



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Maria Carolina Bayeux Leme Montanari de Vasconcellos

**“Atividade antitumoral, isolamento e identificação dos
princípios ativos da *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARIA CAROLINA BAYEUX
LEME MONTANARI DE VASCONCELLOS
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor 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**

V441a

Vasconcellos, Maria Carolina Bayeux Leme Montanari de
Atividade antitumoral, isolamento e identificação dos
princípios ativos da *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc /
Maria Carolina Bayeux Leme Montanari de Vasconcellos. –
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: João Ernesto de Carvalho, Mary Ann
Foglio.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Plantas medicinais. 3. Triterpenos. I.
Carvalho, João Ernesto de. II. Foglio, Mary Ann. III.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Antitumoral activity, isolation and identification of compounds actives of
kielmeyera coriacea Mart & Zucc.

Palavras-chave em inglês: Câncer; Medicinal plants; Triterpenes.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Luciana Konecny Kohn, Rodney Alexandre
Ferreira Rodrigues, Maria José Queiroz de Freitas Alves, Aparecida Érica Bighetti.

Data da defesa: 27/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

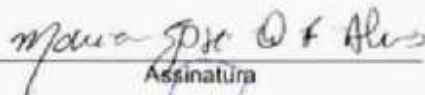
Campinas, 27 de Agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves


Assinatura

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues


Assinatura

Profa. Dra. Aparecida Erica Bighetti


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Konecny Kohn


Assinatura

Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Rehder

Assinatura

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz

Assinatura

Profa. Dra. Márcia Aparecida Antônio

Assinatura

Ao meu marido Sandro, à minha filhinha Paola, aos meus pais Eurico e Terezinha, por todo apoio, por estarem sempre ao meu lado incondicionalmente, em todos os momentos da minha vida e pelo amor e incentivo sempre constantes, dedico-lhes este trabalho.

Amo muito vocês.

**Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho,
pela oportunidade de trabalho, seriedade,
profissionalismo e amizade que
conquistamos nestes anos.**

**Por tudo, agradeço e ofereço-lhe este
trabalho.**

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade;

Ao CPQBA/UNICAMP, pelo oferecimento de sua infraestrutura, o que proporcionou a plena execução deste trabalho;

À Dra. Mary Ann Foglio, pela orientação na realização do trabalho fitoquímico, além da consideração, apoio, paciência e inestimável amizade que sempre dispensou a mim;

À Alik Teixeira Fernandes, pelo companheirismo em todos os momentos, principalmente os difíceis, e pelas palavras certas na hora certa, além do grande carinho;

À Carina Denny e a Cristiana Madjarof pela grande amizade e pelo apoio emocional sempre que precisei, e também pelo apoio na execução dos experimentos;

À Karim Maia Monteiro, à Sirlene, à Ana Possenti, à Ana Lúcia Ruiz e pelo apoio técnico prestado, pela paciência, e colaboração nos experimentos, além da amizade dispensada e também agradeço à Gabriela e Michelle.

Aos amigos estimados da Divisão de Fitoquímica do CPQBA-Unicamp, principalmente à Ilza, que contribuiu para a execução deste trabalho;

À Liliam Panagio, secretária do curso de Pós-Graduação do Programa de Biologia Celular e Estrutural - UNICAMP, pela disposição e atenção constante;

À Capes pelo apoio financeiro.

O dia mais belo? **Hoje**
A coisa mais fácil? **Equivocar-se**
O obstáculo maior? **O medo**
O erro maior? **Abandonar-se**
A raiz de todos os males? **O egoísmo**
A distração mais bela? **O trabalho**
A pior derrota? **O desalento**
Os melhores professores? **As crianças**
A primeira necessidade? **Comunicar-se**
O que mais faz feliz? **Ser útil aos demais**
O mistério maior? **A morte**
O pior defeito? **O mau humor**
A coisa mais perigosa? **A mentira**
O sentimento pior? **O rancor**
O presente mais belo? **O perdão**
O mais imprescindível? **O lar**
A estrada mais rápida? **O caminho correto**
A sensação mais grata? **A paz interior**
O resguardo mais eficaz? **O sorriso**
O melhor remédio? **O otimismo**
A maior satisfação? **O dever cumprido**
A força mais potente do mundo? **A fé**
As pessoas mais necessárias? **Os pais**
A coisa mais bela de todas? **O amor**

Madre Tereza de Calcutá

Sumário

1. Resumo.....	12
2. Abstract.....	15
3. Introdução.....	17
4. Objetivos.....	30
5. Materiais e Métodos.....	32
5.1. Processamento Fitoquímico.....	33
5.1.1. Coleta.....	33
5.1.2. Análise por cromatografia em camada delgada.....	33
5.1.3. Obtenção do Extrato Bruto Diclorometano (EBD) e do Extrato Bruto Etanólico (EBE) de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart e Zucc.....	34
5.1.4. Preparação do Extrato Bruto Diclorometânico obtido de planta seca por extração à quente.....	35
5.1.5. Fracionamento do EBDQ e da Fração 7.....	36
5.2. Ensaios Farmacológicos.....	38
5.2.1. Avaliação da Atividade Antiproliferativa “in vitro”.....	38
5.2.1.1. Células.....	38
5.2.1.2. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa dos extratos e frações.....	39
5.2.1.3. Ensaio da Sulforrodamina B (SRB).....	39
5.2.1.4. Análise dos resultados -Ensaio farmacológicos “in vitro”.....	40

5.2.2. Avaliação da Atividade Anticâncer em Modelo Animal.....	41
5.2.2.1. Screening Hipocrático.....	41
5.2.2.2. Hollow Fiber - Padronização do Método.....	42
 5.2.3. Influência do Inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS) sobre a Atividade Anticâncer	44
 5.2.4. Ensaio de Indução de Crescimento com Fibroblastos.....	45
 6. RESULTADOS.....	46
 6.1. Processamento Fitoquímico.....	47
6.1.2. Análise Química da Fração Beta (β)	48
 6.2. Ensaios Farmacológicos.....	50
6.2.1. Atividade antiproliferativa dos extratos EBD e EBE.	51
6.2.2. Atividade antiproliferativa do extrato EBDQ.	53
6.2.3. Atividade antiproliferativa da Doxorrubicina.....	54
6.2.4. Atividade antiproliferativa da Fração 1.....	55
6.2.5. Atividade antiproliferativa da Fração 2.....	56
6.2.6. Atividade antiproliferativa da Fração 3.....	57
6.2.7. Atividade antiproliferativa da Fração 4.....	58
6.2.8. Atividade antiproliferativa da Fração 5.....	59
6.2.9. Atividade antiproliferativa da Fração 6.....	60
6.2.10. Atividade antiproliferativa da Fração 7.....	61
6.2.11. Atividade antiproliferativa da Fração Alfa.....	62
6.2.12. Atividade antiproliferativa da Fração Beta.....	63
6.2.13. Atividade antiproliferativa da Fração Gama.....	64
6.2.14. Teste de Atividade Geral –Screening Hipocrático.....	65

6.2.15. Atividade “ in vivo” - Padronização do ensaio Hollow Fiber.....	66
6.2.16. Avaliação da fração 7 e da doxorubicina s.c	67
6.2.17. Avaliação da fração 7 e da doxorubicina i.p.....	68
6.2.18. Atividade sobre o Óxido Nítrico da Fração 7.....	69
6.2.19. Avaliação sobre o de Crescimento de Fibroblastos Humanos.....	70
 7. DISCUSSÃO.....	 71
 8. CONCLUSÕES.....	 82
 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 84
 10. ANEXOS.....	 99

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma de Obtenção dos Extratos Brutos Etanólico e Diclorometânico....	34
Figura 2: Fluxograma de Obtenção do Extrato Bruto Diclorometânico obtido à quente (EBDQ)	35
Figura 3: Fluxograma do Fracionamento do EBDQ e da Fração 7.....	36
Figura 4: Cromatografia em camada delgada (CCD) das Frações 1 à 7.....	37
Figura 5: Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações alfa, beta e gama....	37

Lista de Tabelas

1. Tabela 1: Linhagens Tumerais Humanas e sua Densidade de Inoculação	38
2. Tabela 2: TGI (Inibição Total de Crescimento) dos extratos e frações obtidas de <i>K.coriacea</i>	65

Resumo

1. Resumo

A *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc (Clusiaceae), conhecida popularmente como Pau-Santo (Alves e col., 2000), foi uma das espécies do Cerrado que apresentou atividade antiproliferativa significativa em ensaios preliminares, sendo então selecionada para este estudo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anticâncer, isolar e identificar os princípios ativos desta espécie. O extrato bruto diclometânico obtido à quente (EBDQ) apresentou atividade antiproliferativa (*in vitro*), portanto foi submetido ao fracionamento cromatográfico com biomonitoramento através do teste de atividade anticâncer em cultura de células tumorais humanas. Desse fracionamento obteve-se sete frações: de F1 à F7. A fração F7 mostrou melhor atividade antiproliferativa, apresentou inibição de crescimento e morte celular para a maioria das linhagens com boa correlação entre concentração e efeito, elevada potência e seletividade para mama, próstata, ovário e ovário resistente. Na avaliação *in vivo*, os camundongos (balb/c) sofreram implante de fibras semipermeáveis (Hollow Fibers) contendo em seu interior linhagens tumorais humanas (Hollingshead e col., 1995). - mama, ovário resistente e ovário. Assim, o tratamento com a fração 7, reduziu a densidade celular da linhagem de mama em 61% quando as fibras foram implantadas no abdômem (i.p), enquanto que a doxorrubicina, a droga padrão, mostrou redução de 44%. Nas fibras subcutâneas, a Fração 7 mostrou redução de 44%, mesmo valor obtido pela doxorrubicina. No câncer de ovário, tanto a Fração 7 quanto a doxorrubicina mostraram inibição significativa apenas nas fibras intraperitoneais. Os resultados obtidos *in vitro* foram reproduzidos *in vivo* sugerindo que os princípios ativos têm condições de alcançar a circulação e chegar em diferentes locais do organismo. Com isso, a identificação dos princípios ativos responsáveis por essa atividade tomou-se fundamental. Desse modo, a fração 7 foi submetida a diversos procedimentos cromatográficos, originando três frações que foram biomonitoradas pelo teste de citotoxicidade. A Fração Beta (Fr β) produziu inibição do crescimento e morte celular para a maioria das linhagens, com boa correlação entre concentração e efeito com seletividade para ovário, mama e próstata. O padrão de seletividade para as linhagens

que sofrem influências de esteróides sexuais foi a principal característica destas duas frações. A análise de espectro de massas (Mahato e col., 1994, 1997) sugeriu-se que a fração β é uma mistura de triterpenos pentacíclicos de esqueleto oleânico e ursólico. Posteriormente, foi avaliada a interferência do óxido nítrico sobre a atividade antitumoral, pois este possui atividade antitumoral dependente da concentração (Floyd e col, 2007). A fração 7 foi avaliada em cultura de mama previamente tratadas com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintetase, e LPS (Lipopolissacarídeos de *E. coli*), que estimula a produção de óxido nítrico. Os resultados demonstraram que a atividade foi reduzida na presença de bloqueio da síntese de NO e estimulada pelo LPS, sugerindo a participação do óxido nítrico no mecanismo de ação dos princípios ativos da fração 7. Também foi avaliado os efeitos citotóxicos dessa fração em células não-cancerígenas (fibroblastos) (Jorge e col., 2008). Dessa maneira, concluiu-se que embora tenha atividade antiproliferativa para linhagens celulares cancerígenas, não é citotóxica para células “normais”.

