimento *et al*, 2006). Com isso, a triagem de possíveis novas drogas anticâncer torna-se mais eficaz devido à presença de um “sistema de modelos”, que é composto por diferentes modelos tumorais, com a finalidade de selecionar o maior número possível de drogas com ação anti-neoplásica (Suggitt *et al*, 2005).

4. O gênero *Calea* e seu potencial farmacológico

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

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

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

Já a *Calea pinnatifida*, conhecida popularmente como cipó cruz do norte ou aruca, é encontrada na região do cerrado brasileiro e tem seu emprego popular como estomacal e no tratamento da disenteria amebiana. Pertencente à família Asteraceae, nas suas folhas foram encontrados poliacetileno, ácido anísico, glicosídeo do ácido p-hidroxibenzóico, sitosterol e germacranolídeos (Ferreira *et al*, 1980).

Além das atividades descritas para as diferentes espécies do gênero *Calea*, os germacranolídeos também apresentam diversas atividades como indução da apoptose em cultura de células tumorais, citotoxicidade, atividade antifúngica e atividade inibitória do fator NF- κ B, tornando-se a substância mais promissora para o desenvolvimento de drogas anticâncer, dentre as descritas para a espécie *Calea pinnatifida* (Matsuura *et al*, 2005; Yamada *et al*, 2004; Bork *et al*, 1997; Rivero *et al*, 2003; Nakagawa *et al*, 2005).

5. Metabolismo Vegetal Secundário de Terpenos e Esteróides

Na maioria das células e organismos, as rotas metabólicas de síntese, degradação e interconversão das moléculas essenciais, bem como as reações que visam a conservação de energia, fazem parte do metabolismo primário. As rotas metabólicas secundárias não são tão gerais e podem ser ativadas apenas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse, causado por limitações nutricionais ou ataque microbiológico (Santos, 1999).

Os terpenos e esteróides são originários do colesterol através de duas vias diferentes: uma via dependente e outra independente do mevalonato. O mevalonato é formado da condensação do acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após diversas reações químicas o mevalonato dá origem a uma molécula de isopreno (C5), que origina um hemiterpeno (C5), que ao serem somados dão origem aos outros terpenóides: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), e assim por diante (Figura 1) (Dewick, 2006).

A via independente do mevalonato é a via do deoxixilulose fosfato que é formado a partir da via glicolítica com o ácido pirúvico e o glutaraldeído-3-fosfato como intermediários. Essa via também resulta em uma molécula de isopreno (C5) (Figura 2). Os animais só apresentam a via do mevalonato, enquanto as plantas apresentam as duas. Nas plantas, essas vias são compartimentalizadas; as enzimas da via do mevalonato estão no citosol, enquanto as enzimas da via deoxixilulose fosfato estão no cloroplasto. Com isso, na maioria das vezes, os triterpenóides e esteróides (produtos citosólicos) são formados pela via do mevalonato e os outros terpenóides são formados no cloroplasto pela via independente de mevalonato (Dewick, 2006).

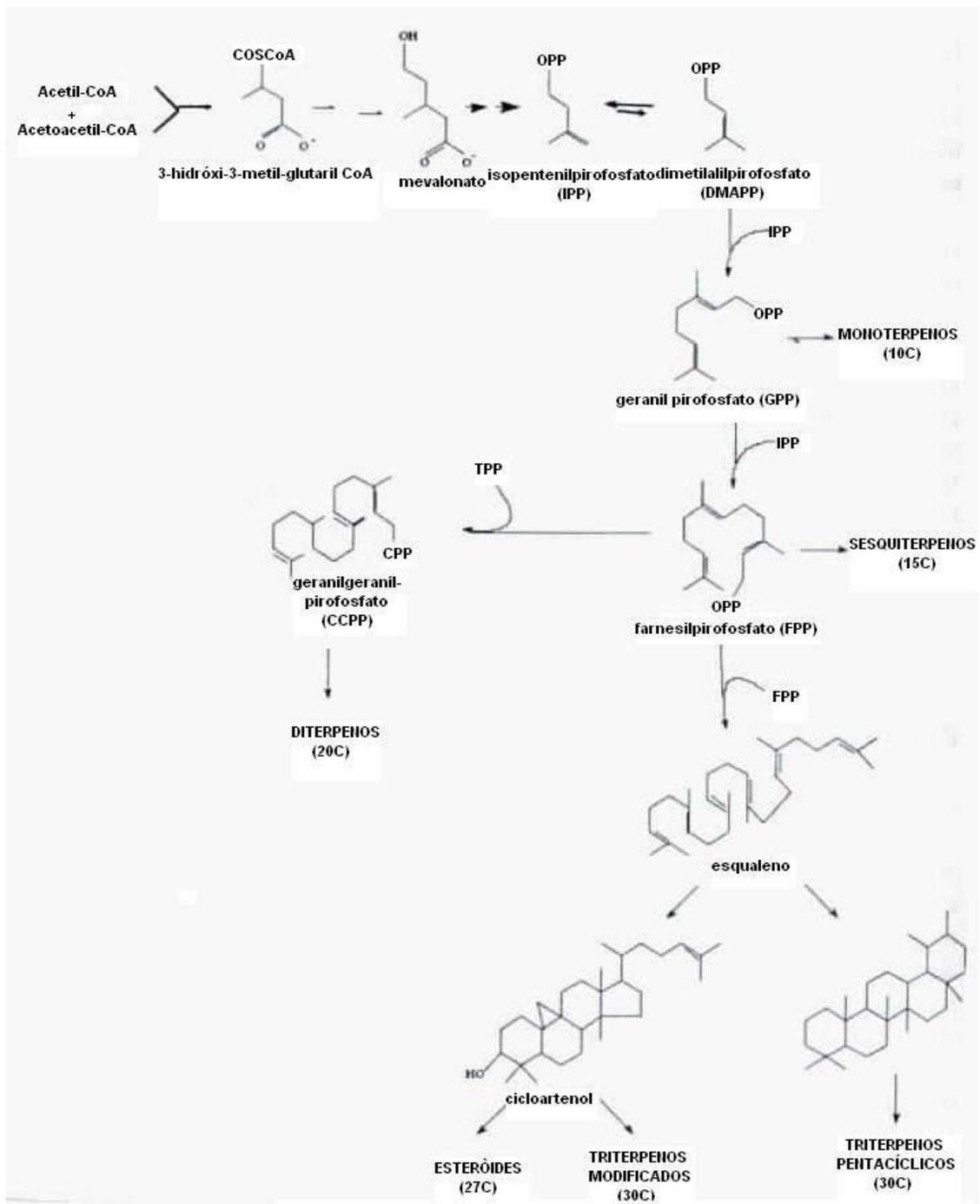


Figura 1. Biossíntese de terpenóides e esteróides: Via do mevalonato.

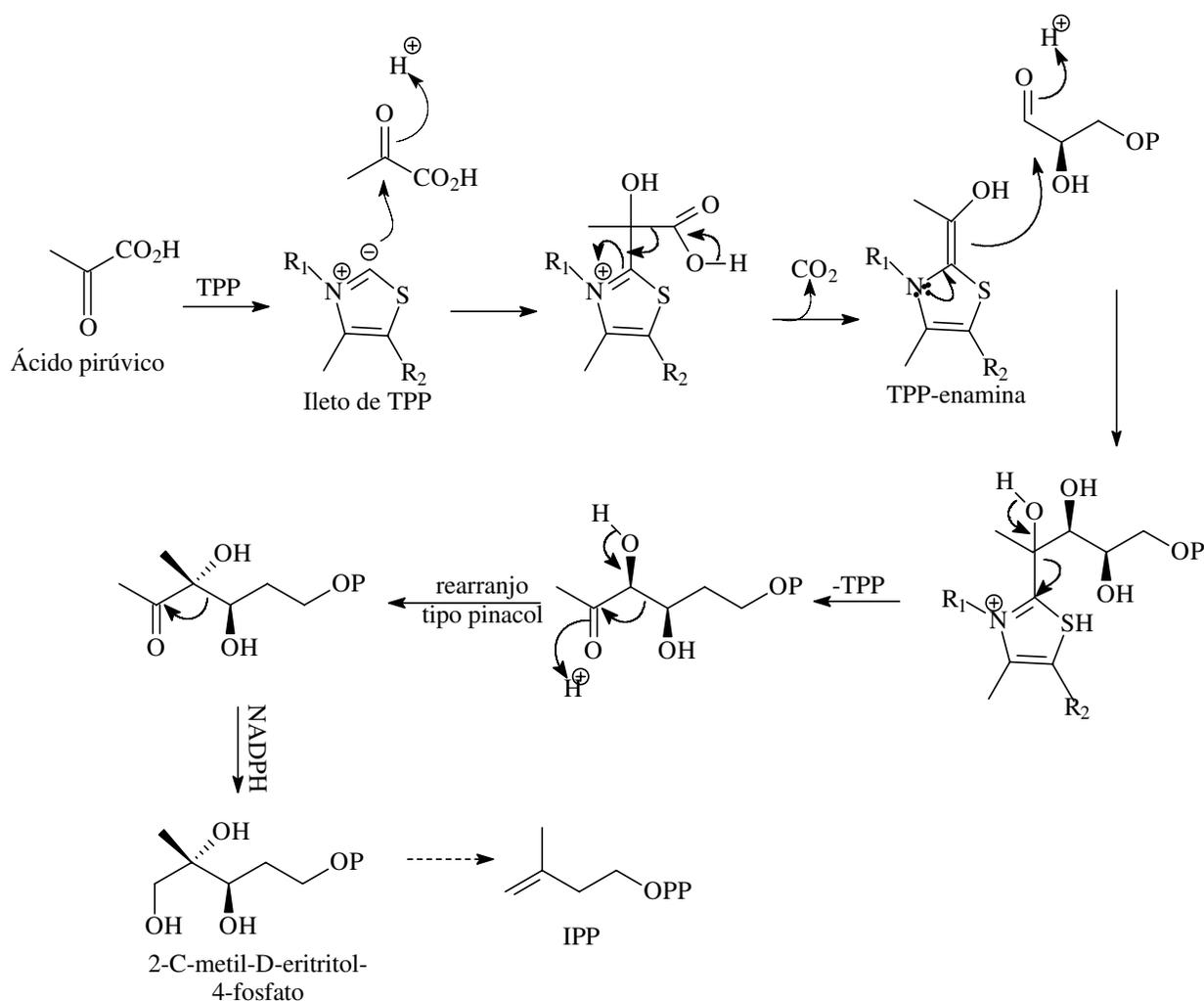


Figura 2. Biossíntese de terpenóides e esteróides: Via independente de mevalonato.

Diversos terpenos apresentam atividade anticâncer, sendo o principal deles é o taxol. Extraídos da planta *Taxus brevifolia*, os taxóides são diterpenos (C₂₀) usados no tratamento de câncer de mama, pulmão, ovário e próstata, que agem nos microtúbulos impedindo a proliferação celular (Montero *et al*, 2005). Além dos taxóides, o partenolídeo, uma lactona sesquiterpênica classificada de germacranolídeo devido a presença do cátion germacril, inibe o fator nuclear B, importante na indução da apoptose (Dewick, 2006, Bork *et al*, 1997).

Os liminóides são triterpenos encontrados em frutos cítricos que também apresentam atividade anticâncer quimiopreventiva como, por exemplo, a obacunona que inibe a proliferação celular em linhagens de células tumorais humanas e age contra modelos animais de câncer de pulmão, cólon, oral, pele e mama (Roy & Saraf, 2006).

Objetivos

1. Objetivo geral

Avaliar a atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Calea pinnatifida* Banks.

1. 1. Objetivos Específicos

1. Selecionar os extratos com maior atividade citotóxica em cultura de células tumorais humanas;
2. Purificar e isolar os compostos que possuem atividade anticâncer *in vitro* através do biomonitoramento.
3. Comprovar a atividade em animais com tumores ascítico e sólido de Ehrlich;

Metodologia

1. Processamento Fitoquímico e Ensaio Anticâncer *in vitro* de *Calea pinnatifida* Banks.

1.1. Coleta

Foram utilizadas partes aéreas (folhas) da espécie vegetal *Calea pinnatifida* Banks coletadas na coleção de plantas medicinais do CPQBA/UNICAMP em setembro de 2006.

1.2. Preparação do Material Vegetal

Parte do material fresco de *Calea pinnatifida* foi moído com gelo seco em moinho de facas (Stephen, modelo UM40). Outra parte do material foi seco em estufa (Fabbe, modelo 170) com ventilação a 45°C e moído em triturador de facas (Metalúrgica Roma, modelo MR-30).

1.3. Obtenção dos Extratos Brutos

As folhas frescas (8g) e secas (10g) de *Calea pinnatifida* foram extraídas com 50mL de diclorometano (Merck[®], Darnstadt, Germany) durante 3 minutos, no dispersor, por três vezes consecutivas. Os filtrados recolhidos foram misturados, tratados com Na₂SO₄ anidro, filtrados e evaporados sob vácuo a 40°C até a completa eliminação do diclorometano, resultando no extrato bruto diclorometânico das folhas frescas (EBDF) e no extrato bruto diclorometânico das folhas secas (EBDS). Os resíduos vegetais do processo de maceração com diclorometano foram retomados e submetidos a novo processo de maceração com 50mL de etanol 95% (Merck[®], Darnstadt, Germany) durante 3 minutos, no dispersor, por três vezes consecutivas. Os filtrados

foram recolhidos e evaporados sob vácuo a 55°C até a completa eliminação do etanol, sendo posteriormente liofilizados, obtendo-se o extrato bruto etanólico das folhas frescas (EBEF) e o extrato bruto etanólico das folhas secas (EBES). Estes procedimentos foram repetidos estão esquematicamente ilustrados na Figuras 3.

Como o extrato bruto diclorometânico da folhas secas de *C. pinnatifida* apresentou melhor atividade antiproliferativa *in vitro*, deu-se continuidade ao processamento fitoquímico apenas com esse extrato, que passou a ser extraído a quente (EBD). Então, 350g de folhas secas de *C. pinnatifida* foram submetidos ao processo de extração a quente no Soxhlet, com 750mL de diclorometano (Merck[®], Darnstadt, Germany) durante 48 horas. Os filtrados recolhidos foram misturados, filtrados e evaporados sob vácuo a 40°C. Estes procedimentos também estão esquematicamente representados na Figura 4.

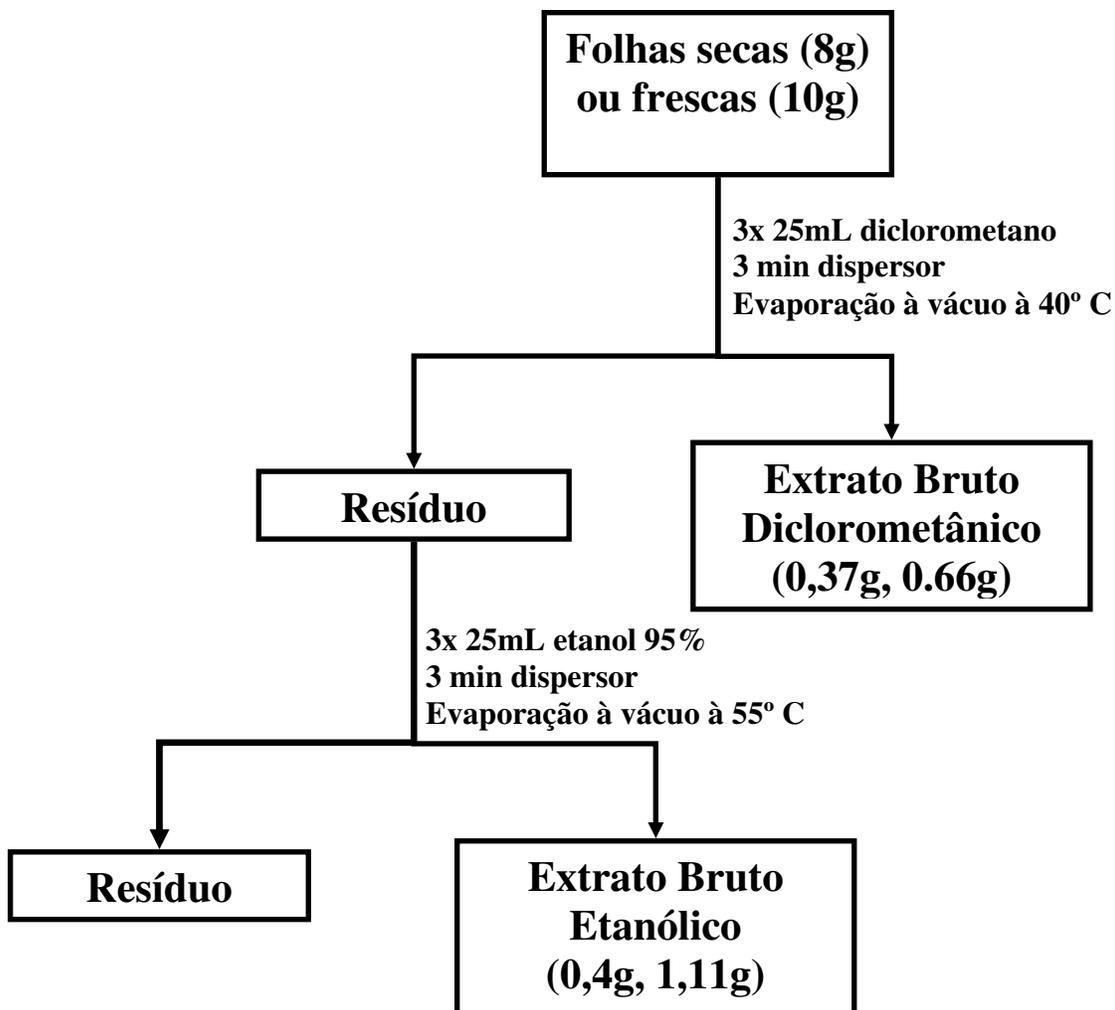


Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos brutos a frio.