Abstract

2. Abstract

Kielmeyera coriacea Mart. (Clusiaceae), popularly known as Pau-Santo (Alves et al., 2000), was one of the Cerrado species that showed significant antiproliferative activity in previous tests and therefore was selected for this study. Activity guided fractionation of the crude dichloromethane extract was undertaken to isolate and identify the active compounds involved with the antiproliferative activity. Of seven fractions separated, fraction F7 presented best antiproliferative activity, showed inhibition of growth and cell death for most cell lines with good correlation between concentration and effect, high potency and selectivity for breast, prostate, ovarian and breast resistant to multiple-drugs. For *in vivo* evaluating, mice (balb /c) had i fibers (Hollow Fibers) containing human tumor lines implanted(Hollingshead et al., 1995) - Breast, ovarian and ovarian resistant to multiple drugs. Thus, treatment with fraction 7, reduced the cell line density - breast by 61% when the fibers were implanted in the abdomen (ip), whereas doxorubicin, the standard drug, showed reduction by 44%. With subcutaneous fibers, Fraction 7 showed reduction by 44%,which was the same value obtained by doxorubicin. With ovarian cancer lines, both Fraction 7 and doxorubicin showed significant inhibition only on abdomen fiber. The *in vitro* results were reproduced by *in viv* experimentso, suggesting that the active compounds are able to achieve different body locations. Fractionation of fraction by column chromatography Fr7 provided three main fractions. The most polar of the three fractions, Fr β , produced growth inhibition and cell death for most cell lines (*in vitro*), with good correlation between concentration and effect with selectivity for ovarian, breast and prostate. Cell line selectivity was observed for steroidal hormone type compounds. Analysis of Fr β demonstrated that this fraction is a mixture of oleaonic and ursolic acid type skeletons (Mahato e col., 1994, 1997). Subsequently, nitric oxide interference was evaluated for antitumor activity (Floyd et al, 2007). Fraction 7 previously treated with L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase enzyme, LPS (lipopolysaccharide of *E. coli*), which stimulates the production of nitric oxide was assessed *in vitro* (breast). The results demonstrated reduction of NO synthesis and stimulated by LPS, suggesting nitric oxide to be involved with the mechanism of action. Evaluation of fraction 7 on fibroblast proliferation proved not to be very cytotoxic to “normal” cells (Jorge, 2008).

Introdução

3. Introdução

Nos países mais desenvolvidas do mundo, o câncer é a segunda causa de morte da população, superada somente pelas doenças cardiovasculares (Grunfeld e col. 2004). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo de útero no sexo feminino. Com a queda da mortalidade por doenças infecciosas, tem-se observado o mesmo perfil que países desenvolvidos. Diante deste cenário fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na pesquisa, na vigilância, na mobilização social, na detecção precoce, na promoção da saúde, na assistência aos pacientes, e na gestão do SUS (INCA, 2008).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações das células normais tornando-a sem controle do seu crescimento (Thiébaud e col., 2006; Inca, 2008). De todos os casos, a grande maioria dos cânceres está associada a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar, principalmente, câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele. Outros estão em estudo, tais como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos. Outro fator importante, é que com o envelhecimento do organismo aumenta a suscetibilidade de desenvolver doença neoplásica. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê do câncer ser mais freqüente nesses indivíduos. Os fatores de risco ambientais são denominados cancerígenos ou carcinogênicos que atuam

alterando a estrutura genética (DNA) das células (Verweij e Jonge, 2000; Ballard-Barbash e Mctierman, 2007; Inca, 2008).

O surgimento da neoplasia depende da intensidade e duração da exposição das células aos carcinógenos. Por exemplo, o risco de uma pessoa desenvolver câncer de pulmão é diretamente proporcional ao número de cigarros fumados por dia e ao número de anos que ela vem fumando (Inca, 2008). No entanto, fatores genéticos associados aumentam a probabilidade do desenvolvimento dessa patologia. De acordo com pesquisas publicadas pelas revistas científicas “Nature” e “Nature Genetics”, o risco de uma pessoa ter câncer no pulmão, dependeria de variações genéticas individuais no cromossomo 15. Segundo estes estudos, um fumante que possui esta variação genética tem 80% mais chances de desenvolver câncer no pulmão, do que um fumante que não apresenta tais variações. A região do cromossomo 15, identificada por estes estudos, contém genes de receptores de nicotina que poderiam desempenhar um importante papel no desenvolvimento do câncer por favorecer a fixação da nicotina nas células, assim como de outros produtos tóxicos. Esses resultados poderão abrir novos caminhos para desenvolvimento de novas drogas e terapias (Chanock e Hunter, 2008; Hung e col., 2008).

O Desenvolvimento Tumoral

Câncer ou Neoplasia é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células em virtude do desvio dos mecanismos de controle que controlam a proliferação e a diferenciação celular (Alberts, 2004). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas por formar metástases, determinando a formação de neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno é uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelha ao seu tecido original (Almeida e col., 2005).

As causas do desenvolvimento de cânceres, normalmente resultam de agressão ao genoma celular, com alterações do DNA (mutações) ou expressão anômala de genes normais. Tais alterações levam à ativação ou inativação de genes que coordenam funções como proliferação, diferenciação e apoptose. As mutações afetam duas grandes classes de genes: genes de proliferação, que codificam proteínas envolvidas na divisão celular e genes antiproliferação, que codificam proteínas que suspendem o ciclo celular (Alberts, 2004). Por exemplo, inativação dos genes supressores de tumor (p53, RB1); ativação de oncogenes - *myc, myb, src, rãs, fos* - genes de proliferação que sofreram mutação (Semenza, 2007).

O Ciclo Celular

Existem diversos mecanismos moleculares que estão envolvidos na transformação da célula normal para a célula maligna, mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, por isso o conhecimento do ciclo celular é importante para compreender a etiologia do câncer (Li e col., 2006). A célula em repouso (que não está se replicando no momento) está na fase G0, onde o DNA apresenta-se super-enovelado, com atividade nuclear baixa. Desse estágio passa-se para a fase G1, caracterizada por expressão de genes e síntese de proteínas, preparando para a Fase S, onde a célula replica seu DNA. Na Fase G2, há síntese de componentes para a mitose (a célula novamente cresce e sintetiza proteínas). Logo após a G2, entra-se na fase M (mitose) - fase na qual a célula aumentada finalmente se divide ao meio, para produzir duas células-filhas com igual número de cromossomos, finalizando o ciclo de replicação celular, retornando então, à fase G0 (em repouso). A célula tumoral não finaliza esse ciclo (não retorna à fase G0), assim passa da fase M para nova fase G1 (Alberts, 2004; Almeida e col., 2005).

Esses eventos celulares devem ocorrer em uma ordem fixa, portanto, a célula apresenta um sistema-controle que assegura a progressão correta pelo ciclo, ativando ou inativando enzimas e proteínas responsáveis por esta progressão. Essa regulação se faz por meio de “freios moleculares”, que podem parar o ciclo em vários “pontos de checagem”, que evitam o próximo passo do ciclo antes do término do estágio precedente (Alberts, 2004). Por exemplo, os fatores de crescimento e os produtos de

oncogenes ativam a multiplicação celular, enquanto que os genes supressores tumorais, são controles que detêm a replicação celular quando há dano no DNA, para que seja reparado. Outro mecanismo regulador é a apoptose que consiste em um mecanismo pelo qual a célula promove a sua autodestruição de modo programado, sem causar dano ao tecido. Portanto, a importância desse mecanismo no organismo, é controlar a densidade populacional de células, deletando células danificadas, impedindo-as de se transformarem em células tumorais (Li e col., 2006; Bonnet e col., 2007).

Muitos quimioterápicos exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, como por exemplo, os alcalóides da vinca que agem pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às tubulinas e interrompendo a divisão celular na metáfase. (Li e col., 2006). Os agentes antimetabólicos bloqueiam a síntese de DNA, portanto são restritos à fase S do ciclo celular. Como exemplo dessa classe de quimioterápicos pode-se citar os antagonistas das pirimidinas (fluorouracil-5); mercaptoprinas (análogos das purinas) (Almeida e col., 2005).

Características das Células Tumorais

As células tumorais apresentam características que as distinguem das células normais, como por exemplo: proliferação descontrolada, indiferenciação, perda da função, invasão/metástase, angiogênese (Hemminki e Mutanen, 2001). São menos especializadas nas funções que as suas correspondentes normais e conseqüentemente os tecidos invadidos também vão perdendo suas funções em virtude da ausência de diferenciação e proliferação descontrolada (Degos, 1995). Dessa forma, compostos capazes de induzir a diferenciação são uma boa alternativa para o tratamento de câncer (Kong G, 1999). As metástases se formam a partir de células que se desprenderam do tumor primário e alcançam outros locais através dos vasos sanguíneos ou linfáticos (Semenza, 2007) e constitui a principal causa de mortalidade e morbidade da maioria dos cânceres (Choi e col., 2005; Shchors e Evan, 2007). Com constante multiplicação celular, há necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados (angiogênese) para que seja mantida a oxigenação e

nutrição destas células (Choi e col., 2005; Kaur e col., 2006). Os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais, condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico (Black e Dinney, 2007; Shchors e Evan, 2007).

Tratamento

Os tratamentos de câncer variam de acordo com o tipo e a gravidade da doença, sendo a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou ainda uma combinação destas as principais, além da imunoterapia. No caso de leucemias, pode-se recorrer ao transplante de medula (Dancey e Chen, 2006).

Como a maioria dos quimioterápicos atua em células que se encontram em processo de divisão, as neoplasias que são mais susceptíveis ao tratamento quimioterápico são aquelas que possuem elevada taxa de proliferação, como as do sistema hematopoiético. Portanto, os tumores sólidos, que apresentam divisão celular relativamente lenta, tais como carcinoma de pulmão, cólon, mama, respondem pouco aos agentes quimioterápicos existentes (Oliveira e Alves, 2002; Almeida e col., 2005). O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, porém em virtude da baixa seletividade afetam também as células normais de rápida divisão, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo, e susceptibilidade maior às infecções. O seu uso clínico exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (Oliveira e Alves, 2002).

Um dos grandes problemas da quimioterapia é a resistência a drogas. Um dos mecanismos de resistência mais estudados na atualidade é denominado “resistência múltipla” (“*multidrug resistance*” ou MDR). Através deste mecanismo, células tumorais expostas a um único tipo de quimioterápico tornam-se, simultaneamente, resistentes a quimioterápicos de natureza química diversa e que apresentam mecanismos de ação completamente distintos (Kruh, 2003; Kaur e col, 2006).

Pesquisa e Desenvolvimento de Agentes Antineoplásicos

O desenvolvimento de novas drogas anticâncer é um processo longo, dividido em duas fases distintas – A fase de testes pré-clínicos envolve a aquisição de novos compostos, estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade antitumoral, produção, formulação e toxicologia animal. Já os testes clínicos irão avaliar a atividade e toxicidade dos compostos no homem. Entre a descoberta de um novo composto com perspectivas promissoras e seu uso efetivo na terapêutica, existe um longo caminho a percorrer (mais de 10 anos) e consumo de grande quantidade de recursos (Schwartzmann e col, 1988, Pertenson e Houghton, 2004; Sausville e Newell, 2004).

Primeiramente, existe uma pré-seleção dos compostos, onde são identificadas substâncias que produzem efeitos antitumorais, definindo os compostos que passarão ao próximo estágio no programa de desenvolvimento. No jargão do desenvolvimento de drogas anti-câncer este processo é denominado “*screening*” ou “*triagem*”, e deve combinar rapidez, simplicidade e baixo custo com boas perspectiva de atividade clínica (Schwartzmann e col, 1988).

As metodologias utilizadas para descobrir uma nova droga contra o câncer vêm sendo aprimoradas continuamente. Vários aspectos precisam ser avaliados, tais como: eficácia, segurança de uso, grau de toxicidade, dose terapêutica, perfil do paciente para um novo tipo de tratamento etc. Mesmo após ser aprovada para a comercialização, ainda é preciso monitorar a existência de outros efeitos colaterais a médio prazo - antes que a licença definitiva seja concedida pelos órgãos reguladores competentes. Resumindo, o valor do estágio pré-clínico deve-se, principalmente à possibilidade de previsão da resposta do organismo a um determinado fármaco, sendo um pré-requisito aos ensaios clínicos (Kelland, 2004; Suggitt e Bibby, 2005).

Os primeiros programas de pesquisa de novas drogas antitumorais utilizavam exclusivamente leucemias murinas como modelo de triagem laboratorial. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA), iniciou um programa de triagem em

larga-escala de drogas anti-câncer, sendo que durante mais de três décadas utilizou um painel de modelos murinos, como as Leucemias murinas L1210 e P388 (Staquet e col., 1983; Suggitt e Bibby, 2005).