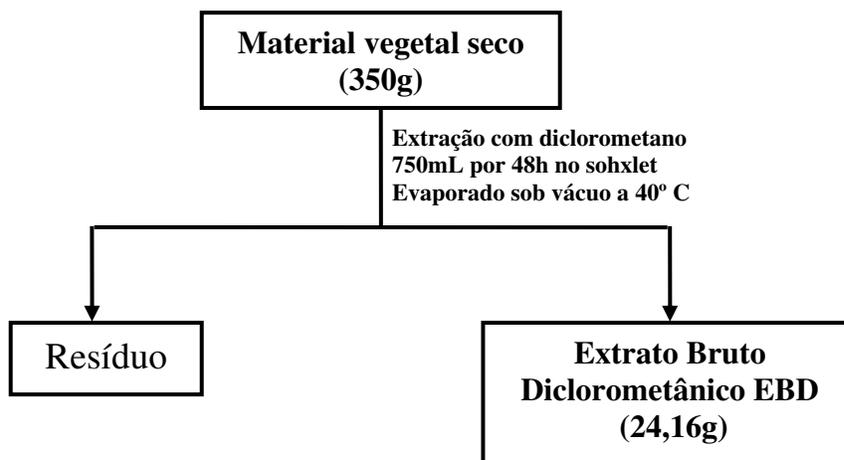


Figura 4. Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto diclorometânico seco (EBD) a quente.

1.4. Ensaios *in vitro*

1.4.1. Células

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos Estados Unidos. Todos os procedimentos abaixo foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2).

Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi mantido à temperatura ambiente, e seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15mL. O volume foi completado para 10mL com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco[®], NY, USA) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®], NY, USA) e centrifugado a 2000rpm (rotações por minuto) por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado contendo as células foi

ressuspendido cuidadosamente para evitar a formação de grumos, em 5mL de RPMI/SFB. A solução (5mL) celular foi transferida para frascos de manutenção de 25cm³ (T25) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, em ambiente úmido. As linhagens são as descritas na Tabela 1 do capítulo 1 desta dissertação.

1. 4. 2. Cultivo celular

As células foram mantidas em frascos de 25cm³, com 5mL de meio RPMI/SFB e repicadas quando a monocamada celular atingia cerca de 80% de confluência (ou seja, uma vez por semana) em meio RPMI/SFB. Para as células em suspensão (K562 - leucemia) o repique era realizado pela retirada de um volume previamente determinado de um frasco de manutenção e transferido para outro, sendo completado o volume para 5mL, no caso de frascos de culturas de 25cm² (T25) e 10mL para os frascos de 75cm² (T75). A diluição utilizada foi dependente das características de cada linhagem celular ou ainda dos objetivos dos experimentos realizados. Estes frascos foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Para células aderidas, cujo crescimento ocorre em monocamada, foi necessária a tripsinização, ou seja, o despreendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática. Após a aspiração do meio de cultura, foram adicionados 500µL de tampão de Hank's (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, USA) banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido foi aspirado e então adicionado 500µL de tripsina-EDTA (2,5g/L) a 37°C. O frasco foi incubado de 25 a 30 segundos, sendo logo em seguida banhado com RPMI/SFB. A partir deste

ponto, quando as células se apresentaram em suspensão, foi utilizado o mesmo procedimento para as células leucêmicas.

1. 4. 3. Ensaio para a determinação da atividade anticâncer dos extratos e frações

A avaliação da atividade anticâncer foi realizada em nove linhagens tumorais humanas, sendo plaqueados 100µL de células, em placas de 96 compartimentos, em meio RPMI/SFB/gentamicina (50µg/mL), nas suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 2), determinadas na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP. Cada placa continha apenas uma linhagem, sendo possível a avaliação de cinco amostras distintas, exceto uma placa de controle celular (T₀). Antes da adição das amostras, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 2. Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios anticâncer.

Linhagem Celular	Nome	Densidade de Inoculação
Pulmão	NCI-H460	4,0x10 ⁴ células/mL
Mama	MCF-7	6,0 x10 ⁴ células/mL
Ovário com Fenótipo Resistência Multidroga	NCI-ADR/ RES	5,0 x10 ⁴ células/mL
Cólon	HT-29	4,0 x10 ⁴ células/mL
Próstata	PC-3	5,0 x10 ⁴ células/mL
Melanoma	UACC-62	5,0 x10 ⁴ células/mL
Ovário	OVCAR-3	7,0 x10 ⁴ células/mL
Renal	786-O	4,5 x10 ⁴ células/mL
Leucemia	K-562	4,0 x10 ⁴ células/mL

1. 4. 4. Diluição das amostras

Cinco diferentes extratos de *C. pinnatifida* (EBDF, EBEF, EBDS, EBES e EBD) e frações foram submetidos ao ensaio de atividade antiproliferativa sendo diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, USA) na concentração de 0,1g/mL, resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Após a diluição, 100µL do extrato ou fração a ser testado foram adicionados à placa de 96 compartimentos, exceto na T₀ (placa controle), nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. Neste momento, também se realizou a fixação da placa T₀ pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (Merck[®], Darnstadt, Germany) determinando assim, a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas. Os desenhos das placas controle (T₀) e placa tratada estão ilustrados nas Figuras 5 e 6.

As demais placas foram incubadas por 48 horas e, após este período, o experimento foi interrompido através da fixação das células pela adição de 50µL de TCA a 50%, e incubação por 1 hora a 4°C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

1. 4. 5. Determinação da citotoxicidade das amostras

Para determinar a quantidade de células após 48 horas de tratamento, as células fixadas foram coradas com 50µL de sulforradamina B (SRB) (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, USA)

(corante protéico) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, por 30 minutos a 4°C. As placas foram lavadas por 3 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150µL de Trizma Base (10µM) (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, USA). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em leitor de microplacas a 540nm. A sulforrodamina B é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (Skehan *et al*, 1990).

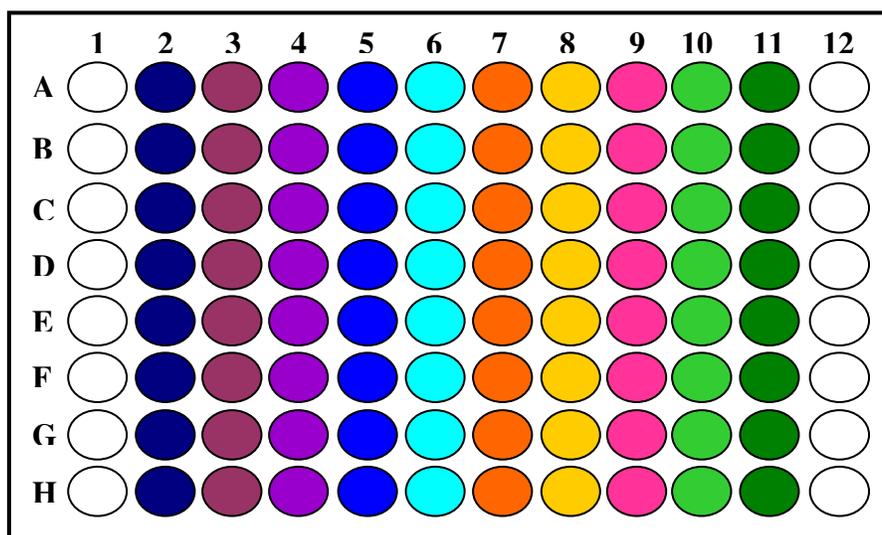


Figura 5. Placa Controle T₀. ● : Branco (contendo apenas meio de cultura).

Colorido: células (cada coluna corresponde a uma linhagem em uma densidade de inoculação).

Colunas 3: **UACC-62 (melanoma)**, 4: **MCF-7 (mama)**, 5: **NCI-ADR/RES (ovário resistente)**, 6:

NCI-H460 (pulmão), 7: **786-O (rim)**, 8: **PC-03 (próstata)**, 9: **OVCAR-03 (ovário)**, 10: **HT-29**

(côlon), 12: **K-562 (leucemia)**.

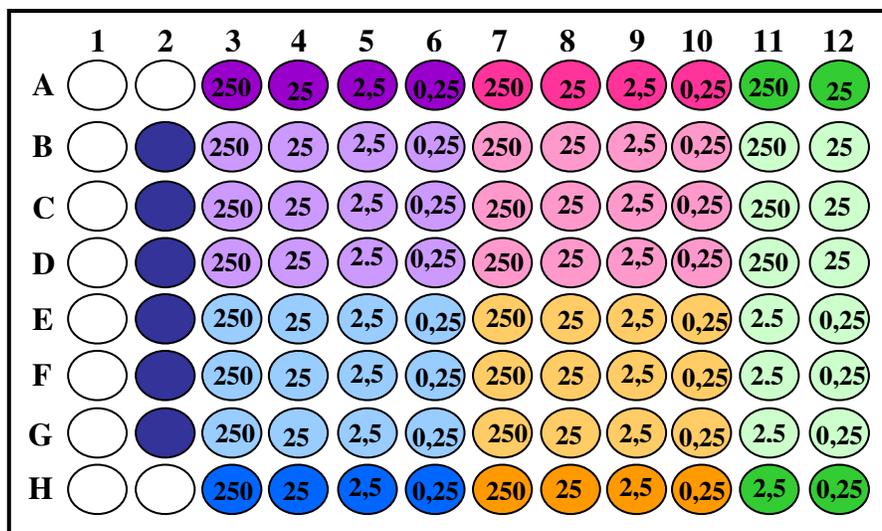


Figura 6. Placa Teste. ○ : Branco do Teste ● : Branco das Células (células). Disposição das amostras e suas respectivas concentrações.

● ₁ Amostra 1: <i>C. pinnatifida</i> EBDF	● ₁ Branco da Amostra 1
● ₂ Amostra 2: <i>C. pinnatifida</i> EBEF	● ₂ Branco da Amostra 2
● ₃ Amostra 3: <i>C. pinnatifida</i> EBDS	● ₃ Branco da Amostra 3
● ₄ Amostra 4: <i>C. pinnatifida</i> EBES	● ₄ Branco da Amostra 4
● ₅ Amostra 5: <i>C. pinnatifida</i> EBD	● ₅ Branco da Amostra 5

1. 4. 6. Análise dos resultados

Com os dados de absorvância foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de inibição ou morte celular com a concentração de extrato ou fração. Além disso, foram calculadas as médias das absorvâncias descontadas de seus respectivos brancos e através das fórmulas a seguir, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresentou IC.

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

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

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T_0 é o controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de crescimento. Com esses resultados foram produzidos gráficos relacionando a concentração da amostra e seu efeito. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50% e ainda de forma dose dependente, preferencialmente apresentando seletividade para os tipos celulares.

Através da regressão sigmóide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento, são calculados os valores TGI (*total growth inhibition*), ou seja, concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. Esses valores são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciando a seletividade.

2. Fracionamento do Extrato Bruto Diclorometânico

2.1. Limpeza com Acetato de Chumbo

O EBD (m=250mg) de *C. pinnatifida* foi dissolvido em 10mL de etanol P.A. (Merck[®], Darnstadt, Germany) com ajuda do ultrassom. Em seguida, adicionou-se 50mL de solução básica de acetato de chumbo a 10% (5g de acetato de Pb em 50 ml de água). A mistura foi deixada na geladeira (4° C) durante 24h e em seguida foi filtrada à vácuo em funil de placa porosa preenchido com 10g de celite.

A fase aquosa foi extraída com acetato de etila por 3x, dando origem à fração acetato.

2.2. Cromatografia em Coluna Filtrante

O EBD (m=4g) de *C. pinnatifida* foi fracionado por cromatografia em coluna filtrante utilizando sílicagel G60 (Merck[®], Darnstadt, Germany) como fase estacionária na proporção extrato:sílica de 1:3, empacotada em coluna de vidro (diâmetro=2cm). Duas colunas foram realizadas e foram eluídas com o seguinte gradiente de eluição (em %): hexano/diclorometano 20:80; diclorometano 100; diclorometano/metanol de 99,5:0,5 e na seqüência com aumentos de 0,5% de metanol, até atingir a proporção de diclorometano/metanol 96:4, sendo no final a coluna eluída com metanol 100%. Foram obtidas quinze frações que foram reunidas em cinco grupos. Foram aplicadas as frações em cromatoplasmas de sílicagel 60 GF₂₅₄ (Merck) (CCD) e eluídas com uma mistura de diclorometano/metanol 2%. A separação dos componentes foi visualizada com anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50:1:0,5).

2.3. Extração Ácido-base

A fração D, proveniente da coluna filtrante, foi submetida a uma extração ácido base, pois apresentou a melhor atividade antiproliferativa *in vitro*. O esquema para essa extração está representado na Figura 7. A fração ácida, a básica e a neutra apolar foram submetidas ao ensaio antiproliferativo *in vitro*.

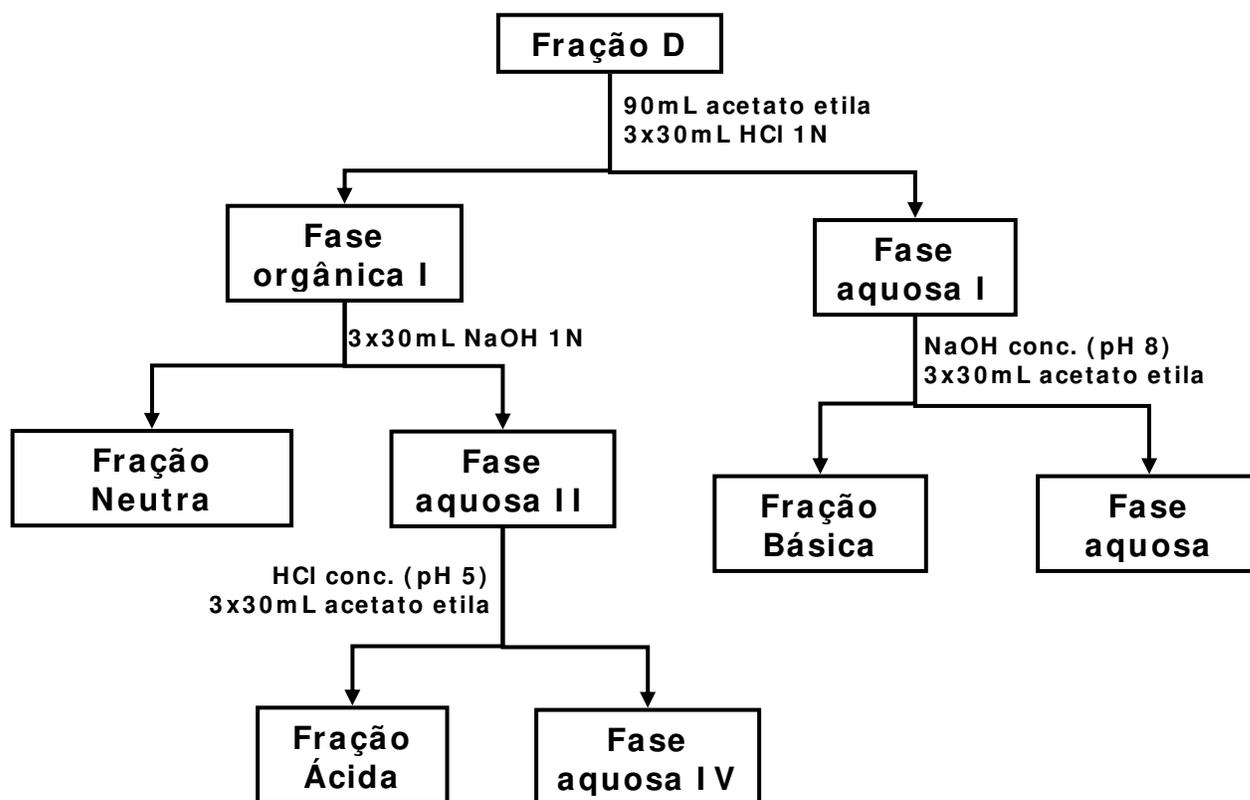


Figura 7. Fluxograma do processo de extração ácido-base da fração D.

3. Ensaio *in vivo* com o Extrato Bruto Diclorometânico de *C. pinnatifida*

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos (linhagens *Swiss*), obtidos do CEMIB (Centro multidisciplinar para a investigação biológica - UNICAMP), cujos grupos experimentais serão mantidos em gaiolas individuais identificadas. A sala apresentou temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ com unidade relativa do ar entre 30 e 70%, com ração e água fornecidos *ad libitum*. Antes do início dos testes os animais foram identificados e examinados, sendo rejeitados aqueles que apresentassem quaisquer alterações de comportamento. Os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, através do protocolo 1421-1 (Anexo 1).