Tal estratégia aparentemente gerou uma seleção doença-orientada de compostos com elevada seletividade para leucemia e linfomas, basicamente com mecanismo de ação bastante similar, sugerindo que as metodologias de seleção até então utilizados foram tendenciosas. Portanto, a insuficiência de drogas para o tratamento de tumores sólidos é consequência dos modelos de triagem utilizados. Além disso, a triagem de drogas em modelos murinos revelou que a transposição dos resultados obtidos em animais para o homem nem sempre apresentava resultados compatíveis (Staquet e col., 1983; Suggitt e Bibby, 2005).

Como consequência, em 1976, o NCI introduziu um novo painel de tumores humanos sólidos que representavam os tipos histológicos mais prevalentes de câncer nos EUA. A triagem passou então a ser realizada em dois estágios. No primeiro estágio, as drogas eram selecionadas através do modelo de leucemia murina (P388) e no segundo passavam por modelos utilizando animais imunodeficientes, com implante de células tumorais humanas. Nessa segunda etapa, o NCI adotou o uso de 9 linhagens tumorais humanas em modelos *in vivo*, sem abandonar as linhagens murinas, pois as drogas eram submetidas a uma "pré-triagem" utilizando a linhagem P388. Este painel de linhagens tumorais (humanas e murinas) identificou alguns agentes antitumorais utilizados na clínica como, por exemplo, o taxol. (Suggitt e Bibby, 2005). Como complemento, foi desenvolvido o camundongo imunodeficiente (nude mice [nu/nu]), que não possui timo e, portanto células T, sendo receptores de qualquer tipo de transplante inclusive de células tumorais humanas. Em 1982, novos modelos foram introduzidos no painel do NCI, com tumores que apresentam resistência múltiplas às drogas (Suggitt e Bibby, 2005).

No final da década de 80, o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, impulsionou o desenvolvimento da metodologia para triagem "*in vitro*", onde estas células podem ser propagadas indefinidamente (Baguley e Marshall, 2004). Assim, o NCI-EUA implementou um novo sistema de triagem baseado em

“doença-orientada”. Este novo programa constituiu um painel de células cancerígenas que, atualmente conta com 60 linhagens oriundas de 8 tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário e cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Essa metodologia *in vitro* permite a avaliação das drogas em tipos distintos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outras vantagens são a rapidez e a eficiência do método que permite avaliar um número elevado de drogas em apenas quatro dias, selecionando aquelas que serão avaliadas em animais (Baguley e Marshall, 2004; Houghton e col., 2007). O principal objetivo do NCI era produzir uma triagem que seria suficientemente discriminatória para assegurar que não fossem selecionados para futuras avaliações em organismos animais compostos que não apresentassem atividade antiproliferativa *in vitro*, diminuindo bastante os custos do processo (Suggitt e Bibby, 2005)

Na padronização de uma metodologia “*in vitro*”, o NCI-USA adotou uma técnica espectrofotométrica, com um ensaio colorimétrico que utiliza a Sulforrodamina B (SRB), corante rosa brilhante que se liga às proteínas das células, sendo assim independente do metabolismo celular (Shoemaker, 2006). Esta metodologia promove uma quantificação de proteínas de modo linear com o número de células em cultura, é consideravelmente rápida, simples, possui grande sensibilidade e alta reprodutibilidade (Skehan e col, 1990).

A continuidade dos estudos com novas moléculas descobertas através da triagem “*in vitro*”, está vinculada à demonstração da sua eficácia “*in vivo*”. Desde 1995, quando Hollingshead e colaboradores (1995) validaram a metodologia utilizando fibras semipermeáveis (Hollow Fiber), esta tem sido utilizada em uma fase inicial dos estudos de drogas no NCI-EUA, e inúmeros compostos têm sido selecionados com atividade anti-tumoral (Hollingshead e col., 1995). De acordo com esta metodologia - *Hollow Fiber* (HF) , os camundongos imunodeficientes (*nude mice*) recebem um implante de fibras semipermeáveis no abdômen e no dorso, contendo linhagens tumorais humanas (Kelland, 2004). Importante notar que a porosidade dessas fibras permite a passagem de quimioterápicos e de nutrientes, mas não permitem que as células tumorais entrem em contato com as células do hospedeiro (Hollingshead e col., 1995; Suggitt e Bibby, 2005). Devido à praticidade do crescimento das linhagens em fibras, rapidez e custos, o

NCI-USA implementou o ensaio de HF como rotina de ensaios preliminares “*in vivo*” (Suggitt & Bibby, 2005).

Inicialmente, este ensaio (HF) seleciona compostos que em uma fase posterior serão avaliados em modelos xenográficos (em camundongos nude) reduzindo consideravelmente o número de compostos ativos “*in vitro*” que seriam avaliados diretamente no ensaio xenográfico (Suggitt e col., 2004). O ensaio de HF também tem sido utilizado para investigação farmacodinâmica (interação droga-alvo) de agentes anti-câncer (Suggitt e col., 2006).

Plantas Medicinais

A utilização de plantas como recurso terapêutico é uma prática muito antiga da civilização humana. Mas, com a Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos sintéticos foram adquirindo primazia no tratamento farmacológico. Isto ocorreu, entre outros fatores, pelo crescente poder econômico das grandes companhias farmacêuticas. Mesmo assim, os produtos naturais não perderam lugar na terapêutica, sendo considerados equivocadamente pela população como medicamentos seguros (Newman e Cragg, 2007). Atualmente cerca de 25% dos medicamentos prescritos na maioria dos países são de origem vegetal (Sarcoman e col., 2008), e entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos, obtidos a partir de precursores naturais (Hamburger e Hostettman, 1991).

Além disso, nos últimos anos houve um grande avanço nas pesquisas químicas e farmacológicas de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados na área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais, como por exemplo: *Phytomedicine*, *Química Nova*, *Phytochemistry*, *Journal of Ethnopharmacology* etc. Além disso, o surgimento de novas técnicas espectroscópicas,

estruturas moleculares complexas de constituintes naturais são identificadas rapidamente (Cechinel, 1998).

A análise de substâncias ativas em plantas é complexa e longa, já que muitas vezes os compostos presentes em menor proporção são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso há necessidade de um trabalho em colaboração entre químicos, farmacólogos e botânicos, isto é, necessita-se de um estudo multidisciplinar (Houghton, 2007). Essa interação se torna mais importante, quando se leva em conta a toxicidade das plantas. No Brasil, as ervas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Comparada com medicamento convencionais, a toxicidade das espécies vegetais e fitoterápicos podem parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um sério problema de saúde pública. Os efeitos adversos, as adulterações e toxidez bem como a ação sinérgica com outros fármacos ocorrem comumente. Determinadas plantas ainda podem apresentar substâncias potencialmente perigosas e por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado. Um exemplo importante é o confrei (*Symphytum officinale*), utilizado como cicatrizante devido à presença de alantoína, mas que também possui alcalóides pirrolizidínicos, comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos. Sua utilização foi condenada pela OMS depois de provocar morte por cirrose hepática (Veiga e Pinto, 2005).

Atualmente, os produtos naturais constituem uma das principais linhas de pesquisa na busca de novos agentes anticancerígenos. Drogas utilizadas na quimioterapia como vincristina e a vinblastina, isoladas de *Catharanthus roseus* e utilizadas no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular são exemplos de alcalóides de origem vegetal. Descobertas importantes como essas, ainda continuam inspirando muitos cientistas e empresas farmacêuticas na pesquisa de protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de substâncias naturais (Denny, 2007). Outro exemplo, o diterpeno plaquitolaxel (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), utilizado no câncer de ovário e de pulmão (Newman e Cragg, 2005).

Também no final de 1940 foram isolados dois alcalóides de espécies do gênero *Podophyllum*, que eram utilizadas pela população da Ásia no tratamento de câncer de

pele e verrugas. No entanto os resultados experimentais com esses alcalóides não foram encorajadores. Mais tarde foram obtidos por semi-síntese dois derivados desses alcalóides, a *ectoposida* e a *teniposida*, utilizadas no tratamento do câncer (Maciel e col., 2007). A camptotecina, um alcalóide extraído da árvore chinesa *Camptoteca acuminata*, testado em ensaios clínicos no início da década de 70, é um inibidor da enzima topoisomerase I - envolvida na manutenção da estrutura topográfica do DNA durante o processo de transcrição. Apesar de ter sua atividade antitumoral confirmada, apresentou alta toxicidade e sua utilização foi interrompida. Todavia, este composto é utilizado como protótipo no desenvolvimento de novos inibidores da Topoisomerase I, como o *topotecano* e *irinotecano* (Thompson e col., 1998).

***Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.**

Nos últimos anos o CPQBA-UNICAMP, através de projetos financiados pelo CNPq (nº 000521449/94), FAPESP (nº 95/09607-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços, desenvolveu dois projetos de avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais da Amazônia e do Cerrado do Estado de São Paulo. Parte dos recursos obtidos foi utilizado para a implantação de um Laboratório de Cultura de Células Tumerais Humanas. As Linhagens tumorais foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI-USA) e dessa maneira foi possível o desenvolvimento da mesma metodologia utilizada por esse centro de pesquisas, referência nesta área. Os extratos das espécies vegetais foram produzidos pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA-UNICAMP e pelo laboratório de Pesquisas da Amazônia (INPA). No NCI-EUA tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada no painel de algumas linhagens tumorais humanas. Embora esses projetos tenham sido planejados para comparar a atividade de extratos obtidos de plantas desses ecossistemas (cerrado e floresta amazônica), os resultados mais significativos foram obtidos com as espécies do cerrado. Dessa maneira, foi selecionada para estudo neste projeto a *K. coriacea* Mart., O CPQBA-Unicamp possui a estrutura organizacional para realizar um estudo multidisciplinar, sendo composto pelas Divisões de Agrotecnologia, Fitoquímica, Química Orgânica e Farmacêutica, Farmacologia e Toxicologia, Microbiologia, Resíduos, Biotecnologia e Recursos Microbianos. Devido ao seu caráter pluridisciplinar, a maioria dos projetos de pesquisa desse centro de pesquisas é realizada de maneira integrada, envolvendo

suas diversas divisões.

A *Kielmeyera coriacea* Mart e Zucc., conhecida popularmente como *Pau-Santo*, “*Folha Santa*”, “*Pau-de-São-José*”, “*Saco-de-Boi*” (Alves e col., 2000) é encontrada principalmente na região central do Brasil (Cortez e col., 1997). O material vegetal foi coletado na cidade de Conchal-SP, Fazenda Experimental Campininha, reserva de cerrado, sendo a exsicata depositada no Herbário do IB/UNICAMP (97/13). O extrato bruto aquoso de *K. coriacea* é utilizado no tratamento de diversas doenças tropicais como a malária, esquistossomose, leishmaniose e infecções por fungos e bactérias (Pinheiro e col., 2003). Estudos com o extrato etanólico de *K. coriacea* constataram efeitos antidepressivos e ansiolíticos em ratos (Martins e col., 2004). Um dos mais recentes trabalhos com esta espécie demonstrou que o extrato etanólico apresenta atividade anti-ulcerativa em modelos experimentais (Goulart e col., 2005). A análise do extrato diclorometano de folhas e caules de *K. coriacea* revelaram a presença de muitas xantonas, algumas exibiram atividade antifúngica, especificamente para *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans* (Zagoto e col., 2006), e outras apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (Dharmaratne e col., 1999).

Objetivos

4. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos brutos obtidos de caules e folhas de *Kielmeyera coriacea* em linhagens tumorais humanas.
- ✓ Fracionamento do extrato ativo por biomonitoramento em células tumorais humanas. Isolar e identificar o composto ativo.
- ✓ Padronização da metodologia que avalia a atividade anticâncer em células tumorais humanas introduzidas no interior de fibras semi-permeáveis em camundongos imunocompetentes e estudo da fração ativa neste modelo experimental.
- ✓ Avaliação do provável mecanismo de ação.