3.2. Toxicidade Aguda

Camundongos (*Swiss*) machos foram tratados, pela via intraperitoneal, com doses crescentes do EBD de *C. pinnatifida* (100, 200, 300, 500 mg/Kg) e após a administração foram mantidos em observação por um período mínimo de 14 dias. O número de animais mortos para cada uma das doses foi anotado e a DL_{50} calculada pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949). Com esses dados foi possível estabelecer as doses que foram utilizadas para avaliação da atividade nos modelos de câncer murino.

3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich

O teste para avaliação do potencial anticâncer *in vivo* do EBD de *C. pinnatifida* foi realizado no modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) (Vicent & Nicholls, 1967). As células de TAE foram descongeladas, ressuspensas em tampão fosfato salina (PBS) e centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para que cada animal recebesse $1,0 \times 10^4$ células numa proporção em 0,5mL (via intraperitoneal). Dois animais receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias foram sacrificados por deslocamento cervical, seu líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, dado que a quantidade celular agora era muito maior que a inoculada.

Para 2mL de líquido ascítico coletados foram adicionados 2mL de ficol (Ficol-Paque Plus, Amersham Pharmacia[®], Uppsala, Sweeden) e a mistura centrifugada a 2500rpm por 15min a 18°C. O anel celular formado foi coletado e submetido à nova centrifugação, nas mesmas condições, mas ressuspendido em PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet livre de hemáceas e células brancas foi ressuspendido em solução salina 0,9%, em quantidade suficiente para a inoculação de $1,0 \times 10^5$ células/0,5mL em cada animal.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: solução salina 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorrubicina (5 mg/kg) como controle positivo e EBD de *C. pinnatifida* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, com 10 animais por grupo. O tratamento foi iniciado no terceiro dia pós inóculo, sempre pela via intraperitoneal. Os animais foram monitorados diariamente e no décimo e no décimo sétimo dia pós inóculo, os animais foram novamente tratados e o tempo total de observação do experimento foi totalizado em 90 dias.

Diariamente, os animais foram analisados através apenas de observação e pontuados segundo a Tabela 3, na qual foram verificados sinais físicos, clínicos e comportamentais. Se algum animal obtivesse 14 pontos, o mesmo era eutanasiado por deslocamento cervical e a necropsia realizada, segundo protocolos que seguem os direitos internacionais dos animais (Ullman-Cullere & Foltz, 1999). A análise estatística da sobrevivência dos animais foi realizada por ANOVA e as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo modelo de avaliação não paramétrica de Kaplan-Meier (GraphPad Prism Software[®])

Tabela 3. Quesitos Observados para Avaliação Diária do TAE.

Quesito	Observação	Pontuação
Aparência	Normal	0
	Pelos sem brilho, orelhas normocoradas.	1
	Ligeira Piloereção, orelhas ligeiramente pálidas.	2
	Piloereção, postura encurvada, orelhas pálidas.	3
Sinais Clínicos	Temperatura, frequência cardíaca e respiração normais.	0
	Discretas alterações, abdômen ligeiramente dilatado.	1
	Moderada dilatação do abdômen	2
	Acentuada dilatação do abdômen, dispnéia.	3
Comportamento	Normal	0
Espontâneo	Ligeiras alterações	1
	Menos móvel e alerta, isolado.	2
	Vocalização, hiperatividade/ imóvel, letárgico.	3
Comportamento	Normal	0
Provocado	Ligeira depressão ou resposta exacerbada	1
	Alterações moderadas	2
	Reações violentas/ muito fracas e precomatosas	3
Ajuste de Pontuação	Se for registrado 3 mais de uma vez, marcar um ponto adicional para cada 3.	2-4
TOTAL	< 14 pontos – sobrevida/ > 14 pontos – eutanásia (deslocamento cervical)	

3.4. Tumor Sólido de Ehrlich

Foram coletados 2mL de líquido ascítico do animal doador, adicionados 2mL de ficoll e a mistura centrifugada a 2500rpm por 15 min a 18°C. Foi formado um anel celular, o qual foi coletado e submetido à centrifugação, nas mesmas condições, após ser ressuspensionado em PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet livre de hemácias e células brancas foi ressuspensionado em PBS, em quantidade suficiente para a inoculação de 1×10^5 células/ 0,1 mL em cada animal, por via subcutânea, na região antero-dorsal.

Os animais foram separados em grupos de 7 animais por grupo e o tratamento iniciado assim que o tumor sólido se tornou evidente (8 dias). Os animais foram tratados com solução salina 0,9% (controle negativo), doxorubicina na dose de 5,0mg/Kg (controle positivo) e extrato bruto diclorometânico de *Calea pinnatifida* nas doses de 50 e 100mg/Kg a cada dois dias durante quinze dias de experimento. Os animais foram eutanasiados, o tumor retirado, pesado e medido. A análise estatística foi realizada através do ANOVA seguido do teste de Duncan.

Resultados

1. Processamento Fitoquímico e Ensaio Anticâncer *in vitro* dos Extratos Brutos de *C. pinnatifida*

1.1. Obtenção dos Extratos Brutos

As folhas frescas (8g) e secas (10g) de *Calea pinnatifida* foram extraídas com diclorometano resultando em 0,37g (folhas frescas) e 0,66g (folhas secas) de extrato bruto diclorometânico (EBD) com rendimentos de 4,63 e 6,6% respectivamente. Os resíduos vegetais do processo de maceração com diclorometano foram retomados e submetidos a novo processo de maceração com etanol 95% obtendo-se 0,399g (folhas frescas) e 1,11g (folhas secas) de extrato bruto etanólico (EBE) com rendimentos de 4,98 e 11,1% respectivamente.

O perfil químico dos extratos brutos diclorometânicos e etanólicos das folhas frescas e secas foi avaliado através de cromatografia em camada delgada (Figuras 8 e 9). Nota-se que não há mudança nos perfis cromatográficos dos extratos diclorometânicos das folhas secas e frescas, bem como dos extratos etanólicos de folhas secas e frescas.

Como o extrato bruto diclorometânico das folhas secas foi escolhido para dar continuidade ao estudo, ele passou a ser extraído a quente, através do sohxlet. Então, 350g do pó de folhas secas da *C. pinnatifida* foram extraídos no Soxhlet, com diclorometano durante 48 horas resultando em 24,16g de extrato bruto diclorometânico seco (EBD) com 6,90% de rendimento.



Figura 8. Cromatografia de Camada Delgada (CCD) dos extratos brutos diclorometânicos da folhas secas (1) e folhas frescas (2). Fase móvel (F.M.): Butanol/ Ac. Acético/ diclorometano/ metanol 99:1 e revelador: água destilada 4:1:5 e revelador: anisaldeído.

Figura 9. Cromatografia de Camada Delgada (CCD) dos extratos brutos etanólicos da folhas secas (3) e folhas frescas (4). F.M.: Butanol/ Ac. Acético/ diclorometano/ metanol 99:1 e revelador: água destilada 4:1:5 e revelador: anisaldeído.

1.1.1. Ensaio Anticâncer *in vitro* com os Extratos Brutos

Todos os gráficos se referem à ação dos extratos de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas e relacionam a porcentagem de crescimento com a concentração do extrato. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento enquanto os negativos (abaixo de zero) representam morte celular, pois a quantidade de células (aferida pela

absorbância no final do experimento), no segundo caso, é menor do que aquela que iniciou o experimento (absorbância do T₀).

Os gráficos (Figuras 10 a 15) representam a atividade anticâncer dos EBD, EBE de folhas secas e frescas de *C. pinnatifida* e também do quimioterápico doxorrubicina (controle positivo). A partir desses resultados, o extrato diclorometânico das folhas secas foi escolhido para os estudos posteriores; portanto, os ensaios *in vivo* e o fracionamento do extrato bruto só foram realizados com esse extrato.

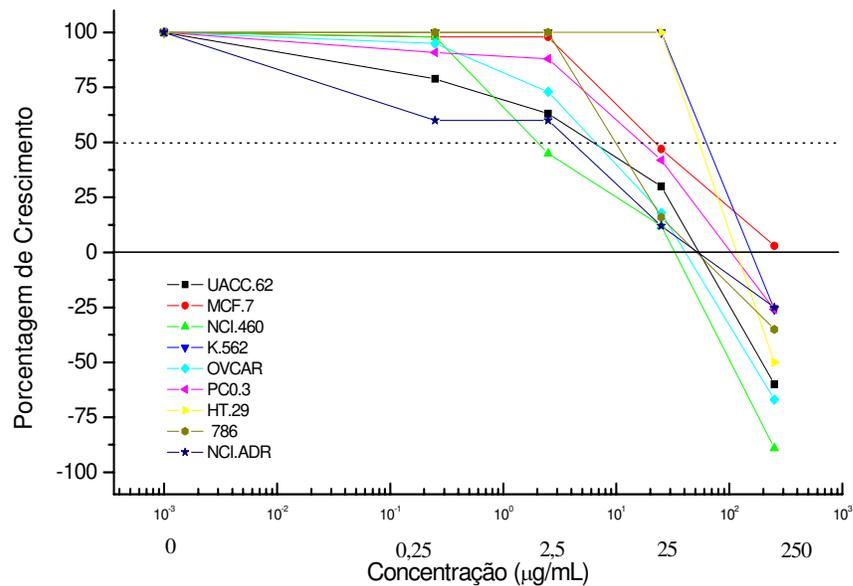


Figura 10. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Diclorometânico das folhas frescas (EBDF) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

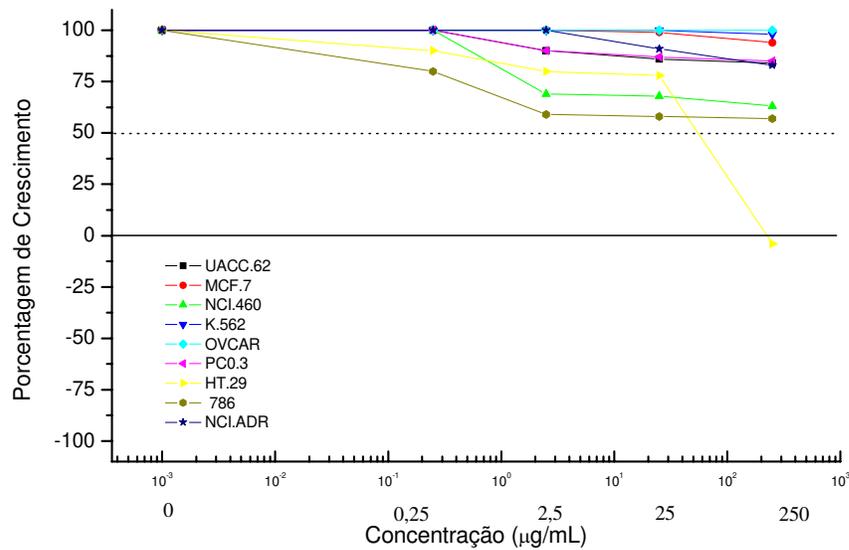


Figura 11. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Etanólico das folhas frescas (EBEF) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

O EBDF de *C. pinnatifida* produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento da linhagem de pulmão (NCI-460) na concentração de 2,5 µg/mL. Na maior concentração, apresentou atividade citocida para todas as linhagens, com exceção da linhagem de mama (MCF-7) (Figura 10). O EBEF apresentou atividade citostática para a linhagem de cólon (HT-29) na maior concentração, sendo inativo para todas as outras linhagens (Figura 11).

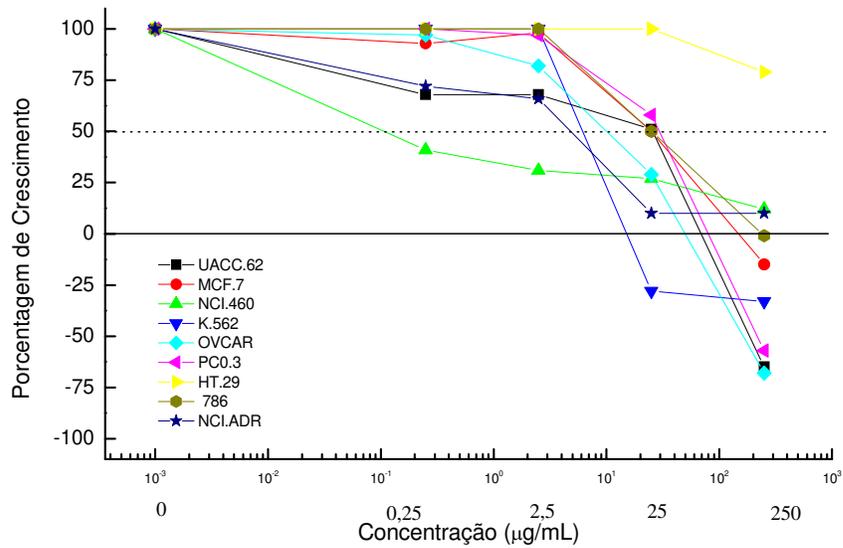


Figura 12. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Diclorometânico das folhas secas (EBDS) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

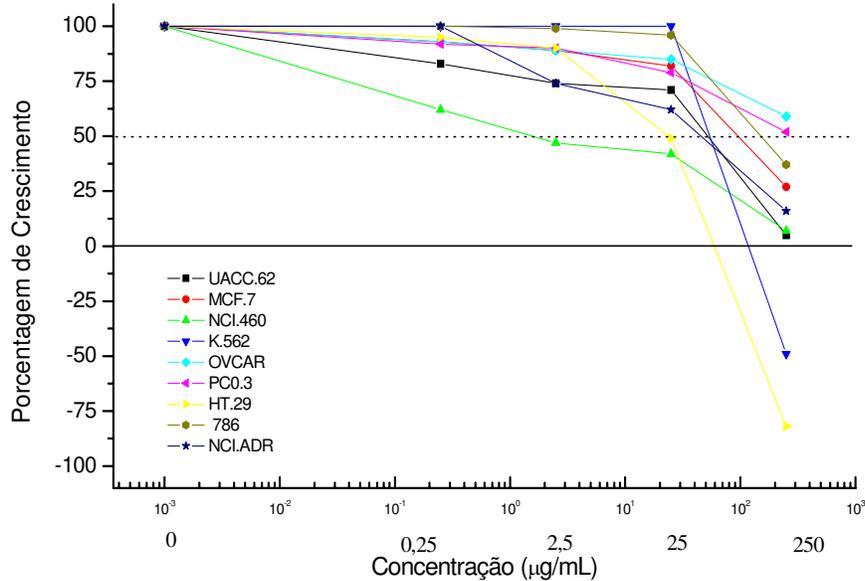


Figura 13. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Etanólico das folhas secas (EBEF) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

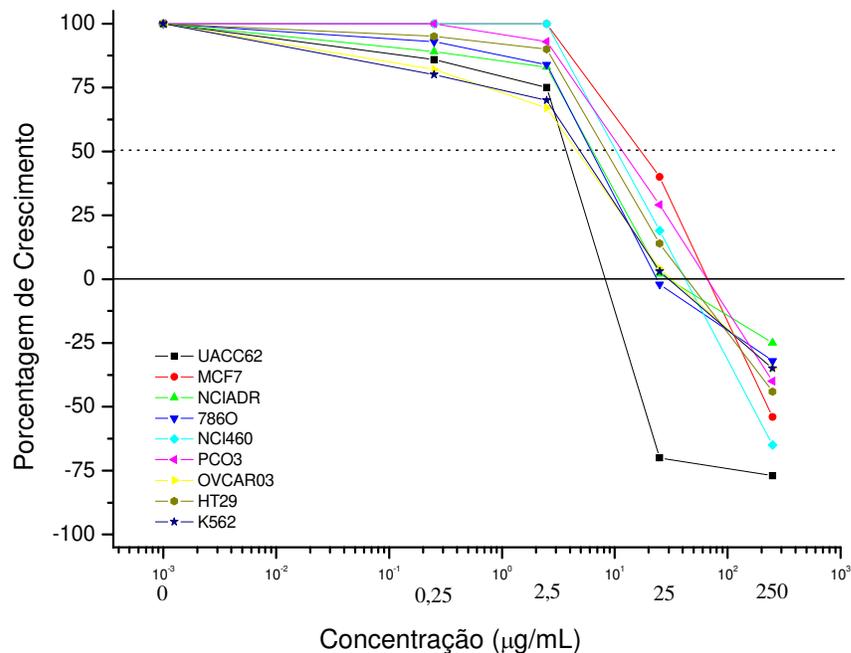


Figura 14. Gráfico da atividade anticâncer do Extrato Bruto Diclorometânico das folhas secas extraídas à quente (EBD) de *C. pinnatifida* em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do extrato.

O EBDS de *C. pinnatifida* produziu efeito citocida sobre o crescimento de quase todas as linhagens na maior concentração, mostrando maior seletividade para a linhagem de leucemia (K-562) que provocou morte celular na concentração de 25µg/mL (Figura 12). Esse extrato demonstrou maior potência do que os outros testados nessa fase do estudo. Em comparação com o mesmo extrato obtido sem a secagem das folhas (EBDF) é possível notar uma perda de potência e principalmente na seletividade. O EBES apresentou atividade citostática para todas as linhagens apenas na maior concentração, exceto as linhagens de cólon (HT-29) e de leucemia (K562), nas quais houve atividade citocida (Figura 13). O EBD de *C. pinnatifida* produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento de todas as linhagens na concentração de 25µg/mL, com exceção da linhagem de melanoma (UACC-62) que apresentou atividade citocida nessa concentração. Na

maior concentração, todas as linhagens apresentaram atividade citocida, demonstrando certa seletividade do EBD para a linhagem de melanoma (Figura 14).

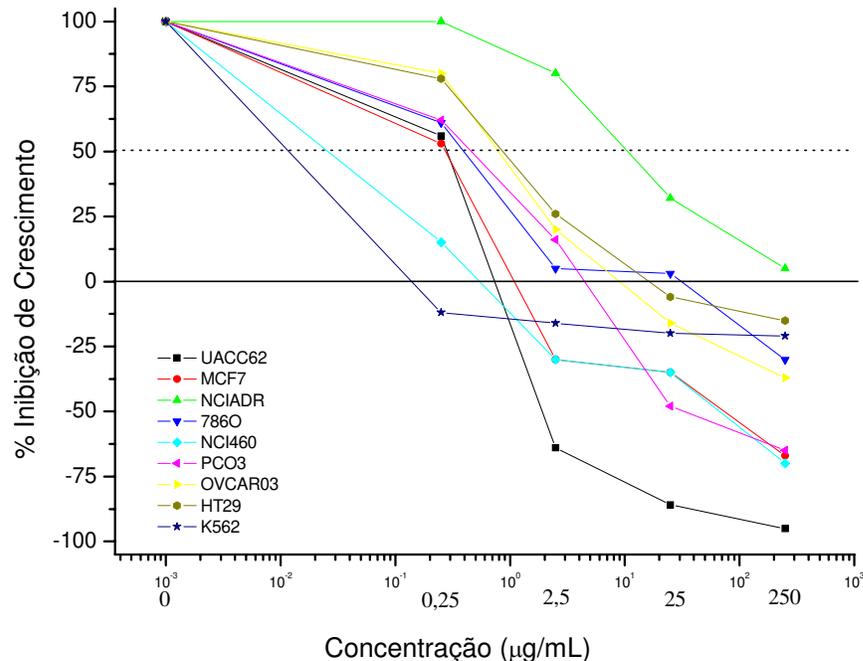


Figura 15. Gráfico da atividade anticâncer da doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas relacionando porcentagem de crescimento versus concentração do fármaco.

O quimioterápico doxorrubicina (Tecnofarma International[®], Uruguai), controle positivo, demonstrou potência elevada e seletividade, com morte celular nas linhagens de melanoma (UACC-62), pulmão (NCI-460), leucemia (K562) e mama (MCF-7) na concentração de 2,5µg/mL (Figura 15). A linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES) não apresentou morte celular na presença desse quimioterápico, fato que valida o experimento, pois é uma linhagem resistente a múltiplas drogas.

Os valores de TGI dos extratos brutos e da doxorrubicina foram calculados e apresentados na Tabela 4. Nota-se que o extrato bruto diclorometânico das folhas secas extraídos a quente (EBD) é o mais potente, confirmando a escolha desse extrato para dar continuidade ao trabalho,

passando a ser denominado Extrato Bruto Diclorometânico de *C. pinnatifida* (EBD). A grande diferença dos valores obtidos para a doxorubicina ocorre por se tratar de uma substância pura, enquanto estamos comparando-a com um extrato bruto.

Tabela 4. Valores de TGI (inibição de crescimento total) dos extratos brutos de *C. pinnatifida* e da doxorubicina ($\mu\text{g/mL}$).

Linhagem/Extrato	EBDF	EBEF	EBDS	EBES	EBD	Doxo
UACC-62	42,52	>250	60,72	>250	8,46	0,72
MCF-7	246,32	>250	152,71	>250	66,27	2,01
NCI-ADR/RES	58,74	>250	244,78	>250	58,25	237,42
786-O	64,28	>250	220,04	>250	46,81	18,15
NCI-H460	20,53	>250	>250	>250	41,89	0,92
PC-03	107,38	>250	80,19	>250	69,46	4,50
OVCAR-03	35,98	>250	44,93	>250	42,81	15,21
HT-29	219,26	236,82	>250	51,95	50,67	36,33
K562	233,89	>250	30,46	219,90	42,91	1,99

2. Fracionamento do Extrato Bruto Diclorometânico de *C. pinnatifida* e ensaios anticâncer.

2.1. Limpeza com Acetato de Chumbo

O EBD foi limpo com acetato de chumbo, gerando a fração acetato (Fr. Ac.). Analisando os perfis cromatográficos das duas amostras (Figura 16), nota-se que apenas as substâncias mais apolares foram retiradas do EBD.

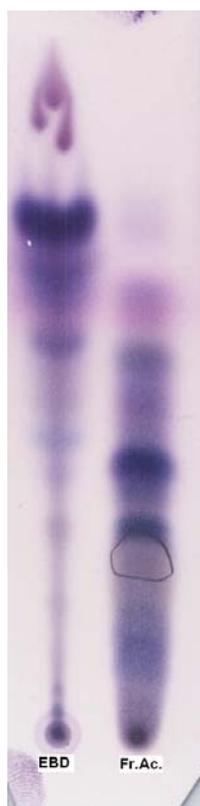


Figura 16: Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato bruto diclorometânico (EBD) e da fração acetato (Fr.Ac.). F.M.: diclorometano/metanol 98:2 e revelador: anisaldeído.

2.1.1. Ensaio Anticâncer *in vitro* com a fração acetato

A Figura 17 representa a curva concentração-resposta da fração acetato sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que, em relação ao EBD, houve uma perda da atividade nas linhagens de melanoma (UACC-62) e leucemia (K562), sugerindo que os compostos relacionados a essa atividade foram retirados do extrato junto com as graxas e a clorofila. Além disso, através da análise do TGI, a fração acetato mostra-se mais potente do que o EBD nas outras linhagens sugerindo que os outros componentes tenham sido concentrados com a limpeza (Tabela 5).

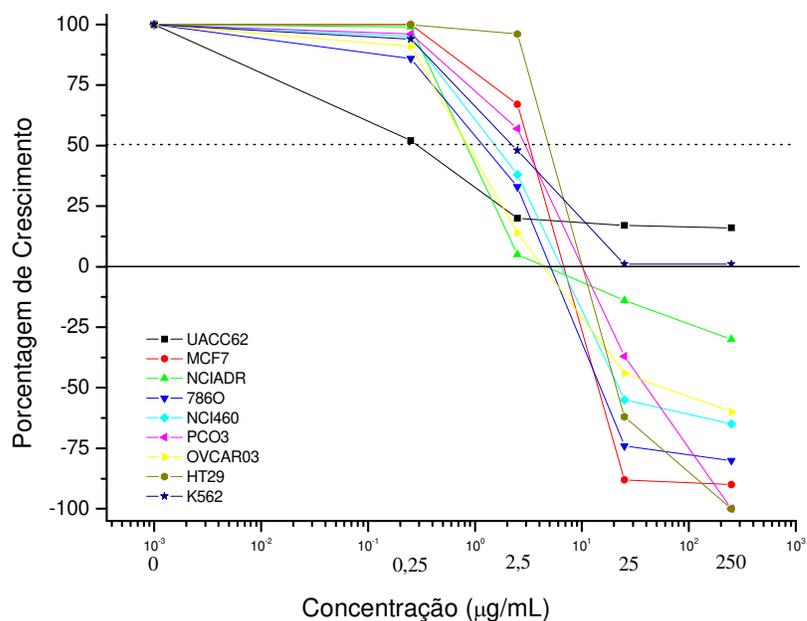


Figura 17. : Gráfico da atividade anticâncer da fração resultante da limpeza do EBD com acetato de chumbo FrAc, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

Tabela 5. Valores de TGI (inibição de crescimento total) do EBD e da Fração acetato de *C. pinnatifida* ($\mu\text{g/mL}$).

Linhagem	EBD	Fr. Acetato
UACC-62	8,46	>250
MCF-7	66,27	5,90
NCI-ADR/RES	58,25	16,72
786-O	46,81	4,67
NCI-H460	41,89	7,05
PC-03	69,46	10,30
OVCAR-03	42,81	6,20
HT-29	50,67	13,39
K562	42,91	101,56

2.2. Cromatografia em Coluna Filtrante

Foram realizadas duas colunas filtrantes que resultaram em 15 frações (Figura 18) que foram reunidas em 5 grupos com compostos de Rf (fator de retenção) próximos, cujos rendimentos são apresentados na Tabela 6 e Figura 19.

Tabela 6. Rendimento (%) das frações da coluna filtrante (P= parcial; T= total).

Grupo	A	B	C	D	E
Frações	1A,2A	1B, 2B	1C,1D,2C,2D,2E	1E,1F,1G,2F	1H,2G
Rendimento P	4,61	16,10	27,06	11,39	8,61
T	67,77				

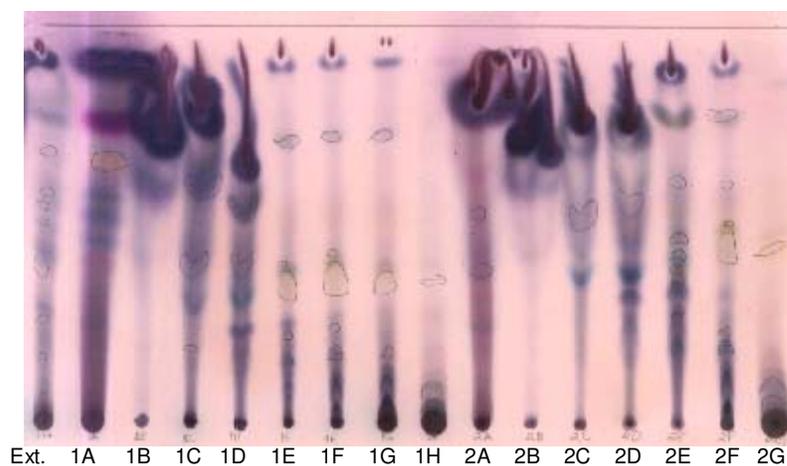


Figura 18. CCD de sílica gel do EBD e frações das duas colunas filtrante. F.M.: diclorometano/metanol 98:2 e revelador: anisaldeído.



Figura 19. CCD de sílica gel das frações agrupadas. F.M.: hexano/acetato etila (6:4) e revelador: anisaldeído.

2.2.1. Ensaio Anticâncer *in vitro* com as frações obtidas em coluna filtrante

A Figura 20 representa a curva concentração-resposta da fração A sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração A apresenta boa atividade antiproliferativa, com ação citocida para algumas linhagens já na penúltima concentração, evidenciando uma ação dose dependente. Apresenta seletividade para as linhagens de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de $7,07\mu\text{g/mL}$, ovário (OVCAR-03) com TGI de $14,62\mu\text{g/mL}$ e leucemia (K562) com TGI de $15,90\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7).

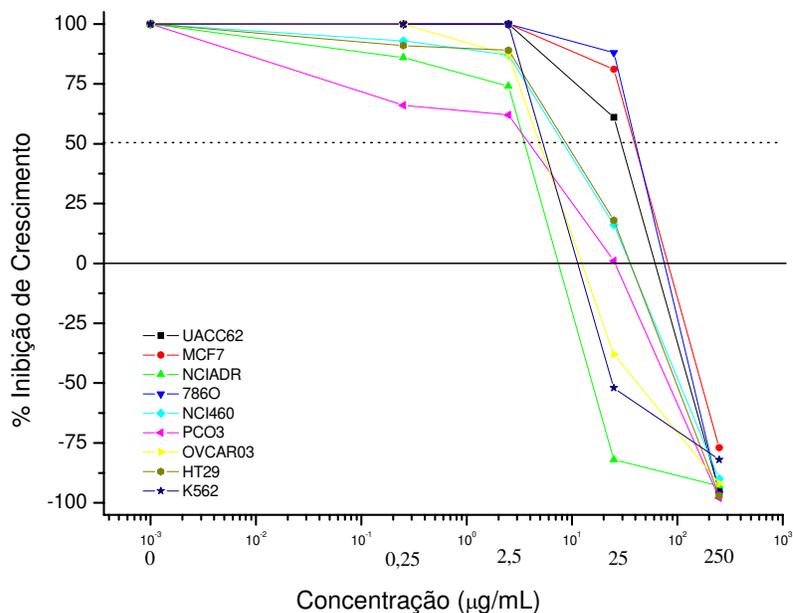


Figura 20. Gráfico da atividade anticâncer da fração A resultante da coluna filtrante, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 21 representa a curva concentração-resposta da fração B sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração B não se destaca quanto a sua atividade antiproliferativa, pois apresenta pouca atividade citocida, observada apenas para as linhagens de leucemia (K562) com TGI de 42,20 μ g/mL, de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 99,84 μ g/mL e de cólon (HT-29) com TGI de 159,22 μ g/mL (Tabela 7).

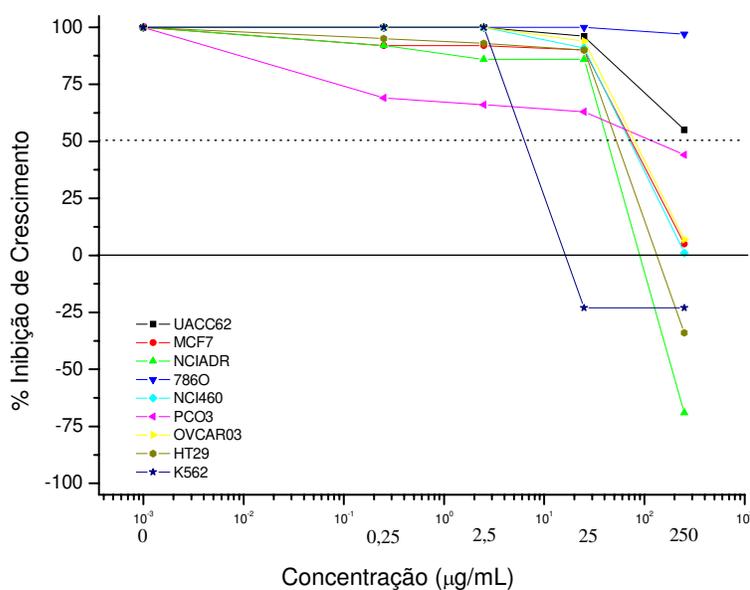


Figura 21. Gráfico da atividade anticâncer da fração B resultante da coluna filtrante, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 22 representa a curva concentração-resposta da fração C sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração C também apresenta boa atividade antiproliferativa com atividade citocida para todas as linhagens. Apresenta seletividade para as

linhagens de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 11,72 μ g/mL e leucemia (K562) com TGI de 18,76 μ g/mL (Tabela 7).

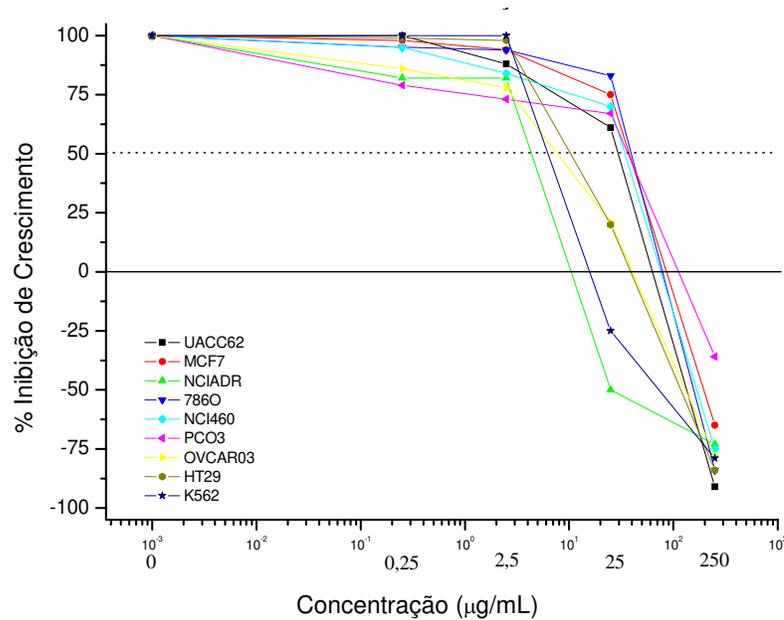


Figura 22. Gráfico da atividade anticâncer da fração C resultante da coluna filtrante, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 23 representa a curva concentração-resposta da fração D sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração D apresenta uma ótima atividade antiproliferativa, com ação citocida para algumas linhagens na segunda concentração, com ação dose dependente. Apresenta seletividade para as linhagens de leucemia (K562) com TGI de 3,65 μ g/mL, ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 2,65 μ g/mL e melanoma (UACC-62) com TGI de 4,54 μ g/mL, além de mostrar-se mais potente que o EBD em todas as linhagens (Tabela 7).