Materiais e Métodos

5. *Materiais e Métodos*

5.1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

5.1.1. Coleta

O material vegetal foi coletado na cidade de Conchal-SP, Fazenda Experimental Campininha, reserva do cerrado. A identificação botânica desta espécie foi realizada pelos professores Dra Maria do Carmo E. do Amaral e Dr. Volker Bittrich, Departamento de Botânica do IB–UNICAMP. A exsicata (registro: 97/13) foi depositada no Herbarium do IB/UNICAMP.

5.1.2. Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

As CCDs foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio (Merck) de dimensões de 20x20 cm com silicagel 60 F₂₅₄ (Merck). Foram eluídas com uma mistura de diclorometano/metanol 1% e 2%. A visualização dos componentes foi feita por pulverização com revelador específico, o anisaldeído (ácido acético:ácido sulfúrico:anisaldeído 50:1:0,5) (Denny, 2007). Seguido de aquecimento em estufa. As frações com compostos de R_f (*retention factor*) próximos foram reunidas em grupos.

5.1.3. Obtenção do Extrato Bruto Diclorometano (EBD) e do Extrato Bruto Etanólico (EBE) de *Kielmeyera coriacea* Mart e Zucc.

Para obtenção dos extratos brutos, 300g de caule e folhas frescas de *Kielmeyera coriacea*, foram submetidos a maceração dinâmica com diclorometano (200mL) por um período de 2 horas. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Os volumes resultantes foram reunidos e filtrados. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo a 40°C fornecendo 5g extrato bruto diclorometano (EBD).

O resíduo vegetal deste processo foi retomado em 200 mL de etanol 95% e extraído novamente por três vezes. O solvente orgânico foi evaporado, também a 40°C até a sua completa eliminação fornecendo então o extrato bruto etanólico (EBE). Este procedimento de extração com diclorometano seguido por etanol, é de acordo com o protocolo de obtenção de extratos preconizado pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos).

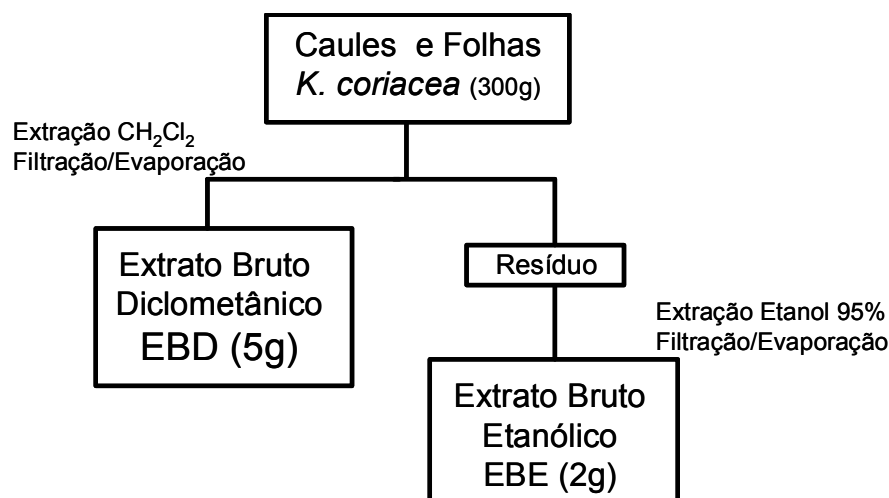


Figura 1: Fluxograma de Obtenção dos Extratos Brutos Etanólico e Diclorometânico.

5.1.4. Preparação do Extrato Bruto Diclorometânico obtido de planta seca por extração à Quente.

Para preparação do extrato bruto diclorometânico obtido à quente, o material vegetal (300g) seco e moído de *Kielmeyera coriacea* foi extraído a 40° C em 2L do solvente diclorometânico, através de aquecimento em balão de vidro acoplado a um condensador de refluxo (aparelho sohxlet). Após a filtração o extrato foi concentrado sob vácuo até a completa remoção do solvente obtendo-se 70g do extrato bruto diclorometânico quente (EBDQ). Para finalizar foi adicionado carvão ativado, para retirada das clorofilas e após filtração o solvente foi evaporado.

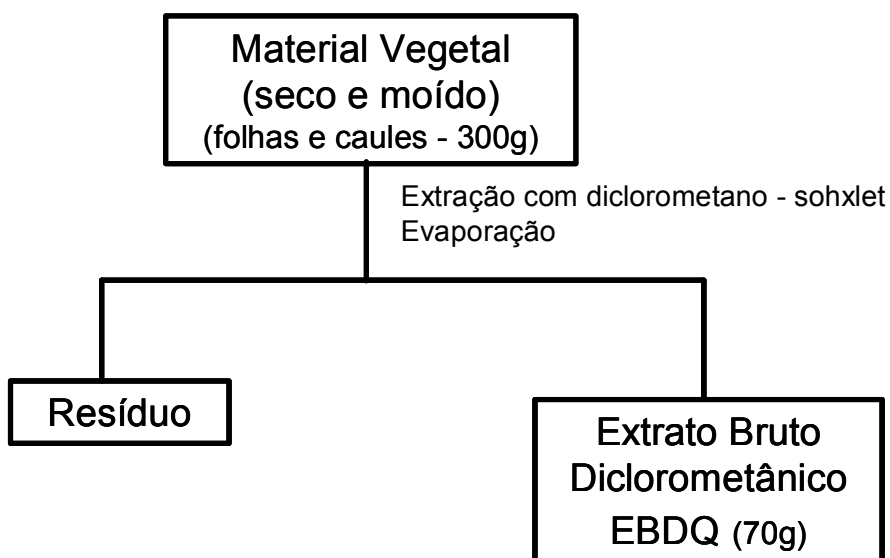


Figura 2: Fluxograma de Obtenção do Extrato Bruto Diclorometânico obtido à quente (EBDQ)

5.1.5. Fracionamento do EBDQ e da Fração 7

O EBDQ (10g) de *K. coriacea*, impregnado em sílica-gel foi submetido a uma cromatografia de coluna filtrante utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. As frações eluídas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (Eluente: dicloro/metanol 1 %) e agrupadas segundo perfis cromatográficos semelhantes, obtendo-se sete frações distintas denominadas F1 (2g), F2 (1,3 mg), F3 (1,1 mg), F4 (1g), F5 (750 mg), F6 (1,5g) e F7 (1g). Este procedimento foi repetido algumas vezes para se obter maior quantidade da fração 7. A fração denominada sete (1g) foi purificada por sucessivas cromatografias de adsorção em coluna de sílica-gel utilizando-se misturas de diclorometano/metanol com gradiente crescente de polaridade de 1%. As frações eluídas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (Eluente: dicloro/metanol 2%) e agrupadas segundo perfis cromatográficos semelhantes, obtendo-se 3 frações distintas, denominadas Fr Alfa, Fr Beta (100mg) e Fr Gama.

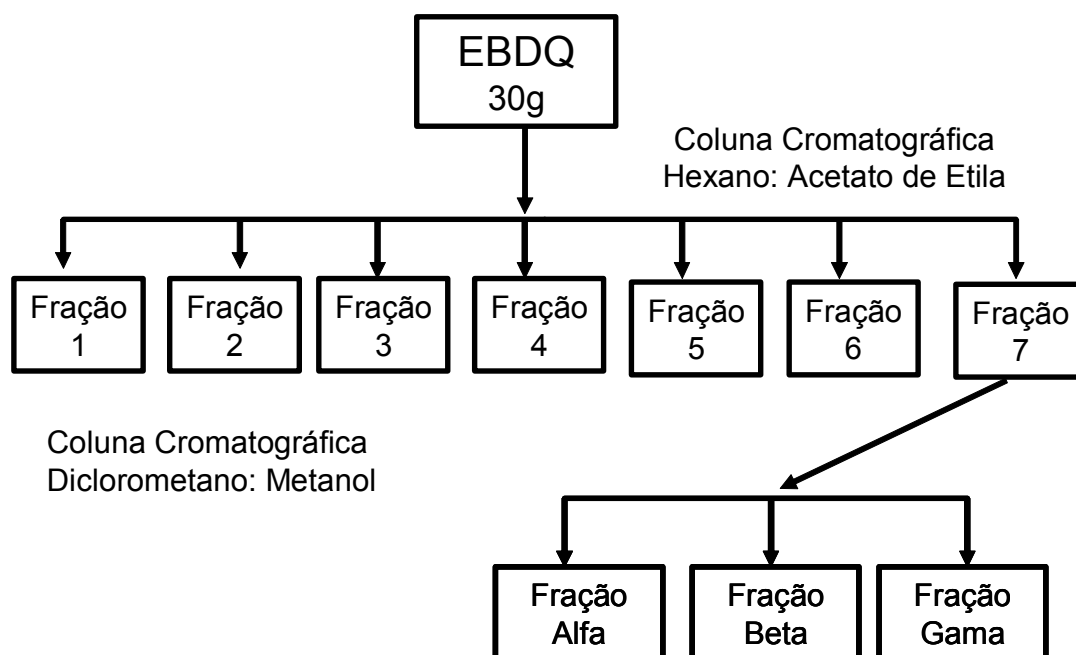


Figura 3: Fluxograma do Fracionamento do EBDQ e da Fração 7

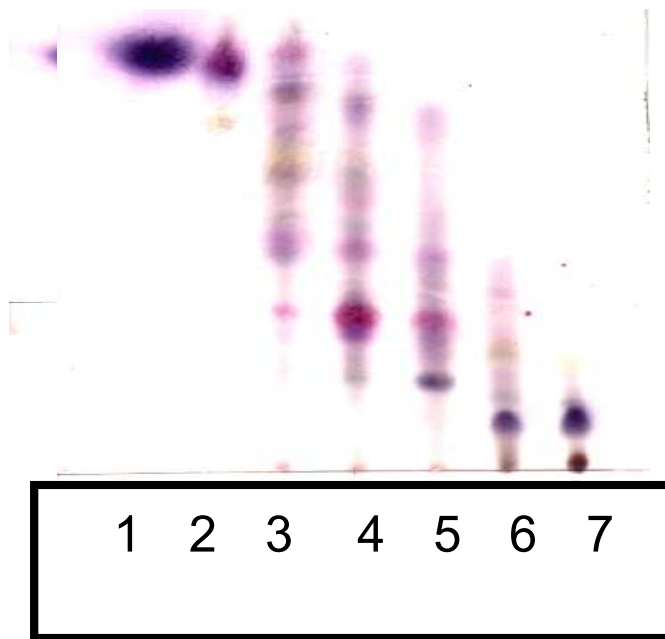


Figura 4: CCD das Frações 1 à 7

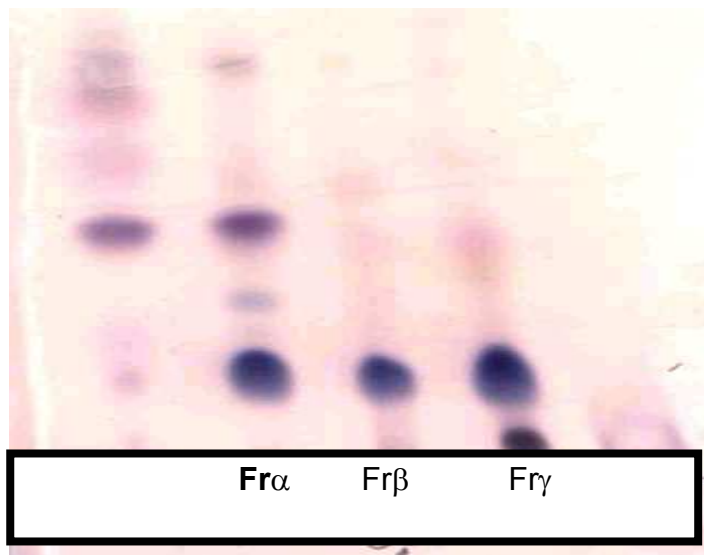


Figura 5: CCD das frações Alfa, Beta e Gama

5.2. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

5.2.1. Avaliação da Atividade Antiproliferativa “*in vitro*”

5.2.1.1. Células

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas ao CPQBA pelo “National Cancer Institute” (NCI - USA) (Tabela 1). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (Nunc), com 5 mL de meio RPMI (Gibco) suplementados com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ em ambiente úmido. Estas células são repicadas quando atingem cerca de 80% de confluência e por no máximo 20 vezes consecutivas.

Tabela 1. Linhagens Tumerais Humanas e sua Densidade de Inoculação.

Tipo Celular	Nome	Origem	Densidade de Inoculação (10 ⁴ células/ mL)
Pulmão	NCI-H460	Endoderme	4,0
Mama	MCF-7	Ectoderme	6,0
Ovário Resistente	NCI-ADR/ RES	Ectoderme	5,0
Cólon	HT-29	Endoderme	4,0
Próstata	PC-3	Mesoderme	5,0
Melanoma	UACC-62	Ectoderme	5,0
Ovário	OVCAR-3	Mesoderme	7,0
Renal	786-0	Mesoderme	4,5
Leucemia	K-562	Mesênquima	5,0

5.2.1.2. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa dos extratos e frações vegetais

Foram plaqueados 100 μ L de células em meio RPMI/SFB com 50 μ g/mL de gentamicina, em placas de 96 compartimentos. Após um período de incubação de 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido, foram adicionados 100 μ L do extrato nas concentrações de 0,25; 2,5; 25; 250 μ g/mL. Uma placa controle foi fixada para determinação da concentração protéica existente no momento da adição das amostras (T0). As demais placas com extratos, foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições. Após este período de incubação, o experimento foi interrompido com a adição de 50 μ L de ácido tricloroacético a 50%, por 60 minutos a 4 °C.

5.2.1.3. Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)

As placas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), foram submetidas a cinco lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio de cultura, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de SRB a 0,4 % dissolvido em ácido acético a 1 % e incubadas a 4 °C, por 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm por leitor de microplacas. A sulforrodamina B é um corante protéico 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 e col., 1990)

5.2.1.4. Análise dos resultados - Ensaios farmacológicos “*in vitro*”

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 $T \geq T_0$ mas $< C$, 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 $100 \times [(T - T_0) / (C)]$

Sendo que T é a média da absorvância 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 inibição 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 das absorvâncias, são calculados os valores TGI (total growth inhibition), que é a concentração da droga teste onde $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)] = 0$, ou seja é a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (efeito citostático). Esses valores são utilizados para comparar a potência das amostras e construir os gráficos comparativos, evidenciando a seletividade (HOLBECK, 2004; Shoemaker, 2006).

5.2.2. Avaliação da atividade anticâncer em modelo animal.

ANIMAIS

A atividade farmacológica foi avaliada em camundongos machos imunocompetentes Balbc/c (25-30g) fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Durante o período de adaptação de 7 dias, os animais foram aclimatados às condições do laboratório, portanto, mantidos em câmaras com temperatura controlada ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia (CEEA, UNICAMP, protocolo: 1252-1)

5.2.2.1. Screening Hipocrático

Para a determinação do perfil de toxicidade aguda das substâncias ativas os animais foram separados em 4 grupos de 10 animais cada, de acordo com o tratamento.

Os camundongos foram tratados com a Fração 7 (Fr7) da *K. coriacea* por via intraperitoneal nas doses de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 g/kg. Os extratos foram diluídos em salina 0,9% e um animal de cada grupo foi tratado com salina (controle negativo). Os efeitos gerais foram observados por um período de 15 dias. Os principais efeitos observados foram: alterações de peso corporal, eriçamento dos pêlos, diarreia, convulsões, estado de consciência e disposição; coordenação motora; tônus muscular; reflexos (Campbell e Richter, 1967).

5.2.2.2. Hollow Fiber - Padronização do Método

Hollow Fiber

Foram utilizadas Fibras Semipermeáveis de Fluoreto de Polivinilidina com 1 mm de diâmetro e porosidade 500000 Da (Hollow Fibers). Antes da sua utilização, as fibras foram incubadas com etanol 70% por 72 horas. Após a retirada do etanol com água deionizada, as fibras foram autoclavadas para esterelização. Para o implante, as fibras após serem lavadas com RPMI (com 20% de soro fetal bovino – SFB), foram preenchidas com células (MCF-7, NCI-ADR e OVCAR na concentração de 10^6 células/mL) e seccionadas em pedaços de 2 cm por pinça hemostática previamente aquecida em incinerador. Além de seccionar, a pinça sela as extremidades da fibra impedindo o extravasamento das células. As fibras foram incubadas em placas de 6 divisões durante 24 horas (37°C - 5% - CO₂). Posteriormente, foram implantadas nos animais. Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de quetamina (20 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal), administrada intraperitonalmente (i.p). Para o implante intraperitonal, foi feita uma pequena incisão na pele e musculatura da parede abdominal e as fibras inseridas na cavidade intraperitonal. Foram implantadas 3 fibras, cada uma com uma linhagem diferente. Outras 3 fibras foram implantadas no dorso do animal sob a pele (implante subcutâneo), sendo que uma pequena incisão foi feita na região cervical (Hollingshead et al., 1995). Foram utilizadas fibras de cores diferentes (branco, amarelo e azul) para identificação das linhagens celulares.

Os camundongos foram divididos em três grupos (n=8) de acordo com as drogas em avaliação. No grupo controle negativo foi administrado salina (NaCl 0,9%), nos grupos tratados foram administrados: doxorubicina como controle positivo (6 mg/kg) e a Fração 7 (1g/kg). A Fração 7 foi administrada diariamente, via intraperitonal após 3 dias do implante das fibras, durante 14 dias. A doxorubicina foi administrada 2 vezes: 5 e 10 dias após o implante. O peso corporal foi determinado diariamente e no décimo quarto dia, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical; as fibras foram retiradas do corpo e depois de removidos o excesso de tecido do hospedeiro,

depois foram colocadas em placas com 6 divisões, contendo 2 mL de meio de cultura (com 20% de SFB), e incubadas por 30 min a 37°C.

Ensaio – MTT

Para avaliação da viabilidade da célula contida dentro das fibras intactas, utilizou-se o ensaio desenvolvido com o corante sal tetrazolium- MTT (MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5difeniltetrazolium brometo). Esse sal, de coloração amarela, na presença de desidrogenases mitocondriais transforma-se em formazan de coloração rósea púrpura e solúvel em veículos aquosos. Esta metodologia determina a atividade através da leitura espectrofotométrica (540 nm) do composto formado, sendo sua concentração diretamente proporcional ao número de células viáveis. Foi adicionada em cada disco contendo as fibras: 1 mL de meio de cultura (20% de SFB) contendo 1 mg MTT/mL. Depois de 4 horas de incubação a 37°C, o meio de cultura foi removido por aspiração, para a adição de 2 mL de uma solução de protamina sulfato 2,5% e estocadas a 4 °C por pelo menos 4 horas. Para avaliar a densidade óptica das amostras, as fibras foram transferidas para placas de 24 divisões, o que permite secar durante a noite. A seguir, o cristal de formazan foi extraído de cada amostra com dimetilsulfóxido (DMSO), 250µL/divisão por 4 horas a temperatura ambiente. Alíquotas de 150µL foram transferidas para placas de 96 divisões para leitura óptica em ELISA (540 nm) (Rubinstein e col., 1990).

Análise dos Dados.

A densidade celular das células retiradas das fibras dos animais foram expressas em porcentagem de crescimento (%), definidas como:

$$\frac{(\text{Absorbância das células do dia da retirada das fibras} - \text{Média absorbância das células do dia da implantação}) \times 100}{\text{Média de absorbância do dia da implantação das fibras}}$$

Média de absorbância do dia da implantação das fibras

O valor representa a porcentagem de inibição de crescimento das células na fibra comparada com o dia da implantação. O resultado foi submetido a análise de variância seguida pelo teste de Duncan com nível de significância $p < 0,05$ para todos os testes.

5.2.3. Influência do Inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS) sobre a Atividade Anticâncer

Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. Coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma). Preparado em solução estoque na concentração de 1000 µg/mL em RPMI, que foi diluído para atingir a concentração final de 5 µg/mL.

L-NAME: NG-nitro-L-Arginina metil Éster – Inibidor da Óxido Nítrico Sintase

Procedimento:

Cem microlitros de suspensão das células - MCF-7 e OVCAR03 – nas suas respectivas densidades de inoculação em meio de cultura (RPMI) foram inoculadas em microplacas de 96 orifícios. Após 24 horas, foram adicionadas as amostras a serem testadas: Fração 7; Fração 7+ L-NAME e Fração 7 + LPS, que foram incubadas em estufas contendo 5% de CO₂ a 37°C, por 24 horas. Para a avaliação da viabilidade celular utilizou-se o ensaio com o corante sal tetrazolium- MTT. (Xie e Huang, 2003; Feder e Laskin, 1994).

5.2.4. Ensaio de Indução de Crescimento com Fibroblastos:

Os fibroblastos humanos (“células normais”) foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino. Estes fibroblastos foram obtidos de material de explante, (doados pela Alergisa Dermato- Cosmética Ltda), e mantidos em cultura a 37°C, atmosfera úmida com 5% de CO₂.

O ensaio (Jorge e col., 2008) consistiu em inocular 100µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos, de uma suspensão de fibroblastos, com densidade de inoculação de 3×10^4 cel/mL, em meio DMEM/SFB 10% com Gentamicina 0,1%. Foi preparada também uma placa, denominada T0 que serviu para indicar a quantidade de células presentes na placa teste, no momento da inoculação das amostras. Após 24h de incubação (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂), o meio de cultura foi aspirado, 100µL/compartimento de meio DMEM suplementado com 0,3% de soro fetal bovino foram adicionadas e as placas incubadas por 48h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO₂). Ao final desse período, foram adicionados 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). Como controle positivo foi utilizada a alantoína, xantina isolada de *Calendula officinalis*, mesma concentração da amostra. As placas foram então incubadas por 72h. Ao final desse período, todo o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM/SFB 10%, a seguir as células foram incubadas por 24h, antes da coloração com MTT (Jorge e col., 2008).

Resultados

6. Resultados

6.1. Processamento Fitoquímico

Todo o processo de fracionamento foi orientado pelos testes de atividade em cultura de células tumorais humanas. Dessa forma, o extrato bruto diclometânico obtido à quente foi o que apresentou melhor perfil de atividade e por isso foi selecionado para o fracionamento. Do processo inicial de fracionamento do EBDQ obteve-se sete frações, das quais a Fração 7 apresentou o melhor perfil de atividade. O seu fracionamento resultou em três frações, sendo a Fração β a mais ativa, portanto foi encaminhada ao Instituto de Química da UNICAMP para identificação química dos seus princípios ativos.

6.1.2. Análise Química da Fração Beta (β)

A fração denominada fração β , quando analisada por cromatografia de camada delgada (CCD) eluída em CHCl_3 /metanol 2% e revelada com reagente de anisaldeído, apresentou uma única mancha de coloração violácea. A análise por espectro de massas (Q-Tof Micromass), RMN¹H e ¹³C, porém, demonstrou tratar-se de uma mistura.