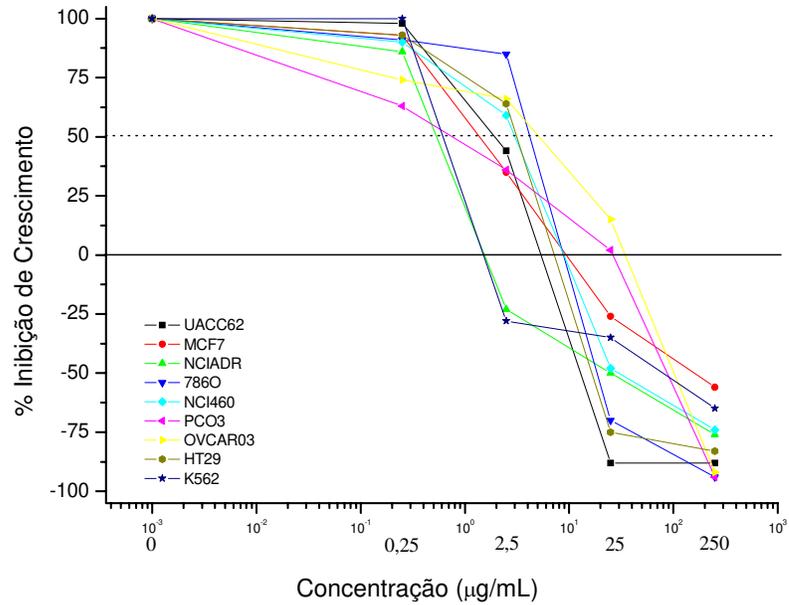


Figura 23. Gráfico da atividade anticâncer da fração D resultante da coluna filtrante, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 24 representa a curva concentração-resposta da fração E sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração E, assim como a Fração B, não se destaca quanto à atividade antiproliferativa, pois possui atividade citocida apenas para algumas linhagens e somente na maior concentração. Apresenta maior seletividade para as linhagens de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 63,54µg/mL e de cólon (HT-29) com TGI de 111,15µg/mL (Tabela 7).

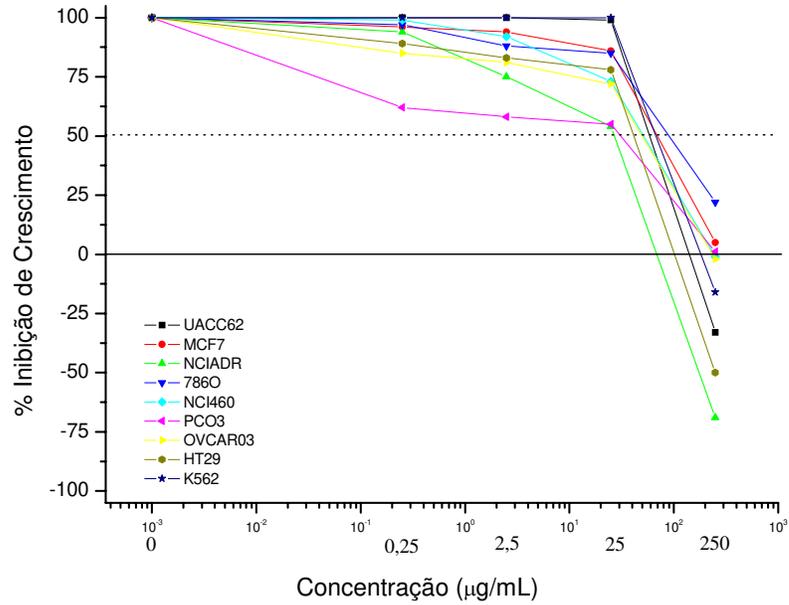


Figura 24. Gráfico da atividade anticâncer da fração E resultante da coluna filtrante, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Tabela 7 apresenta dos valores de TGI das frações obtidas por coluna filtrante e do EBD. Comparando esses valores, nota-se que a Fração A é a mais potente para a linhagem de ovário (OVCAR-03), enquanto a Fração D é a mais potente para todas as outras linhagens.

Tabela 7. Valores de TGI (inibição de crescimento total) do EBD e das frações de *C. pinnatifida* obtidas em coluna filtrante ($\mu\text{g/mL}$).

Linhagem	EBD	Fr. A	Fr. B	Fr. C	Fr. D	Fr. E
UACC-62	8,46	47,51	>250	52,34	4,54	191,98
MCF-7	66,27	83,72	>250	89,73	12,36	>250
NCI-ADR/RES	58,25	7,07	99,84	11,72	2,55	63,54
786-O	46,81	64,88	>250	77,76	9,72	>250
NCI-H460	41,89	31,37	>250	73,58	9,60	245,55
PC-03	69,46	17,91	>250	114,47	11,40	550,53
OVCAR-03	42,81	14,62	>250	35,22	25,94	>250
HT-29	50,67	31,00	159,22	34,68	6,92	111,15
K562	42,91	15,90	42,20	18,76	3,65	239,89

2.3. Extração Ácido-base

Como a fração D apresentou o melhor resultado no ensaio antiproliferativo *in vitro* ela foi submetida a uma extração ácido-base. Analisando a CCD, nota-se que as frações apresentam perfis diferentes, concentrando as diversas substâncias presentes na Fração D (Figura 25). A fração ácida possui compostos de polaridade mais alta e de polaridade mais baixos, também encontrados na fração básica. Já a fração neutra apolar possui compostos de polaridade média, encontrados em todas as outras frações, porém concentrados nessa, além de compostos de alta polaridade ausentes nas demais frações.

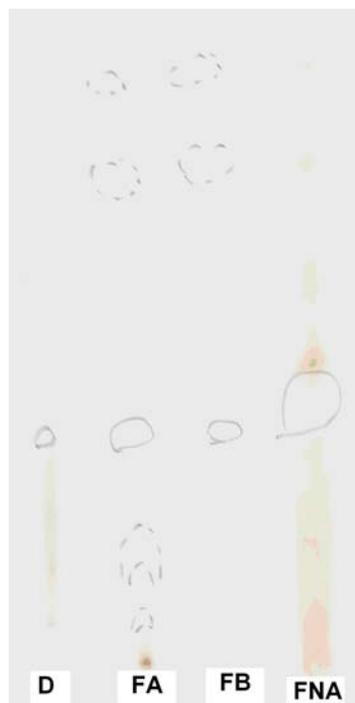


Figura 25. CCD de sílica gel da Fração D e das frações obtidas na extração ácido-base; FA: Fração ácida, FB: Fração básica e FNA: Fração neutra apolar. F.M.: hexano/acetato etila 6:4 e revelador: anisaldeído.

2.3.1 Ensaio Anticâncer *in vitro* com as frações obtidas na extração ácido-base

A Figura 26 representa a curva concentração-resposta da Fração ácida sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração ácida apresenta boa atividade antiproliferativa com atividade citocida para todas as linhagens. Apresenta seletividade para as linhagens de melanoma (UACC-62) com TGI de 8,91 μ g/mL, ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 7,94 μ g/mL e rim (786-O) com TGI de 8,19 μ g/mL (Tabela 8).

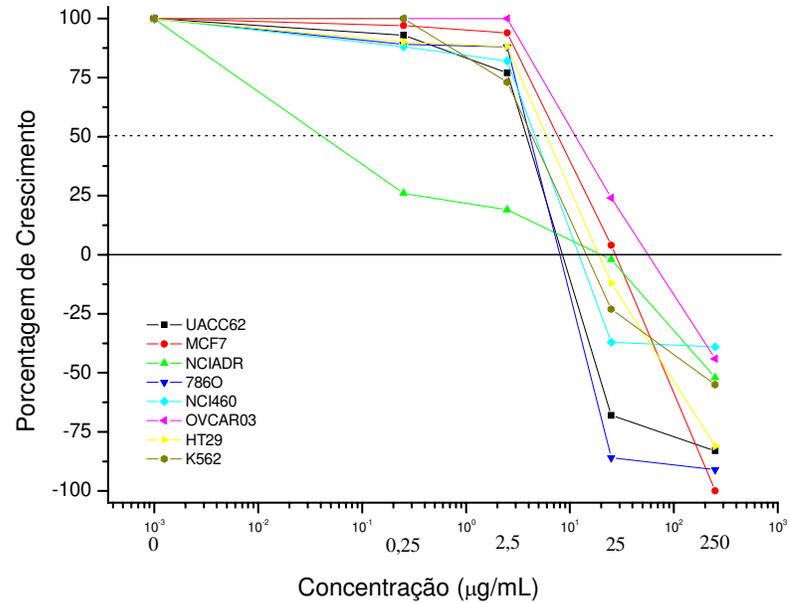


Figura 26. Gráfico da atividade anticâncer da Fração ácida obtida na extração ácido-base, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 27 representa a curva concentração-resposta da Fração básica sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração básica apresenta boa atividade antiproliferativa com atividade citocida para todas as linhagens. Apresenta a mesma seletividade que a fração ácida, para as linhagens de melanoma (UACC-62) com TGI de 12,26µg/mL, ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 4,47µg/mL e rim (786-O) com TGI de 12,11µg/mL (Tabela 8).

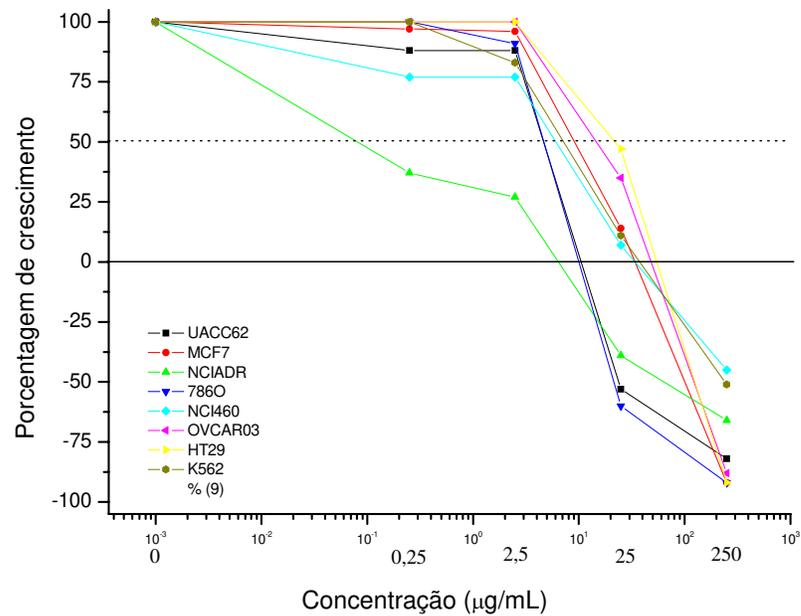


Figura 27. Gráfico da atividade anticâncer da Fração básica obtida na extração ácido-base, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 28 representa a curva concentração-resposta da Fração neutra apolar sobre as linhagens celulares. A análise desta curva demonstrou que a Fração neutra apolar apresenta a melhor atividade antiproliferativa, comparada com as frações ácida e básica, com atividade citocida para todas as linhagens. Apresenta seletividade para as linhagens de pulmão (NCI-H460) com TGI de 5,42µg/mL, mama (MCF-7) com TGI de 4,08µg/mL e rim (786-O) com TGI de 2,51µg/mL (Tabela 8).

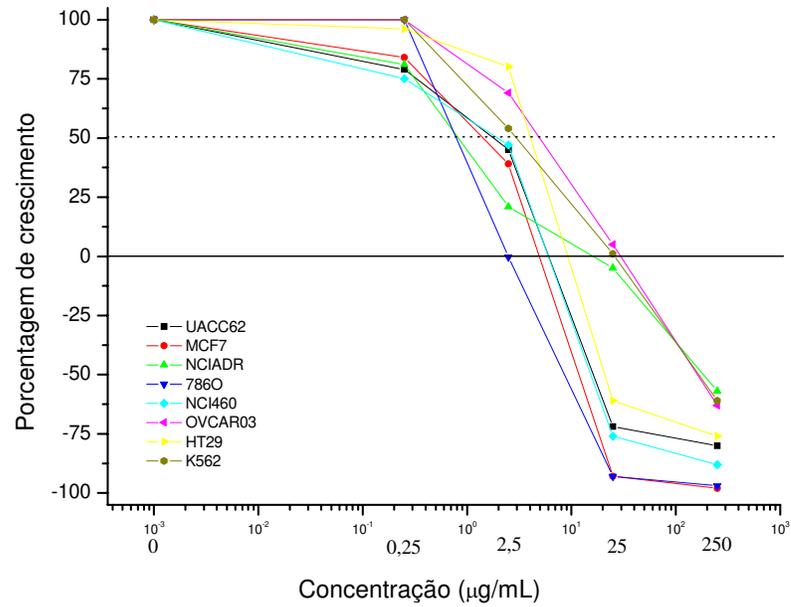


Figura 28. Gráfico da atividade anticâncer da Fração neutra apolar obtida na extração ácido-base, em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Tabela 8 apresenta dos valores de TGI das frações obtidas por extração ácido-base e da Fração D. Comparando esses valores, nota-se que, dentre as novas frações obtidas, a Fração básica é a mais potente para a linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES), a Fração neutra apolar é a mais potente para as linhagens de rim (786-O), mama (MCF-7) e pulmão (NCI-H460), enquanto a original Fração D é a mais potente para todas as outras linhagens.

Tabela 8. Valores de TGI (inibição de crescimento total) da Fração D e das frações de *C. pinnatifida* obtidas pela extração ácido-base ($\mu\text{g/mL}$).

Linhagem	Fr. D	Fr. Ácida	Fr. Básica	Fr. Neutra Apolar
UACC-62	4,54	8,91	12,26	5,59
MCF-7	12,36	26,01	30,14	4,08
NCI-ADR/RES	2,55	7,94	4,47	13,76
786-O	9,72	8,19	12,11	2,51
NCI-H460	9,60	20,53	40,08	5,42
OVCAR-03	25,94	61,61	40,35	29,40
HT-29	6,92	21,23	43,66	10,13
K562	3,65	20,11	41,80	24,51

3. Ensaio *in vivo* com o Extrato Bruto Diclorometânico de *C. pinnatifida*

3.1. Toxicidade Aguda

Os animais receberam injeções intraperitoneais do extrato diclorometânico das folhas secas (EBD) nas doses de 100, 200, 300, 500 e 1000 mg/Kg e foram observados inicialmente por 4 horas seguidas e a seguir foram diariamente por um período de 14 dias. Durante as 4 horas iniciais de observação os animais apresentaram respostas exacerbadas ao estímulo e contrações abdominais provavelmente por estímulo algico, proporcionando dores abdominais.

O animal que recebeu a dose de 1000mg/Kg morreu de parada respiratória após alguns minutos e parte dos animais da dose de 500mg/Kg, 33% dos animais da dose de 300mg/Kg e 20% dos animais da dose de 200mg/Kg morreram em 14 dias. No fim do experimento todos os animais da dose de 100 mg/Kg estavam vivos e a dose letal responsável pela morte de 50% dos animais (DL50) foi calculada por regressão linear, foi de 500 mg/Kg.

Com isso foi possível escolher as doses do EBD que serão utilizadas nos ensaios tumorais *in vivo*. No experimento de Tumor ascítico de Ehrlich serão utilizadas as doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, mostrando a importância da análise da toxicidade aguda da substância antes de iniciar experimentos *in vivo*.

3.2. Tumor Ascítico de Ehrlich

A análise da sobrevivência dos animais foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier, demonstrada na Figura 29. A solução salina e a doxorubicina aparecem estatisticamente diferentes ($p < 0,001$),

comprovando a efetividade do teste. Analisando os grupos tratados com o EBD de *Calea pinnatifida*, somente a dose de 200mg/Kg apresentou diferença significativa ($p=0,009$) quando comparada com o controle negativo, com 50% de sobrevivência com 30 dias de experimento.

Mesmo comprovada a atividade anticâncer *in vivo* de *Calea pinnatifida*, a dose ainda necessita ser ajustada, pois esse extrato apresentou alta taxa de toxicidade, já que parte dos animais deste grupo morreu antes do controle negativo, sem apresentarem características oriundas do tumor, como a dilatação abdominal.

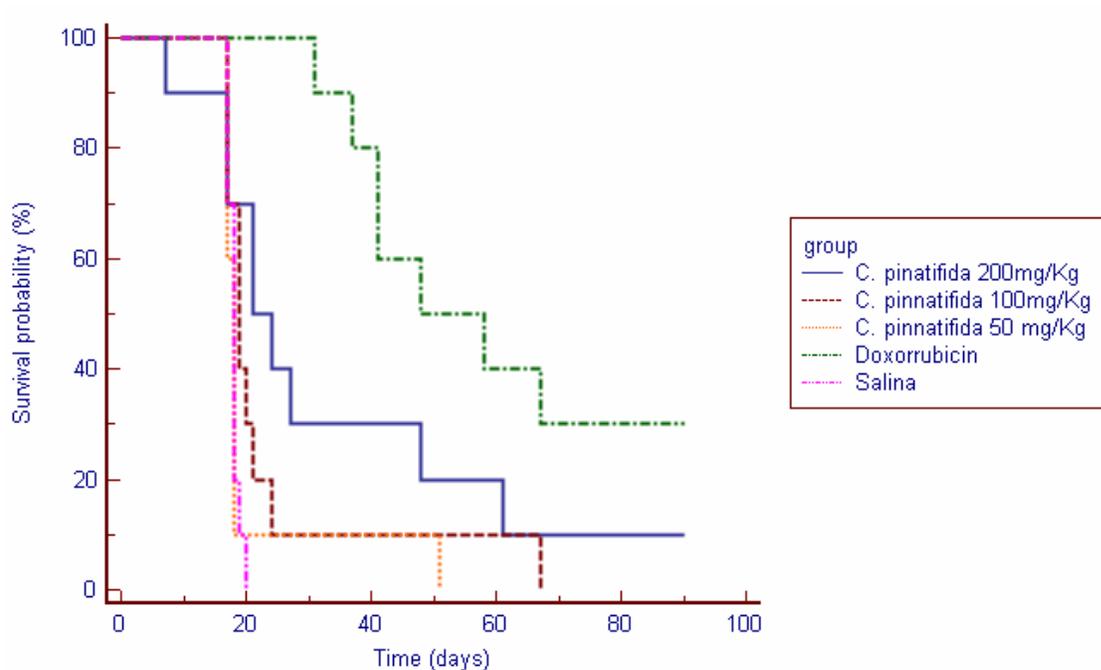


Figura 29: Curvas de sobrevivência do teste de Kaplan-Meier. Doxorubicina $p<0,001$; EBD *C. pinnatifida* 50mg/Kg $p=0,973$; EBD *C. pinnatifida* 100mg/Kg $p=0,202$; EBD *C. pinnatifida* 200mg/Kg $p=0,009$.