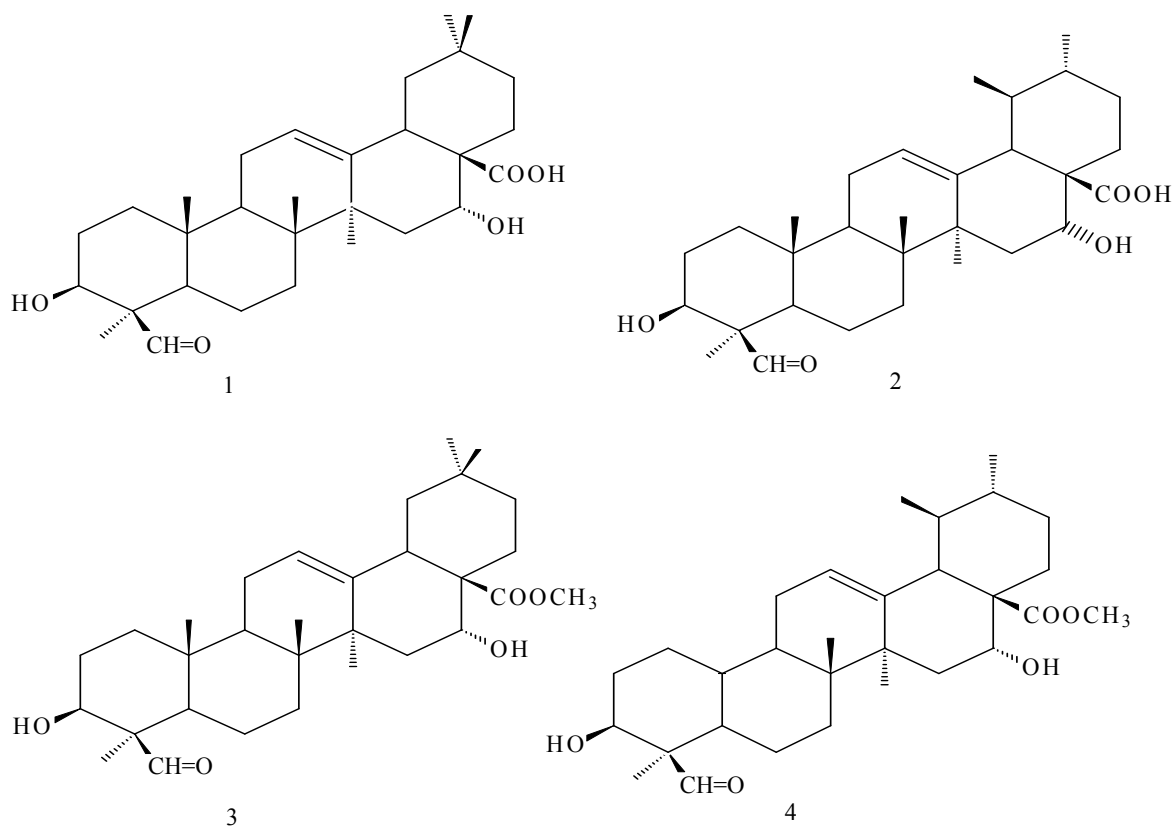
A fração β apresentou no espectro de infravermelho uma banda larga em 3427,7 cm^{-1} correspondente ao grupo OH e uma outra em 1659,4 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O e outra em 1454 cm^{-1} devido ao estiramento C-O do íon carboxílico. Também se observou estiramento C=O em 1711,3 cm^{-1} correspondente ao grupo aldeído. A análise por ESI-MS demonstrou íon molecular com m/z 514 e m/z 528 m/z.

Através de comparação dos espectros de RMN¹H, RMN¹³C com dados de terpenos da literatura (Mahato e col., 1994, 1997 & Seebacher et al., 2003) sugeriu-se que a fração β tratava-se de uma mistura de triterpenos pentacíclicos de esqueleto oleânico e ursólico. Segundo dados descritos por Mahato e col., (1994) o esqueleto triterpênico oleânico e ursólico podem ser diferenciados bastando observar os deslocamentos químicos de RMN¹³C dos carbonos olefínicos. Neste caso observa-se um padrão de deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos no espectro de RMN¹³C compatíveis com o esqueleto dieno heteroanular em C12 – C13 e C15- C16 com deslocamentos em δ 127,1, 125,8, 136,6 e 133,4 ppm respectivamente.

A comparação dos dados de RMN¹³C descritos por Mahato e col., (1994) de grupos hidroxilas axiais e equatoriais no C-3 para triterpenos são diferenciadas por aproximadamente 2,0-6,5 ppm nos seus deslocamentos químicos. Enquanto a hidroxila em C-3 no isômero equatorial é menos protegida (δ 79,0 ppm), e no isômero axial observa-se um efeito de proteção de aproximadamente 2,5 ppm (δ 76,4). O efeito de substituição de carbonos carbonílicos dos triterpenos não está diretamente dependente da stereoquímica do grupo hidroxílico. O efeito estará relacionado à possibilidade do número de carbonos com hidrogênios disponíveis as interações γ - gauche com as hidroxilas, como também com as interações 1-3 diaxial dos grupos hidroxílicos com

átomos de carbonos. Na ausência de interações 1-3 diaxial nota-se um maior efeito de desproteção para os carbonos carbinólicos cujo epímero esteja na posição equatorial (Mahato e col., 1994).

Através da análise dos dados de RMN¹³C no experimento DEPT 90° e 135° foi possível identificar carbonilas de aldeído, éster e ácido orgânico que condizem com as estruturas 1, 3 (Oleânico) 2 e 4 (Ursólico).



6.2. Ensaios Farmacológicos

Com a média dos valores de absorbância foram calculados os percentuais de inibição de crescimento que, por sua vez, foram utilizados para a elaboração dos gráficos de atividade. Nesses gráficos relacionando essa porcentagem de crescimento com a concentração dos extratos, os valores abaixo de 50% e acima da linha zero indicam que ocorreu inibição de crescimento. A linha zero representa a quantidade de células após 24hs de incubação, imediatamente antes da adição dos extratos. Portanto os valores abaixo da linha zero indicam que houve morte celular, pois o conteúdo de proteína está abaixo do encontrado no momento da adição do extrato. Para análise da atividade são considerados os seguintes parâmetros: boa correlação entre concentração e efeito, seletividade e potência. Como parâmetros mínimos de atividade são considerados os percentuais de inibição de crescimento acima de 50% (abaixo da linha pontilhada nos gráficos).

6.2.1. Atividade antiproliferativa dos extratos EBD e EBE.

O gráfico 1 representa a curva-concentração-resposta do EBE sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que este extrato apresenta atividade citostática (inibição de crescimento) para todas as linhagens celulares, na concentração de 25 µg/mL.

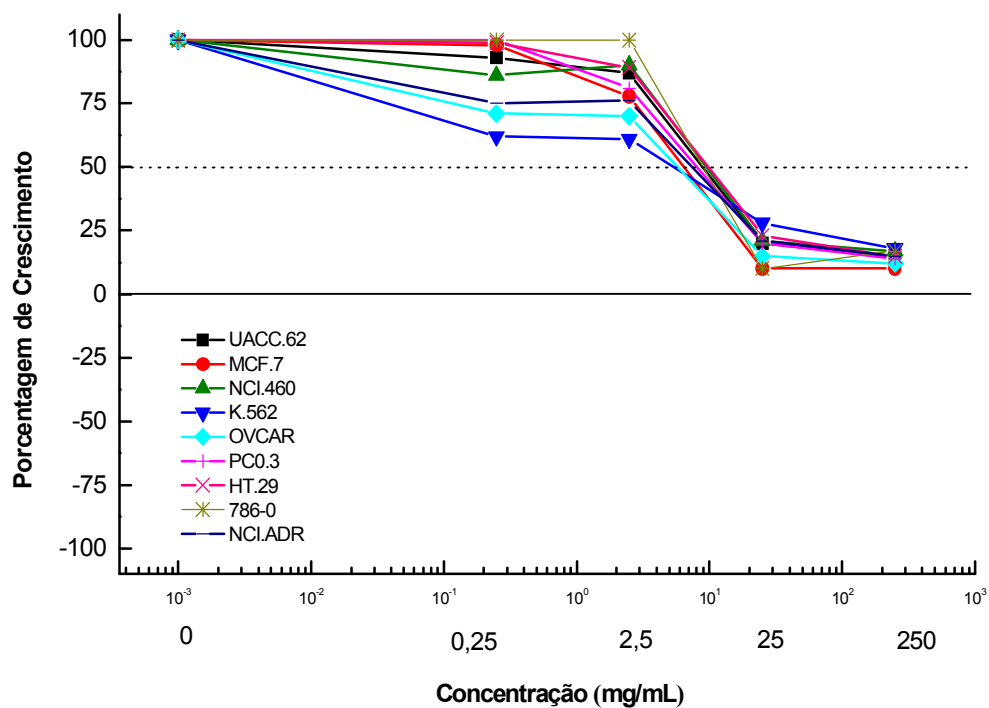


Gráfico 1: Curva concentração-resposta do EBE sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento das células e a concentração do extrato.

O gráfico 2 representa a curva-concentração-resposta do EBD sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que este extrato apresenta atividade citostática, para melanoma (UACC-62) e ovário resistente (NCI-ADR) e atividade citocida para as outras linhagens celulares, com seletividade para leucemia (K-562).

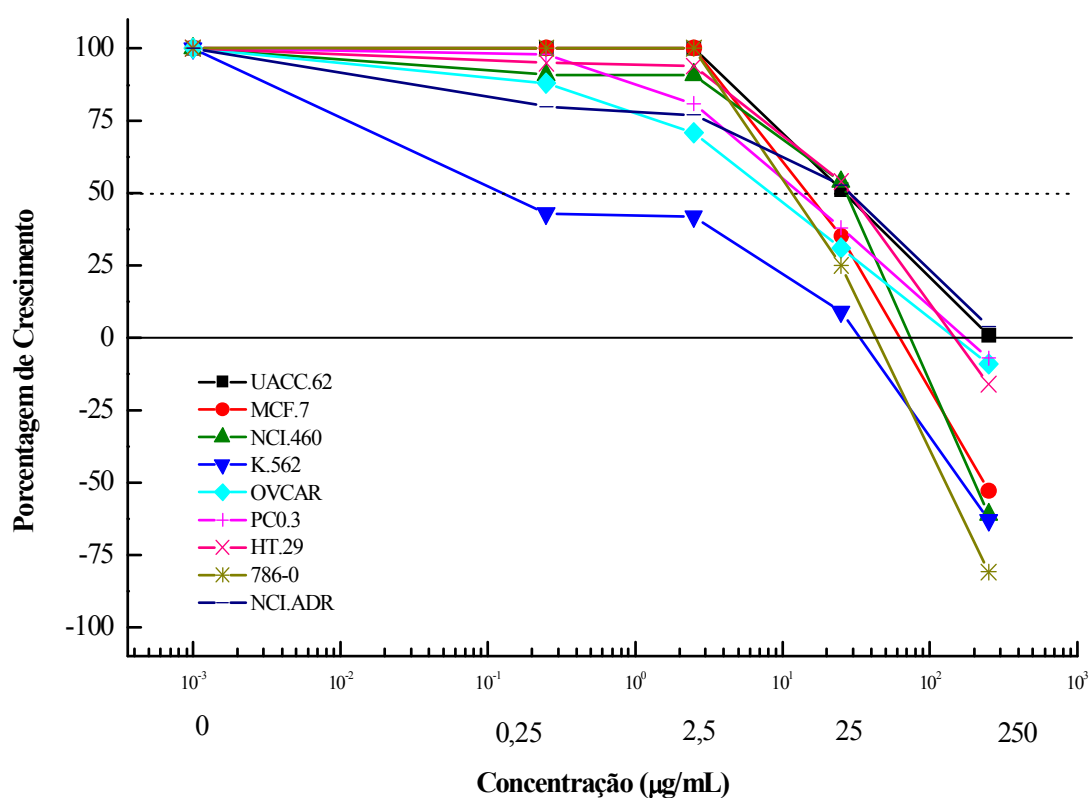


Gráfico 2: Curva concentração-resposta do EBD sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.2. Atividade antiproliferativa do extrato EBDQ.

O gráfico 3 representa a curva-concentração-resposta do Extrato bruto obtido a quente (EBDQ) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que este extrato inibiu o crescimento e provocou morte celular com boa correlação entre concentração e efeito para todas as linhagens, com seletividade para HT-29 (côlon), ovário (OVCAR) e rim (786.0) e leucemia (K562).