3.3. Tumor Sólido de Ehrlich

Esse experimento foi realizado com a finalidade de comprovar a atividade anticâncer *in vivo*, evidenciada no modelo de tumor ascítico de Ehrlich. A via de administração da amostra não é a mesma via de inoculação do tumor, fazendo com que a amostra tenha que ser totalmente metabolizada e absorvida pelo organismo, atingir a corrente sanguínea até o local onde o tumor foi implantado. Além disso, iniciar o tratamento após o tumor estar visível, garante que todos os animais estão manifestando o tumor previamente.

As amostras foram comparadas através do teste de Duncan, em que todas as amostras foram comparadas com o controle negativo (solução salina). Usando o parâmetro peso relativo (peso tumor/peso animal), a doxorrubicina, controle positivo, reduziu 71,6% do tumor ($p=0,0008$), comprovando a efetividade do teste. Ao comparar as amostras de *Calea pinnatifida* na dose de 50mg/Kg não apresentou nenhuma atividade antitumoral ($p= 0,4062$) e na dose de 100mg/Kg há redução de 66,7% do tumor ($p=0,0025$), mostrando que o EBD só apresenta atividade anticâncer na dose de 100mg/Kg. Comparando essa dose com o controle positivo do experimento, a doxorrubicina, obtemos um $p=0,811$, mostrando que não há diferença significativa entre o resultado obtido com a doxorrubicina e o EBD de *C. pinnatifida* na dose de 100mg/Kg evidenciando a importância desse extrato na busca de novos quimioterápicos.

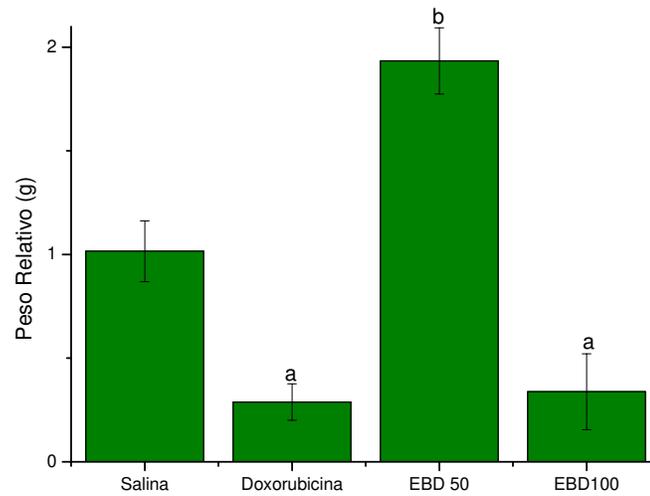


Figura 30: Gráfico da atividade anticâncer do EBD de *C. pinnatifida* no modelo de Tumor Sólido de Ehrlich. ^avalores estatisticamente diferentes do grupo salina, ^bvalores estatisticamente diferentes do grupo doxorubicina.

Discussão

A incidência de câncer tem aumentado anualmente e o interesse em terapias alternativas e no uso de fármacos originários de produtos naturais está crescendo, especialmente aqueles derivados de plantas (Rates, 2001). Com a finalidade de buscar novas fontes de fármacos anticâncer, muitos extratos e princípios ativos de plantas estão sendo estudados em modelos *in vitro* e *in vivo*. O modelo *in vivo* tem a importância de confirmar a atividade anticâncer observada em cultura de células, superando as limitações dos modelos *in vitro* (Smith *et al*, 2005).

A triagem inicial da atividade anticâncer de *Calea pinnatifida* foi realizada com os extratos brutos diclorometânico e etanólico das folhas frescas e secas, através de testes de citotoxicidade em cultura de células tumorais humanas. Os extratos diclorometânicos têm a capacidade de extrair substâncias com baixa polaridade, enquanto os etanólicos extraem substâncias de média e alta polaridade. Como apenas o extrato diclorometânico apresentou atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas supõe-se que os compostos responsáveis por essa atividade são os de baixa polaridade. Compostos apolares geralmente estão envolvidos em diversas atividades biológicas devido ao seu caráter lipossolúvel, capaz de atravessar a membrana plasmática celular.

A análise cromatográfica através de cromatografia de camada delgada (CCD) e dos gráficos das atividades antiproliferativa não apresenta diferenças significativas entre o extrato preparado com as folhas frescas ou secas, sugerindo que os princípios ativos não são perdidos com a exposição à temperatura de 45°C. A obtenção do extrato das folhas secas é mais rápida e eficiente do que o das folhas frescas, pois a presença de água nas folhas frescas dificulta a penetração do diclorometano que é imiscível em água.

No ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro*, os três extratos diclorometânicos produziram inibição de crescimento e morte celular em todas as linhagens tumorais humanas avaliadas, diferente dos extratos etanólicos que apresentaram pouca atividade citostática. O

extrato bruto das folhas secas extraídas a quente (EBD) se mostrou o mais potente de todos com maior especificidade para a linhagem de melanoma (UACC-62) cujo TGI (inibição total de crescimento) é 8,46 μ g/mL, enquanto o extrato bruto das folhas frescas extraídas a frio (EBDF) foi mais potente para a linhagem de pulmão (NCI-H460) TGI de 20,53 μ g/mL e o das folhas secas extraídas a frio (EBDS) foi mais potente para a linhagem de leucemia (K-562) com TGI de 30,46 μ g/mL. Neste caso, a extração à quente apresentou-se mais efetiva, aumentando o rendimento e a potência do extrato sem alterar os compostos relacionados a essa atividade.

Como diversas linhagens celulares apresentam sensibilidades diferentes frente a compostos citotóxicos, o uso de mais de uma linhagem celular é necessário para a detecção de substâncias com atividade seletiva (Skehan *et al*, 1990). Estudos anteriores demonstraram que outras espécies de *Calea* apresentam atividade citotóxica com indução de apoptose, e antiinflamatória (Yamada *et al*, 2004; Venegas-Flores *et al*, 2002; Nakagawa *et al*, 2005). O presente estudo mostra, pela primeira vez, a atividade anticâncer dos extratos de *Calea pinnatifida* em ensaios antiproliferativos com nove linhagens tumorais humanas *in vitro* e em modelos experimentais de tumor de Ehrlich *in vivo*.

Em artigo publicado, nas folhas de *C. pinnatifida* extraídas com éter de petróleo e de acetato de etila foram encontrados diversos compostos químicos, dentre eles os germacranolídeos, grupo pertencente à classe das lactonas sesquiterpênicas (Ferreira *et al*, 1980). Isso sugere sua presença também no extrato diclorometânico das folhas secas de *C. pinnatifida* (EBD), pois o diclorometano apresenta uma polaridade intermediária a esses dois solventes.

A presença de germacranolídeos (lactonas sesquiterpênicas) é uma característica comum à família Asteraceae. Sabendo que algumas classes de substâncias são características de uma família botânica, de um gênero ou de uma mesma espécie, as chances de encontrar substâncias

análogas em uma espécie do mesmo gênero ou da mesma família são grandes (Hostettmann, 1997).

Na espécie *Calea urtisifolia*, um germacranolídeo chamado de arucanolídeo é responsável pela indução da apoptose, em células de leucemia HL60, através da perda do potencial da membrana mitocondrial e da ativação do fator indutor de apoptose (FIA) (Nakagawa *et al*, 2005). Já os germacranolídeos de *Calea zacatechichi* agem, em células HeLa, como inibidor do fator nuclear κ B (NF- κ B), um importante mediador da resposta imune e inflamatória (Bork *et al*, 1997). Devido às características químicas (polaridade) e biológicas (ação no metabolismo celular) dos germacranolídeos, sugere-se que estes podem estar envolvidos na atividade anticâncer de *C. pinnatifida*.

O exato mecanismo pelo qual o EBD de *C. pinnatifida* apresenta atividade anticâncer é desconhecido. Com a finalidade de isolar os princípios ativos e elucidar o mecanismo de ação envolvido nessa atividade, o EBD de *C. pinnatifida* foi fracionado e biomonitorado em cultura de células tumorais. Paralelamente, o EBD foi fracionado em coluna filtrante ao mesmo tempo em que foi purificado com acetato de chumbo, com a finalidade de retirar as graxas e a clorofila.

A fração acetato (FrAc) foi obtida após a adição da solução básica de acetato de chumbo, que foi filtrada em celite, lavada e extraída com acetato de etila. Ao analisar o padrão cromatográfico da fração acetato com o EBD, verifica-se que apenas as substâncias mais apolares (as graxas) foram retiradas. No entanto, a sua atividade antiproliferativa foi potencializada em todas as linhagens, exceto na linhagem de melanoma (UACC) e de leucemia (K562) que não apresentaram atividade citocida, nem na maior concentração 250 μ g/mL.

Com isso, podemos afirmar que as substâncias responsáveis pela atividade antiproliferativa em melanoma e leucemia podem ser compostos fenólicos que foram removidas

do extrato juntamente com as graxas e com a clorofila. Esse procedimento fitoquímico é importante para a separação de terpenos, que foram concentradas na FrAc, sugerindo que estes estejam envolvidos na atividade antitumoral do EBD de *C. pinnatifida*.

Os terpenos formam uma grande família de compostos estruturalmente distintos derivados de unidades de isopreno (C5). As unidades de isopreno são originadas do colesterol, compartilhando a mesma via biossintética dos esteróides (Dewick, 2006). Diversos terpenóides são conhecidos por sua atividade anticâncer, sendo os taxóides os mais famosos. Extraídos das espécies do gênero *Taxus*, são diterpenos (C20) usados no tratamento de câncer de mama, pulmão, ovário e próstata, que agem nos microtúbulos, impedindo a proliferação celular (Montero *et al*, 2005). Além dos taxóides, o partenolídeo, uma lactona sesquiterpênica classificada de germacranolídeo devido a presença do cátion germacril, inibe o fator nuclear B, importante na indução da apoptose (Dewick, 2006, Bork *et al*, 1997). Isso contribui com a hipótese de que os germacranolídeos de *Calea pinnatifida* estejam envolvidos na atividade anticâncer.

No fracionamento em coluna filtrante, foram utilizadas as misturas de solventes hexano/diclorometano 20:80; diclorometano 100; diclorometano/metanol de 99,5:0,5 até 96:4 em intervalos de 0,5%. Foram obtidas 15 frações que foram agrupadas, de acordo com a semelhança química, em 5 grupos que receberam as denominações de fração A, B, C, D, E.

Essas frações foram analisadas quanto à atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas. Das cinco, as frações A, C e D apresentaram atividade antiproliferativa. Todas as três, de maneira geral, são mais potentes que o EBD quando são comparados os valores de TGI; porém a fração D se destaca em todas as linhagens. As frações B e E apresentaram atividade citostática e até mesmo citotóxica para algumas linhagens, porém essa atividade não se destaca

quando comparada com as outras frações. Além disso, essa atividade pode ser resultado de alguma substância que foi extraída mais eficientemente em outra fração próxima.

Na fração A, a melhor atividade é para a linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 7,07µg/mL que quando comparada com as outras frações, foi a mais potente para a linhagem de ovário (OVCAR-03) com TGI de 14,62µg/mL. A fração C também foi mais potente para a linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com TGI de 11,72µg/mL apesar de não apresentar seletividade. Já a fração D apresenta os menores valores de TGI e é a mais potente em todas as linhagens, exceto na linhagem de ovário (OVCAR-03). É a mais potente para as linhagens de ovário resistente (NCI-ADR/RES), com TGI de 2,55µg/mL, leucemia (K562), com TGI de 3,65µg/mL e melanoma (UACC-62), com TGI de 4,54µg/mL.

Dando continuidade ao estudo, a fração D foi submetida a uma extração ácido-base, que deu origem a três novas frações: a ácida, a básica e a neutra apolar. As três apresentaram atividade antiproliferativa, porém a fração orgânica neutra apolar mereceu destaque. Tanto a fração ácida quanto a básica não foram mais potentes que a fração de origem D em nenhuma linhagem; já a neutra apolar foi mais potente e seletiva para as linhagens de mama (MCF-7) com TGI de 4,08µg/mL, pulmão (NCI-460) com TGI de 5,42µg/mL e rim (786-O) com TGI de 2,51µg/mL. No entanto o fracionamento fez com a fração D perdesse atividade, principalmente na linhagem de leucemia (K562) sugerindo que o princípio ativo tenha se diluído entre as novas frações.

Ao analisar o perfil cromatográfico dessas amostras, nota-se que a fração neutra apolar é a que mais se assemelha com a fração D. A concentração de substâncias de média polaridade presente em todas as frações, encontra-se em maior quantidade na fração neutra apolar. A fração ácida possui compostos de elevada polaridade, mas também de baixa polaridade encontrados

também na fração básica. Com isso, podemos sugerir que essa extração não foi eficiente e apenas diluiu alguns princípios ativos da fração D, fazendo com que ela perdesse potência, principalmente na fração ácida e básica, e concentrasse outros na fração neutra apolar. Esse tipo de extração é utilizado para separar alcalóides que se encontrariam na fração ácida e também agrega os terpenos na fração neutra apolar. A fração neutra apolar teve a seletividade e potência aumentada para as linhagens de mama (MCF-7), pulmão (NCI-460) e rim (786-O), confirmando a importância dos terpenos na atividade antitumoral de *C. pinnatifida*.

Com esses resultados, percebe-se que tanto as frações quanto o EBD possuem uma boa seletividade para a linhagem de ovário resistente (NCI-ADR/RES). Esse dado torna-se mais importante, pois a descoberta de um quimioterápico específico para uma determinada linhagem tumoral irá, provavelmente, reduzir os efeitos colaterais provenientes da ação do quimioterápico em outras células. Além disso, a linhagem NCI-ADR/RES é uma linhagem resistente a múltiplas drogas (Liscovitch *et al*, 2007), tornando o seu tratamento difícil. O desenvolvimento de uma nova droga efetiva para essa linhagem contribuiria muito para o tratamento do câncer.

Com a finalidade de analisar a biodisponibilidade dos princípios ativos de *C. pinnatifida*, o EBD foi submetido a modelos de câncer *in vivo*. O estudo *in vivo* iniciou-se com o EBD, pois a obtenção das frações em grande quantidade é um processo longo e difícil, dependendo de quantidades elevadas de material vegetal e solvente.

Para ajustar a dose ideal para o estudo, o EBD foi submetido a um teste de toxicidade aguda nas doses de 100, 300 e 1000mg/Kg, inicialmente, por via intraperitoneal. Como o primeiro animal que recebeu 1000mg/Kg do EBD morreu de parada respiratória, minutos após a aplicação, essa dose foi considerada de elevada toxicidade. Continuando o teste, foi utilizada a dose de 500mg/Kg. Após quatro horas de observação, nenhum animal havia morrido; porém todos eles apresentavam contorções abdominais que sugerem dor no local de aplicação. Nos dias

seguintes, parte dos animais que receberam 300 e 500mg/Kg morreram. Após quinze dias, a dose letal para 50% dos animais (DL₅₀) foi calculada através de regressão linear resultando em 500mg/Kg.

Para os estudos de atividade anticâncer *in vivo*, modelos experimentais de tumor de Ehrlich foram selecionados: o tumor ascítico e o tumor sólido. No modelo de tumor ascítico a atividade anticâncer do EBD de *C. pinnatifida* foi confirmada através do aumento na sobrevivência dos animais tratados; os compostos ativos agem nas células tumorais impedindo que os animais desenvolvam a neoplasia ou tenham uma sobrevivência menor (Lobo *et al*, 2000).

Os animais foram tratados uma vez por semana nas três primeiras semanas, totalizando apenas três aplicações durante os noventa dias de experimento. O EBD de *C. pinnatifida* aumentou a sobrevivência dos animais apenas na maior dose, de 200mg/Kg. Além da atividade anticâncer, a dose de 200mg/Kg também apresentou elevada toxicidade, pois parte dos animais desse grupo morreram antes dos controles negativos, sem apresentarem quaisquer sinais de ascite. Portanto, a dose ideal de estudo ainda precisava ser ajustada.