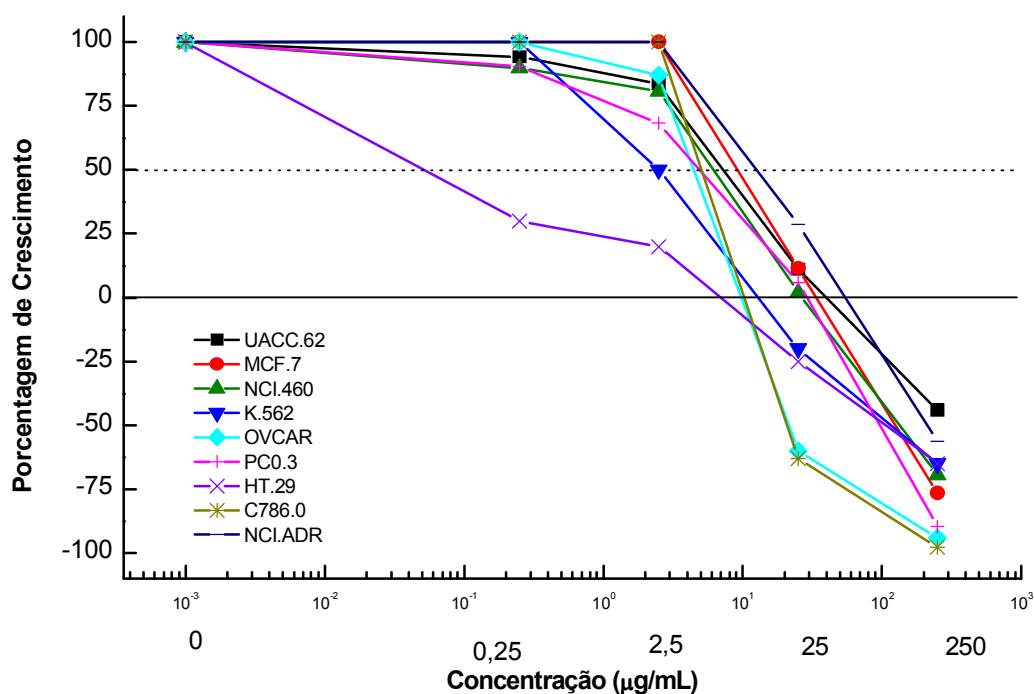


Gráfico 3: Curva concentração-resposta do EBDQ sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.3. Atividade antiproliferativa da Doxorubicina

O gráfico 4 representa a curva-concentração-resposta da doxorubicina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a doxorubicina apresentou inibição de crescimento para todas as linhagens, exceto para a de ovário resistente e morte celular exceto para próstata (PCO-3), pulmão (NCI-460) e ovário resistente (NCI-ADR), com seletividade para as linhagens de rim (786), leucemia (K 562) e cólon (HT-29).

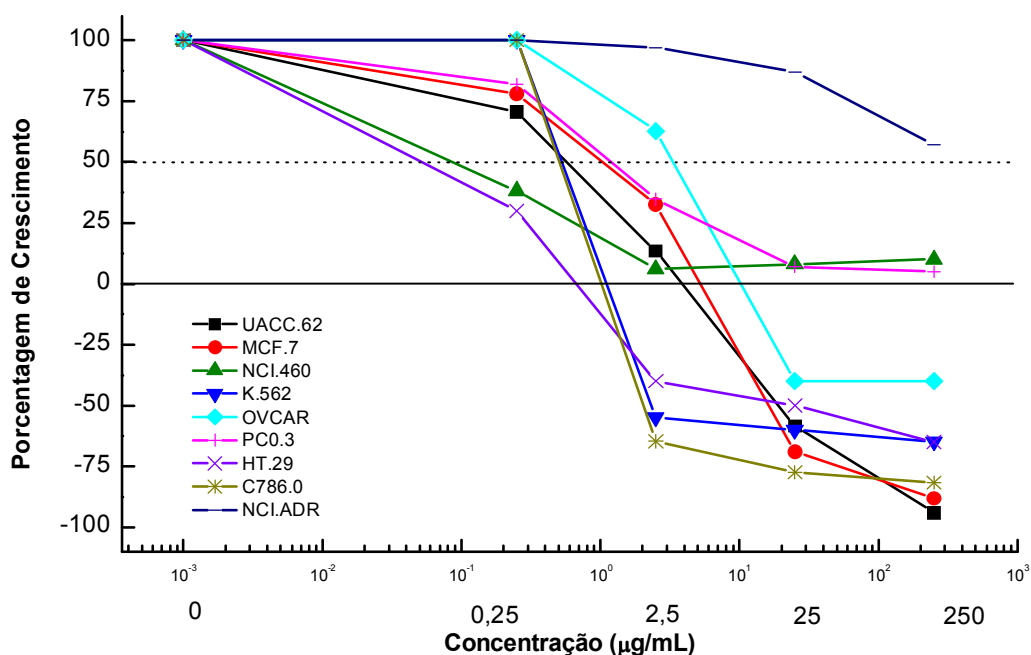


Gráfico 4: Curva concentração-resposta da doxorubicina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da droga utilizada.

6.2.4. Atividade antiproliferativa da Fração F1

O Gráfico 5 representa a curva-concentração-resposta da fração F1 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F1 não apresentou efeito significativo.

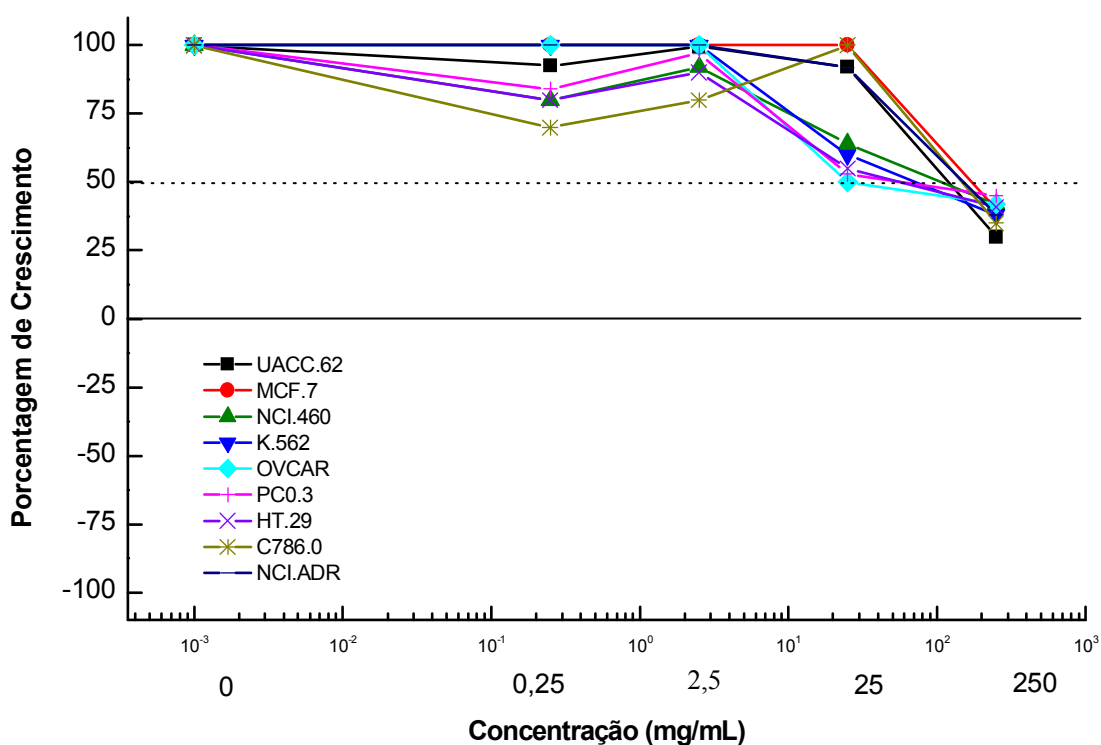


Gráfico 5: Curva concentração-resposta da fração F1 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.5. Atividade antiproliferativa da Fração F2

O gráfico 6 representa a curva-concentração-resposta da fração F2 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F2 não apresentou efeito significativo.

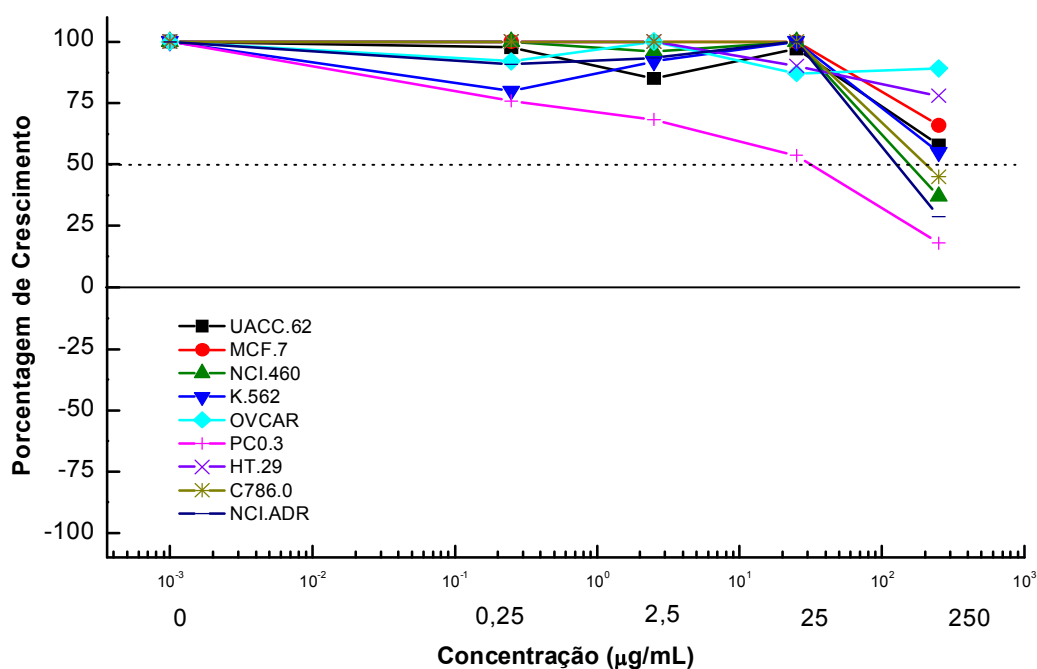


Gráfico 6: Curva concentração-resposta da fração F2 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.6. Atividade antiproliferativa da Fração F3

O gráfico 7 representa a curva-concentração-resposta da fração F3 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F3 produziu inibição de crescimento sobre todas as linhagens.

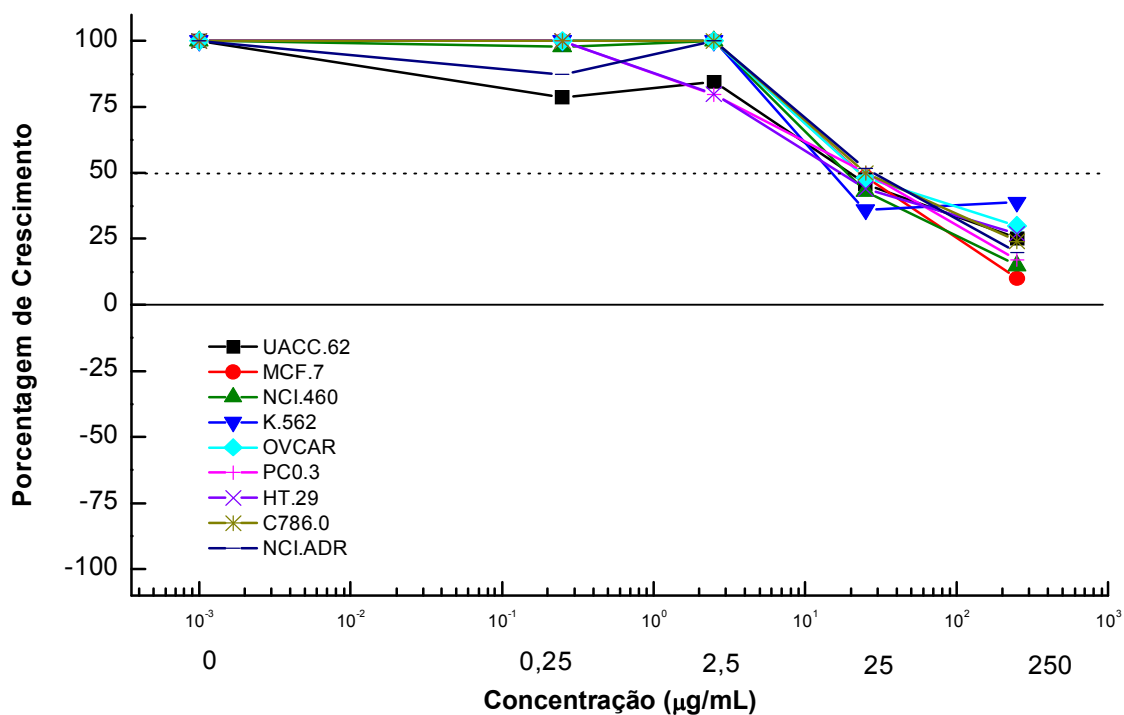


Gráfico 7: Curva concentração-resposta da fração F3 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.7. Atividade antiproliferativa da Fração F4

O gráfico 8 representa a curva-concentração-resposta da fração F4 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F4 produziu inibição de crescimento sobre todas as linhagens.