A implantação do tumor ascítico de Ehrlich induz uma reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação do edema, migração celular e formação progressiva do líquido ascítico. A formação do fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, afinal seus constituintes servem de fonte nutricional para as células tumorais (Fecchio *et al*, 1990; Nascimento *et al*, 2006).

A atividade do EBD pode ser proveniente de um efeito citotóxico local nas células tumorais, semelhante ao encontrado no ensaio *in vitro*, ou a uma ação local indireta, relacionada a um efeito antiinflamatório, como descrito para *Calea zacatechichi* (Nascimento *et al*, 2006; Venegas-Flores *et al*, 2002).

O tumor sólido de Ehrlich foi utilizado para investigar se o efeito inibitório de *C. pinnatifida* é local ou sistêmico. Partindo do princípio que a dose de 200mg/Kg era tóxica e que a dose de 100mg/Kg, aplicado a cada sete dias, não apresentava um resultado satisfatório, o número de tratamentos durante o experimento foi aumentado e o intervalo entre os tratamentos foi reduzido. Com isso, nas doses de 50 e 100mg/Kg, a cada dois dias, o EBD inibiu o crescimento do tumor sólido na dose de 100mg/Kg, demonstrando o efeito sistêmico e uma forma de tratamento mais eficaz.

Tendo em vista todas essas atividades, os extratos e frações de *Calea pinnatifida*, continuam em estudo com a finalidade de isolar, caracterizar e determinar o mecanismo de ação dos seus princípios ativos.

Conclusão

- ✓ O extrato bruto diclorometânico (EBD) das folhas secas de *Calea pinnatifida*, extraídas a quente, apresentou o melhor perfil de citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas *in vitro*;
- ✓ A atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais *in vitro* foi confirmada pela atividade anti-tumoral *in vivo*, no modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich, com o aumento na sobrevivência dos animais;
- ✓ A atividade sistêmica *in vivo* do EBD foi confirmada pela atividade anti-tumoral no modelo de Tumor Sólido de Ehrlich, através da inibição do crescimento do tumor;
- ✓ A atividade *in vivo* do EBD foi dependente da quantidade de tratamentos, com elevada toxicidade nas maiores doses, como os quimioterápicos conhecidos atualmente na clínica;
- ✓ O processo de purificação originou diversas frações ativas sugerindo que o efeito observado pelo EBD é consequência de ação sinérgica de princípios ativos com origem química diferente, com destaque para as frações acetato, A, C, D e neutra apolar.
- ✓ Os resultados obtidos sugerem a continuidade desse trabalho, com objetivo de identificar os princípios ativos e comprovar o mecanismo de ação e a atividade *in vivo*.

Referências Bibliográficas

- Adams J. (2004) The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5: 417-421.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Biologia Molecular da célula*. 4^o edição, Artmed, Porto Alegre, 1313-1362.
- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS, Zani CL. (2000) Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 367-373.
- Baldwin ASJr. (2001) Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 107: 3-6.
- Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JAM. (2004) Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sciences*, 75:245-255.
- Bianco R, Melisi D, Ciardiello, Tortora, G. (2006) Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *European Journal of Cancer*, 42: 290-294.
- Bolzani VS, Young CM, Furlan M, Cavalheiro AJ, Araújo AR, Silva DHS, Lopes MN. (1999) Search for antifungal and anticancer compounds from native plants species of Cerrado and Atlantic Forest. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71: 181-187.
- Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. (1997) Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as a potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters*, 402:85-90.
- Broker LE, Krzyt FAE, Giaccone G. (2005) Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clinical Cancer Research*, 11 (9): 3155- 3162.

- Brown JM and Attardi LD. (2005) The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Nature Reviews: Cancer*, 5: 231- 237.
- Cen XN, Zhu P, Shi YJ, Ren YL, Ma MX, Yu JR. (2002) Cytokine-induced killer cells induce apoptosis of K562 cells expressed bcr-abl. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 10 (3): 201-4.
- Cragg GM and Newman DJ. (2005) Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 72-79.
- Dewick PM. (2006) The Mevalonate and Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: Dewick PM. *Medicinal Natural Products*, 2nd Edition, John Wiley & Sons LTD, England, p. 167-289.
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. (2005) Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. *Cancer Letters*, 233: 181-190.
- Fadeel B and Orrenius S. (2005) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Human Disease. *Journal of Internal Medicine*, 258: 479-517.
- Fastaia J and Dumont A. (1976) Pathogenesis of Ascites in Mice with Peritoneal Carcinomatosis. *Journal of the National Cancer Institute*, 56: 547-549.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. (1990) Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, 14:125-131.
- Ferreira ZS, Roque NF, Gottlieb OR, Oliveira F. (1980) Medicinal Compositaes of Brazil. Chemical study on *Calea pinnatifida*. *Ciência e Cultura (São Paulo)*, 32:83-85.
- Folkman J. (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current Molecular Medicine*, 3: 643-651.

- Gao S and Scott RE. (2003) Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*, 97(3): 445-52.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. (2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Emerging Trends in Basic Science*, 55 (3): 178-194.
- Hartveit F. (1965) The Immediate Cause of Death in Mice with Ehrlich's ascites carcinome. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 65: 359-365.
- Hehlhans S, Haase M, Cordes N. (2007) Signalling via integrins: Implication for cell survival and anticancer strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:163-180.
- HemaIswarya S and Doble M. (2006) Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. *Phytotherapy Research*, 20:239-249.
- Higuchi Y. (2004) Glutathione Depletion-induced Chromosomal DNA Fragmentation Associated with Apoptosis and Necrosis. *Journal Cellular and Molecular Medicine*, 8 (4): 455- 464.
- His LC, Back SJ, Eling TE. (2000) Lack of cyclooxygenase-2 activity in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 256 (2): 563-70.
- Holbeck SL. (2004) Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *European Journal of Cancer*, 40: 785-793.
- Hostettmann K. (1997) Tout savoir sur le pouvoir des plantes. Editions Favre, Lousanne.
- Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG Jr. (1995) Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature: Medicine*, 1(8): 822-6.
- Instituto Nacional do Cancer (INCA), <http://www.inca.gov.br>, 2007.

- Lewis AE, Wong BCY, Langman MJS, Eggo MC. (2003) Protein kinase C inhibition induces DNA fragmentation in COLO 205 cells which is blocked by cysteine protease inhibition but not mediated through caspases-3. *Experimental Cell Research*, 289: 1-10.
- Liscovitch M and Ravid D. (2007) A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells. *Cancer Letters*, 245:350–352.
- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez de Castro I, Alonso FJ. (2000) Inhibition of Glutaminase Expression by Antisense mRNA Decreases Growth and Tumourigenicity of Tumour Cells. *Biochemical Journal*, 348: 257-261.
- Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews: Cancer*, 2:143-148.
- Matsuura N, Yamada M, Suzuki H, Hasegawa N, Kurosaka C, Ubukata M, Tanaka T, Iinuma M. (2005) Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. *Bioscience Biotechnological Biochemical*, 69 (12): 2470-2474.
- Maxwell SA and Rivera A. (2003) Proline oxidase induces apoptosis in tumor cells, and its expression is frequently absent or reduced in renal carcinomas. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11): 9784-9.
- Mayer KD. (1966) The Pathogenicity of the Ehrlich Ascites Tumor. *British Journal of Experimental Pathology*, 47: 537-544.
- Melo OS, Justo GZ, Duran N, Haun M. (2004) Natural Killer cell activity and Anti-tumor effects of Dehydrocrotonin and its Synthetic Derivatives. *European Journal of Pharmacology*, 487: 47-54.

- Miettinen S, Ahonen MH, Lou YR, Manninen T, Tuohimaa P, Syvala H, Ylikomi T. (2004) Role of 24-hydroxylase in vitamin D3 growth response of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 108(3):367-73.
- Montero A, Fossella F, Hortobagvi G, Valero V. (2005) Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncology* 6: 229-239.
- Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y, Akao Y. (2005) A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97:242-252.
- Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Albuquerque S, Oliveira DCR. (2004b) Trypanocidal and antifungal activities of *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 663-669.
- Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Ito IY, Oliveira DCR. (2004a) Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. *Fitoterapia*, 75:514-519.
- Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro SB, Guerra RNM. (2006) Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. *Life Sciences*, 78: 2650-2653.
- Pezzuto, J.M. (1997) Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology*, 53: 121-133.
- Plas DR and Thompson CB. (2002) Cell Metabolism in the Regulation of Programmed Cell Death. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13 (2), 74 –78.

- Pruski JF and Urbatsch LE. (1988) Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. *Brittonia* 40: 341-356.
- Rates SMK. (2001) Plants as Source of Drugs. *Toxicon*, 39: 603-13.
- Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F. (2003) Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 482: 77-84.
- Rowinsky EK and Donehower RC. (1997) Antimicrotubule Agents. In: De Vita Jr VT, Helman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 467-475.
- Roy A and Saraf S. (2006) Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biology and Pharmacy Bulletin* 29: 191-201.
- Salgado Oloris SCS, Dagli MLZ, Guerra, JL. (2002) Effect of β -carotene on the Development of the Solid Ehrlich Tumor in Mice. *Life Sciences*, 71: 717-724.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Review on Oncology and Hematology*, 19: 183-232.
- Santos RI. (1999) Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5^a edição, Editora UFRGS, Brasil, p.403-434.
- Schuller HM, Falzon M, Gazdar AF, Hegedus T. (1987) Cell type-specific differences in metabolic activation of N- nitrosodiethylamine by human lung cancer cell lines. *IARC Science Publications*, 84, 138-40.
- Sebolt-Leopold JS and English JM. (2006) Mechanisms of Drug Inhibition of Signalling Molecules. *Nature*, 441: 457-462.

- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu H, Zhang Y, Nair MG, Heber D. (2005) *In vitro* Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Punicalagin, Ellagic Acid and a Total Pomegranate Tannin Extract are Enhanced in Combination with Other Polyphenols as found in Pomegranate Juice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 360-367.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening, *Journal of National Cancer Institute*, 82 (13): 1107-1118.
- Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. (2005) An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145.
- Srivasta V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja PS. (2005) Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 5892-5908.
- Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna, P. (2005) Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. *Cancer Letters*, 224: 31-43.
- Suggit, M. and Bibby, M.C. (2005) 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research*, 11: 971-981.
- Takahashi T, Kozaki K, Yatabe Y, Achiwa H, Hida T. Increased expression of COX-2 in the development of human lung cancers. *Journal Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2002, 21(2): 177-81.

- Takimoto CH. (1997) Topoisomerase Interactive Agents. In: DeVita Jr VT, Helman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles & Practice of Oncology, 5th Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 453-466.
- Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M and Rodan GA. (1988) Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proceedings of the National Academic of Science of USA*, 85(13): 4605-9.
- Tortora G, Melisi D, Ciardiello F. (2004) Angiogenesis: a target for cancer therapy. *Current Pharmacy Des*, 10:11-26.
- Ullman-Cullere MH and Foltz CJ. (1999). Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Laboratory Animal Science* 49 (3): 319-323.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. (2003) Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*, 57 (3): 205-25.
- Venegas-Flores H, Segura-Cobos D, Vázquez-Cruz B. (2002) Antiinflammatory Activity of aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45:110-111.
- Vicent PC and Nicholls A. (1967) Comparison of the Growth of the Ehrlich Ascites Tumor in Male and Female Mice. *Cancer Research*, 27: 1058-1065.
- Weinstein-Oppenheimer CR, Burrows C, Steelman LS, McCubrey JA. (2002) The effects of beta-estradiol on Raf activity cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biology Therapeutics*, 1 (3): 256-62.

- Xu D, Ye D, Fisher M, Juliano RL. (2002) Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302 (3): 963-71.
- Yamada, M., Matsuura, N., Suzuki, H., Kurosaka, C., Hasegawa, N., Ubukata, M., Tanaka, T., Inuma, M. (2004) Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 65:3107-3111.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Hara T, Tsuruo T. (2003B) Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Research*, 63(4): 831-7.
- Yang LX, Zhu J, Wang HJ, Holton RA. (2003A) Enhanced apoptotic effects of novel paclitaxel analogs on NCI/ADR-RES breast cancer cells. *Anticancer Research*, 23(4): 3295-301.
- Zhang J and Xu, M. (2002) Apoptotic DNA Fragmentation and Tissue Homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 12 (2): 84-89.

Anexos

1. Declaração de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO

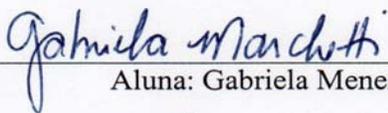
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **“Atividade Anticâncer do Extrato Bruto e das Frações obtidos de folhas de *Calea pinnatifida* Banks.”**:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº , 1421-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluna: Gabriela Menezes Marchetti



Orientador: João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1421-1**, sobre "**Atividade anticâncer do extrato bruto e frações de *Calea pinnatifida***" sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Gabriela Menezes Marchetti** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de **19 de dezembro de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1421-1**, entitled "**Anticancer activity of crude extract and fractions of *Calea pinnatifida***", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on **december 19, 2007**.

Campinas, 19 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

2. Artigo submetido à revista: International Journal of Oncology

***In vitro* and *In vivo* antitumor activity of *Calea pinnatifida* Banks crude extracts.**

Abstract

The genus *Calea* contain germacranolides as a common chemical component and have many biological activities reported, such as antiinflammatory, antiplasmodial, antifungal, antimicrobial and cytotoxic. This work aimed the evaluation of anticancer activity of a Brazilian specie, *Calea pinnatifida* Banks. Dichlorometanic (DCE) and ethanolic (ECE) crude extracts obtained from dried leaves were tested in an *in vitro* cytotoxicity assay against human cancer cell lines. As long as DCE showed the best anticancer activity profile with selectivity for the melanoma cell line (UACC-62), it was also evaluated in murine cancer models, Ehrlich Ascite Tumor (EAT) and Ehrlich Solid Tumor (EST). In EAT experiment, DCE also demonstrated an anticancer activity result by increasing the survival time of the animals in the highest dose (200 mg/Kg). In the other hand, in EST experiment, animals were submitted to a different treatment schedule which resulted in growth tumor inhibition at a lower dose (100 mg/Kg). These results encouraged following up on studies with *C. pinnatifida*, in order to identify the active principles, to determine the anticancer mechanism of action and to prove the anticancer activity in experimental xenographics cancer models *in vivo*.

Keywords: *Calea pinnatifida*, antiproliferative, anticancer, mouse, cancer models.

Introduction

Plants have provided a rich source of therapeutic agents for many centuries useful as themselves or of basis for synthetic drugs. Although the great development of organic synthesis, nowadays 25% of prescribed drugs worldwide are from plant source (Rates, 2001). Plants used as food or in folk and traditional medicine have been accepted currently as one of the main source of cancer chemoprevention drug discovery and development (Nascimento *et al*, 2006).

Calea pinnatifida, also know as “cipó cruz do norte” or “aruca”, is used in folk medicine in the treatment of stomachaches and amoebiasis. Belonging to Asteraceae family, extracts from its leaves are composed by chiefly fatty esters, a 4-glycosyloxybenzoic acid, anisic acid, sitosterol, stigmasterol, a polyacetilene and germacranolides (Ferreira *at al*, 1980).

The genus *Calea* has about 110 species, found in tropical and subtropical regions and contain the germacranolides as a common chemical component (Pruski & Urbatsch, 1988; Ferreira *et al* 1980; Yamada *et al* 2004). Many biological activities, such as antiinflammatory, antiplasmodial, antifungal, antimicrobial and cytotoxic, have been reported for this genus (Venegas-Flores *et al*, 2002; Nascimento *et al*, 2004a,b; Yamada *et al*, 2004). Besides the *Calea* activities, the germacranolides have been reported to have several activities such as apoptosis-inducement, cytotoxicity, antifungal activity and inhibitory activity against NF- κ B, which seems to be the *C. pinnatifida* substance most important in the development of anticancer agents (Matsuura *et al*, 2005; Yamada *et al*, 2004; Bork *et al*, 1997; Rivero *et al*, 2003; Nakagawa *et al*, 2005).

Since *C. pinnatifida* has not any reported studies, the aim of the present work was to examine the antitumor activity of *C. pinnatifida* crude extract in both *in vitro* and *in vivo* experimental models.

Materials and Methods

1. Phytochemical Procedures: Plant Material and Preparation of Dichlorometanic and Ethanolic Crude Extracts (DCE and ECE)

Dried grinded *C. pinnatifida* leaves collected at Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas (CPQBA) experimental field were extracted by Soxhlet with dichloromethane (1000mL; m/v 1:10) (Merck[®], Darnstadt, Germany) during forty-eight hours. The solvent was eliminated under reduced pressure at 30°C providing DCE. The plant residue was extracted with ethanol 96°GL (Merck[®]) in the same conditions cited above. The solvent was evaporated at 45°C under vacuum and freeze-dried, resulting ECE.

Biological Assays

1. In vitro Studies: Culture Cell Lines and Anticancer Assay

Human tumor cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-H460 (lung, non-small cells), OVCAR-3 (ovary), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), 786-O (renal), NCI-ADR/RES (breast expressing multiple drugs resistance phenotype) and K-562 (leukemia) were kindly provided by National Cancer Institute (NCI). Stock cultures were grown in a medium containing 5 mL of RPMI-1640 (Gibco[®], NY, USA) and supplemented with 5% of fetal bovine serum (Gibco[®], NY, USA). Gentamicine (50 µg/mL) was added to the experimental cultures. Cells in 96-well plates (100 µL cells/well; inoculation density ranging from 4 to 7×10^4 cells/mL) were exposed to various concentrations of samples in RPMI/DMSO (0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL) and incubated at 37°C, with 5% of CO₂ in air for 48 hours. The final concentration of DMSO (Sigma Chemical

Co[®], St Louis, MO, USA) did not affect the cell viability. Then, a 50% solution of trichloroacetic acid (Merck[®], Darnstadt, Germany) was added for cell fixation and, after incubation for 30 minutes at 4°C, washing and drying, the cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540nm) of the cellular protein content using sulforhodamine B (SRB) (Sigma Chemical Co[®], St Louis, MO, USA). The SRB is a anionic dye which bounds to basic aminoacids of proteins in viable cells, and therefore, its presence is a indirect indication of how many cells were alive in the moment of fixation. The absorbance data were used to construct graphs correlating the percentage of cytostaic or cytotoxic activity of the drug versus concentration of it (Skehan *et al*, 1990). By a sigmoid regression, the total growth inhibition (TGI) was calculated and a mean graph was constructed.

2. *In vivo Studies*

Animals

Adult male Swiss mice were obtained from CEMIB (Centro multidisciplinar para a investigação biológica - UNICAMP) and maintained under controlled conditions of temperature (22-24°C), light (12h light/12h dark), and humidity (45-65%), with food and water *ad libitum*. All animals used for experimental research had body weight between 30-40g and all investigation was in accordance with Bioethics Committee of Instituto de Biologia (CEEA), UNICAMP, protocol number 1421-1.

2.2. *Acute Toxicity Study*

The acute toxicity (DL₅₀) study was done to determine which concentrations could cause the potential therapeutic activity but not kill the animals, as described by Litchfield & Wilcoxon.

Three groups of five animals were injected with the following doses (i.p.) of DCE: 100, 300 and 1000 mg/kg. The number of deaths were observed during the sequent 15 days, and afterwards all animals were sacrificed. The DL_{50} was calculated by a linear regression.

2. 3. Ehrlich Ascite Tumor (EAT)

Ehrlich tumor cells were maintained in male Swiss mice through serial i.p. inoculation from a donator animal with a 9-day ascitis to a healthy receiver. After preparation of cells, the total number was determined by Neubauer chamber using trypan blue dye exclusion method [15], with tumor cell viability always higher than 90%. Cells were diluted in saline (0.9%) for final inoculation density (10^5 cells per 0.5 mL).

The anticancer activity of DCE of *C. pinnatifida* was evaluated in long terms (90 days) EAT Assays (Vicent & Nicholls, 1967). In the assay five groups of ten animals received 10^5 cells in 0.5 mL, via i.p. The drug administration (via i.p.) began on the third day after inoculation, and the groups received the following treatments: saline (vehicle) as negative control; doxorubicin (Tecnofarma International[®], SP, Brazil) 0.5 mg/kg as positive control and DCE and in three doses (50, 100 and 200 mg/kg). The animals were treated identically in the 13th and 20st days after inoculation, and every day all animals were observed and got scores for behavior and clinical conditions (Ullman-Cullere & Foltz, 1999). When one animal got the highest punctuation, it was sacrificed and this day considered the time of its death.

2. 4. Ehrlich Solid Tumor (EST)

In the assay five groups of seven animals received 10^5 cells in 0.1 mL, subcutaneously. The drug administration (via i.p.) began when the solid tumor were touched, approximately one week after inoculation, and the groups received the following treatments: saline (vehicle) as negative control; doxorubicin (Tecnofarma International[®], SP, Brazil) 0.5 mg/kg as positive control and DCE and in two doses (50 and 100 mg/kg) treated every two days. After fifteen days all animals were euthanized and their tumors were measured and weighed.

2. 5. Statistics

Kaplan-Meier survival curves from EAT were analyzed by the Log-rank test (GraphPad Prism Software[®]) and the EST by Duncan test (Statistic Software[®] $p < 0.05$).

Results

1. *In vitro* Anticancer Activity

Figures 1 and 2 show the graphics representing the *in vitro* anticancer activity. Values between 100 and zero represents growth inhibition and negative values (below zero) cell death. The evaluation of DCE and ECE in the *in vitro* anticancer assay demonstrated that DCE had best potency showing a good relationship between concentration and effect with more selectivity for melanoma (UACC) with 8,5 $\mu\text{g/mL}$ TGI value (Figure 1, Table 1).

Figure 1 shows the high potency of DCE that killed all cell lines in 250 $\mu\text{g/mL}$ except for the melanoma cell line which had already been killed with 25 $\mu\text{g/mL}$. The positive control doxorubicin cloridrate (Eurofarma[®], Uruguai) is illustrated in Figure 3 which showed high

cytotoxic activity in almost all cell lines except for NCI-ADR/RES, which expresses ovarian multidrug resistance phenotype.

The TGI (total growth inhibition) of the *C. pinnatifida* extracts and the doxorubicin demonstrated, with numbers, the potency of each extracts (Table 1). In this case DCE has much more potency than ECE. As ECE did not show any significant effect in spite of having cytotoxic activity in colon (HT-29) and leukemia (K562), DCE was selected for subsequent studies.

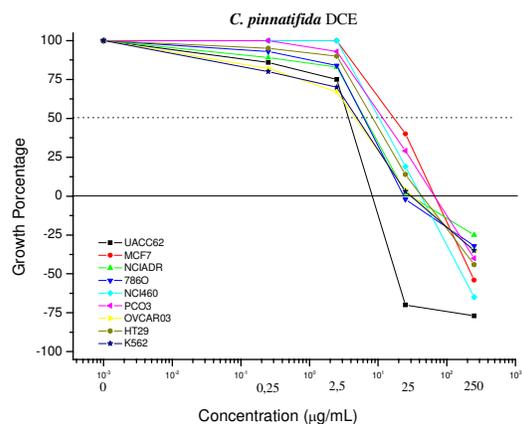


Figure 1. *C. pinnatifida* Dichloromethanic Crude Extract (DCE) anticancer activity in human tumoral cell lines relating growth percentage versus extract concentration.

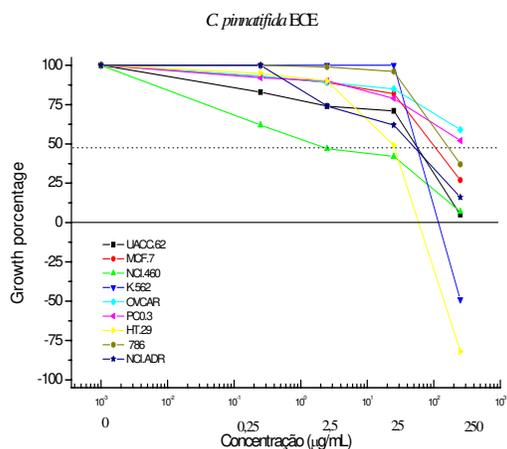


Figure 2. *C. pinnatifida* Ethanolic Crude Extract (ECE) anticancer activity in human tumoral cell lines relating growth percentage versus extract concentration.

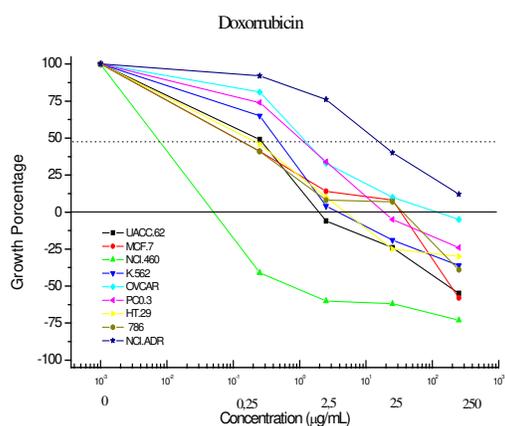


Figure 3. Doxorubicin anticancer activity in human tumoral cell lines relating growth percentage versus drug concentration.

Cell lines	Doxorubicin	DCE	ECE
UACC62 melanoma	4,15	8,45899	>250
MCF7 Breast	10,02	66,2658	>250
NCIADR resistant ovary	>250	58,2541	>250
786-O Kidney	13,17	46,8081	>250
NCI 460 Lung, no-small cell	0,098	41,8934	>250
PC-03 Prostate	31,31	69,4578	>250
OVCAR03 ovary	88,39	42,8061	>250
HT-29 Colon	8,30	50,6737	51,95
K562 leukemia	9,56	42,9121	219,90

Table 1. Comparative total growth inhibition (TGI) in human tumoral cell lines.

2. Acute Toxicity and *In vivo* Anticancer Activity

DCE showed a LD₅₀ of 500 mg/kg considered high for a crude extract, which is in agreement with most known anticancer agents. The results of this study established the doses used for treatment of animals with cancer.

The *in vivo* Ehrlich ascitic tumor anticancer activity was determined by the survival time and number of deaths of the treated groups compared to the control (Figure 4). The 200 mg/kg dose increased survival compared with negative control group ($p=0,009$). In spite of the antitumor activity, the 200 mg/Kg dose showed a high toxicity therefore part of this group died before the negative control group without any relation with tumor development. Both the 50 mg/Kg and 100 mg/Kg dose did not show any anticancer activity and the positive control (doxorubicin) increased survival, demonstrating antitumor activity ($p<0.001$).

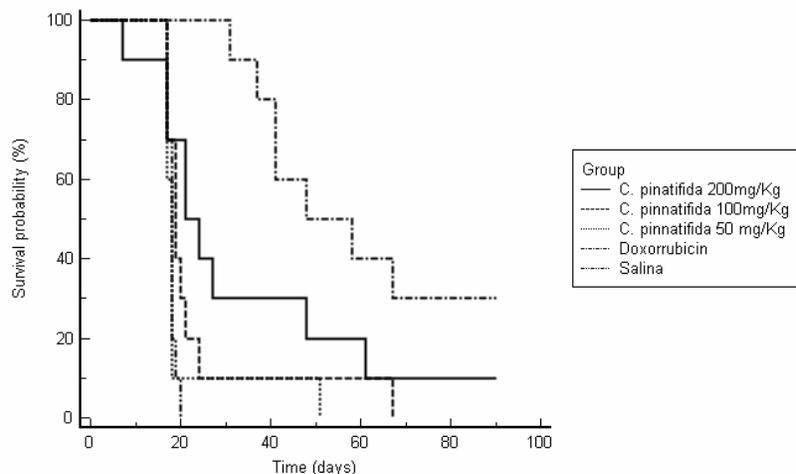


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves of mice treated with *C. pinnatifida* DCE. Doses 50 mg/Kg ($p=0.973$), 100 mg/Kg (0.202) and 200 mg/kg ($p=0.009$). Controls: saline (negative) and doxorubicin (positive) ($p<0.0001$).

The *in vivo* Ehrlich solid tumor anticancer activity was determined by the relative tumor weight. With 100 mg/Kg, DCE inhibited 66,7 % tumor growth ($p=0.002$) whereas 50 mg/Kg dose did not show any antitumor activity ($p=0.406$) and increased the tumor size. The positive control (doxorubicin) inhibited 71,6 % tumor growth ($p<0.001$).

Discussion

The number of cancer cases increase every year and an interest in alternative therapies and the therapeutic use of natural products are growing, especially those derived from plants (Rates, 2001). In order to look for new sources of therapeutic anticancer agents, many plants extracts and active principles have been studied at *in vitro* and *in vivo* cancer models, and the correlation of both studies became one of the key steps for the success of this type of research work.

Since the knowledge that different cell lines display different sensitivities towards a cytotoxic compound, the use of more than one cell line is therefore considered necessary for detection of cytotoxic compounds. Bearing this in mind, cell lines of different histological origin were used in the present study. An *in vivo* model, which could confirm the anticancer activity observed in culture cells can pass the limitations of the *in vitro* models (Smith *et al*, 2005).

Previous studies demonstrated that others *Calea* species have many different biological activities, such as cytotoxic and antiinflammatory activity (Yamada *et al*, 2004; Venegas-Flores *et al*, 2002). The present study showed, for the first time, the antitumor activity of *C. pinnatifida* extract, both *in vitro* and *in vivo* experimental models. The DCE exhibits a cytostatic and cytotoxic activity *in vitro*, with potency to inhibit cell growth at low concentrations; they killed all cell lines from 8.0 to 70.0 μ g/mL (TGI value). The melanoma cell line (UACC) demonstrated

the most sensibility against DCE extract, with cell death at 8.46 μ g/mL. That *in vitro* anticancer activity was the determining point to study the activity in a murine cancer model.

With Ehrlich ascitic tumor model (EAT), *C. pinnatifida* DCE antitumoral action was confirmed by the prolongation of life-span of treated groups. The active compound acts in tumor cells, treating some percentage of animals or prolonging the life-span of others that remains with ascitis. These results are very important, since the EAT is a very aggressive tumor (Lobo *et al*, 2000), killing the controlled group after 20 days of the tumor cells inoculation.

The Ehrlich ascitic tumor implantation induces a local inflammatory reaction, with increase vascular permeability, which results in an intense edema formation, cellular migration and a progressive ascitic fluid formation. The ascitic fluid formation is essential for tumor growing since this constitutes the direct nutritional source for tumor cells (Fecchio *et al*, 1990; Nascimento *et al*, 2006). The *C. pinnatifida* DCE extract increased animal survival, these results could indicate either a direct cytotoxic effect on tumor cells, like we have seen *in vitro*, or an indirect local effect provided by an antiinflammatory activity as described in *C. zacatechichi* (Nascimento *et al*, 2006; Venegas-Flores *et al*, 2002).

To investigate if the inhibitory effect of *C. pinnatifida* on Ehrlich tumor was local or systemic, we tested the effect of intraperitoneal injection in other experimental system, the solid Ehrlich tumor. We observed that the solid tumor was also inhibited by DCE treatment at a lower dose, 100 mg/Kg, showing a systemic effect and a more effective treatment, with more administration, reducing the administration interval.

The exact antitumor effect mechanism by which *C. pinnatifida* mediates is still unknown. However, some compounds presents in the extracts such as the germacranolides could explain these results (Ferreira *et al*, 1980). These germacranolides have been described as potent apoptosis inductor and an inhibitor of NF- κ B, an important immune and inflammatory response

mediator (Rivero *et al*, 2003; Nakagawa *et al*, 2005; Bork *et al*, 1997). The induction of apoptosis and an immunomodulatory activity are important action mechanisms searched for chemotherapies.

The present results describe the anticancer activity of *C. pinnatifida* DCE *in vitro* confirmed by a systemic *in vivo* activity. Further investigations are in progress in our laboratory to identify the active principles involved in this antitumor activity.

References

- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M. (1997) Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as a potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Letters*, 402:85-90.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. (1990) Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, 14:125-131.
- Ferreira, Z.S., Roque, N.F., Gottlieb, O.R., Oliveira, F. (1980) Medicinal Compositae of Brazil. Chemical study on *Calea pinnatifida*. *Ciência e Cultura (São Paulo)*, 32:83-85.
- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez de Castro I and Alonso FJ. (2000) Inhibition of Glutaminase Expression by Antisense mRNA Decreases Growth and Tumourigenicity of Tumour Cells. *Biochemical Journal*, 348: 257-261.
- Matsuura N, Yamada M, Suzuki H, Hasegawa N, Kurosaka C, Ubukata M, Tanaka T, Iinuma M. (2005) Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. *Bioscience Biotechnological Biochemical*, 69 (12): 2470-2474.
- Nakagawa Y, Iinuma M, Matsuura N, Yi K, Naoi M, Nakayama T, Nozawa Y, Akao Y. (2005) A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in

HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97:242-252.

- Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Albuquerque S, Oliveira DCR. (2004b) Trypanocidal and antifungal activities of *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56: 663-669.
- Nascimento AM, Salvador MJ, Candido RC, Ito IY, Oliveira DCR. (2004a) Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. *Fitoterapia*, 75:514-519.
- Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro SB and Guerra RNM. (2006) Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. *Life Sciences*, 78: 2650-2653.
- Pruski JF, Urbatsch LE. (1988) Five new species of *Calea* (compositae: Heliantheae) from Planaltine Brazil. *Brittonia* 40: 341-356.
- Rates SMK. (2001) Plants as Source of Drugs. *Toxicon*, 39: 603-13.
- Rivero, A., Quintana, J., Eiroa, J.L., López, M., Triana, J., Bermejo, J., Estévez, F. (2003) Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology*, 482: 77-84.
- Skehan P, Storeng R and Scudiero D. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening, *Journal of National Cancer Institute*, 82 (13): 1107-1118.
- Smith JA, Ngo H, Martin MC and Wolf JK. (2005) An Evaluation of Citotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology*, 98: 141-145.

- Venegas-Flores H, Segura-Cobos D, Vázquez-Cruz B. (2002) Antiinflammatory Activity of aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. *Proc. West. Pharmacological Society*, 45:110-111.
- Yamada, M., Matsuura, N., Suzuki, H., Kurosaka, C., Hasegawa, N., Ubukata, M., Tanaka, T., Inuma, M. (2004) Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*, 65:3107-3111.