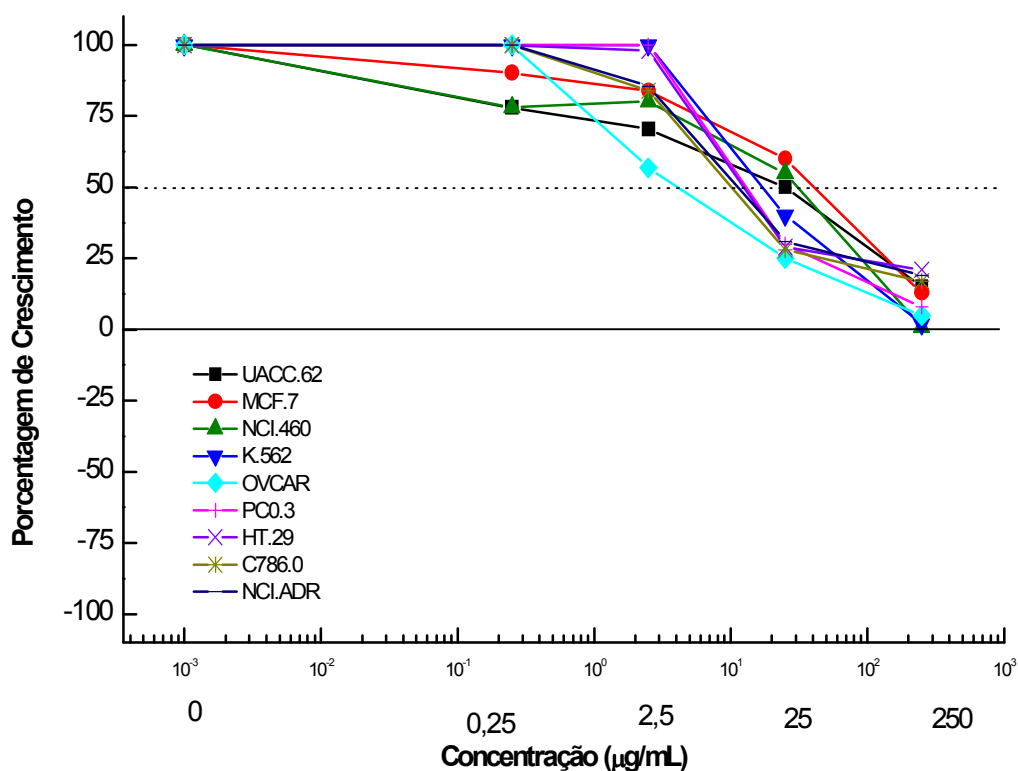


Gráfico 8: Curva concentração-resposta da fração F4 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.8. Atividade antiproliferativa da Fração F5

O gráfico 9 representa a curva-concentração-resposta da fração F5 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F5 produziu principalmente inibição de crescimento com boa correlação entre concentração e efeito, mas sem qualquer seletividade.

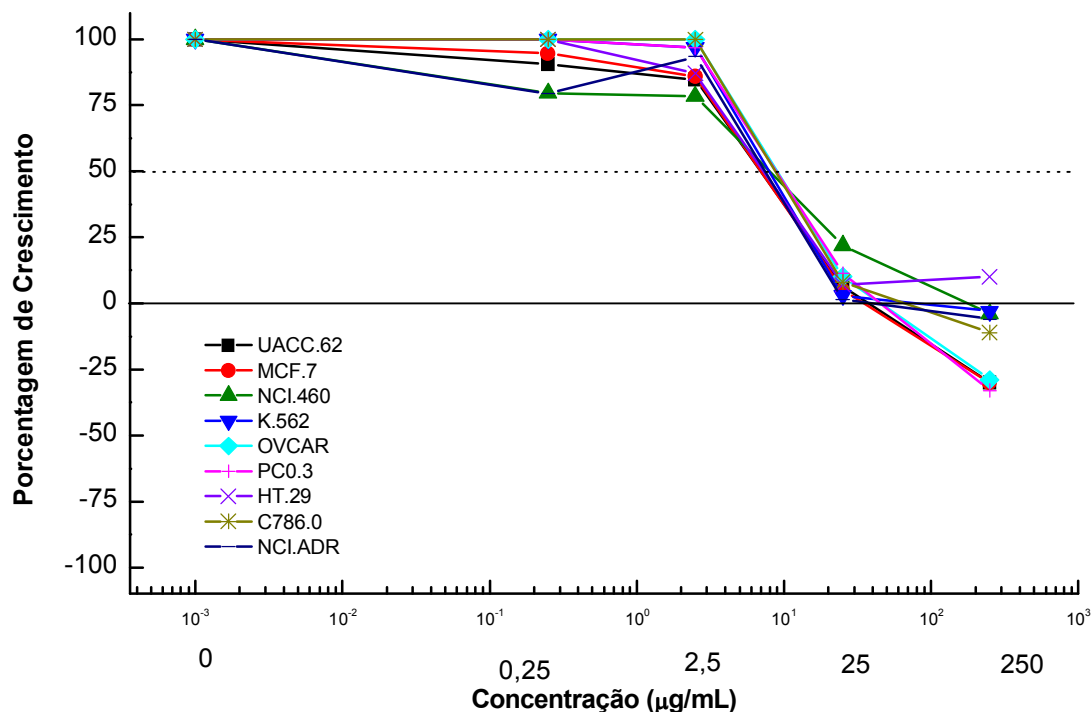


Gráfico 9: Curva concentração-resposta da fração F5 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.9. Atividade antiproliferativa da Fração F6

O gráfico 10 representa a curva-concentração-resposta da fração F6 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F6 produziu inibição de crescimento e morte celular para todas as linhagens e boa correlação entre concentração e efeito.

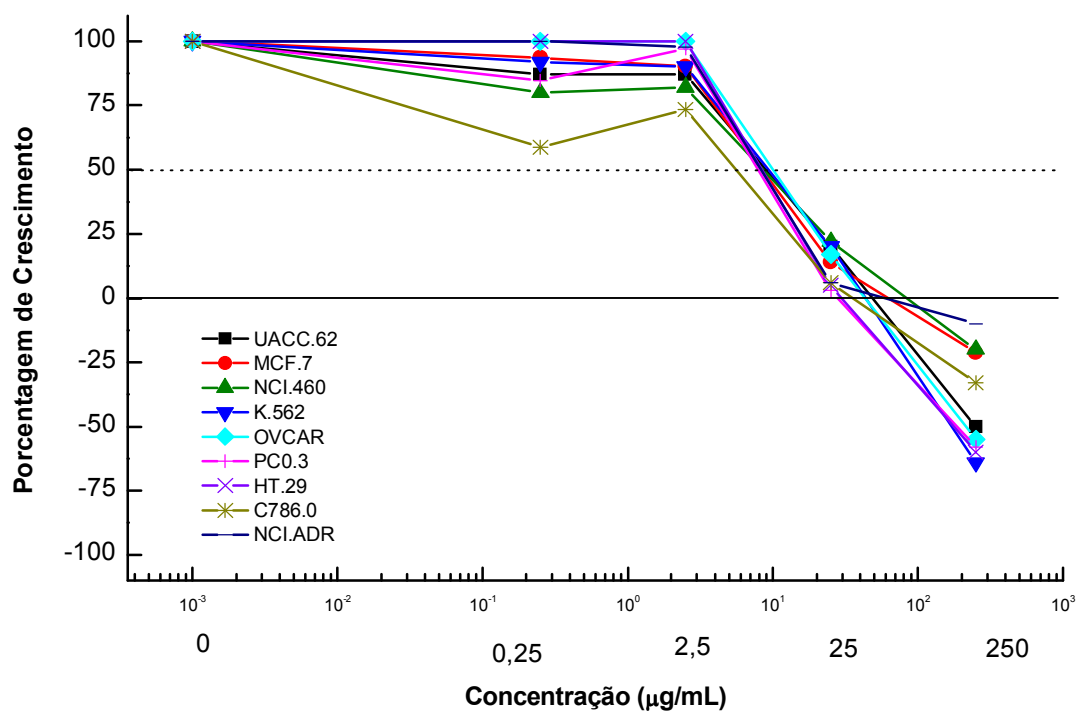


Gráfico 10: Curva concentração-resposta da fração F6 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.10. Atividade antiproliferativa da Fração F7

O gráfico 11 representa a curva-concentração-resposta da fração F7 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a F7 apresentou inibição de crescimento e morte celular para a maioria das linhagens com boa correlação entre concentração e efeito e elevada potência. Nas linhagens de rim (786) e cólon (HT-29) o efeito predominante foi sobre a inibição de crescimento. Pode-se observar seletividade para as linhagens de mama (MCF-7), próstata (PCO-3), ovário (OVCAR) e ovário resistente (NCI-ADR).

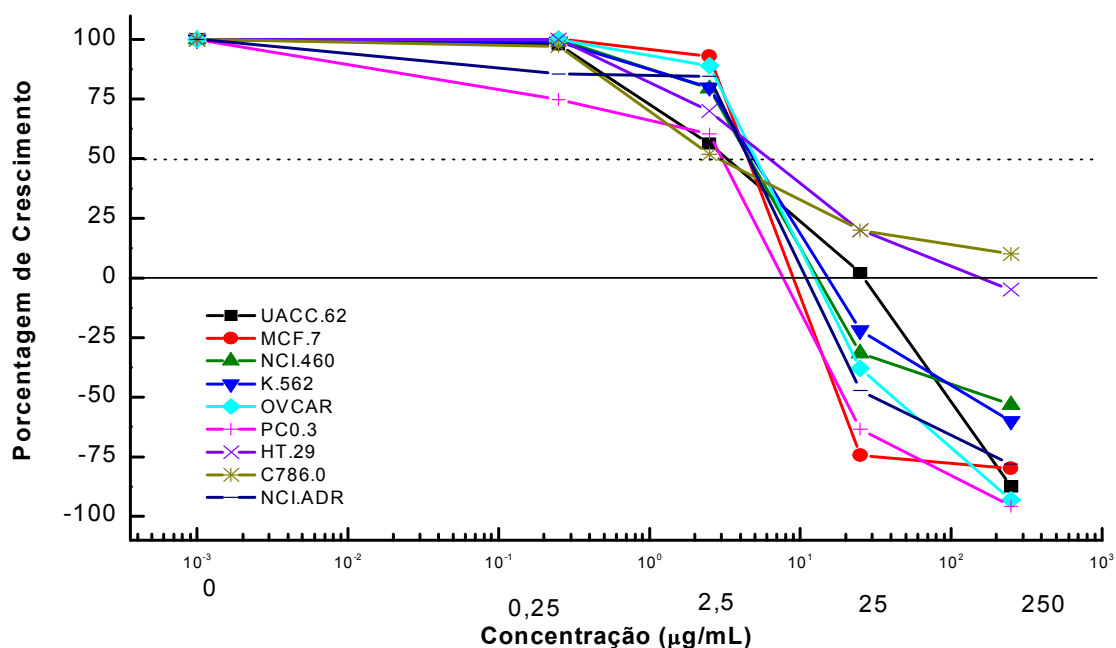


Gráfico 11: Curva concentração-resposta da fração F7 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.11. Atividade antiproliferativa da Fração alfa (F alfa)

O gráfico 12 representa a curva-concentração-resposta da fração alfa obtida da Fr 7 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a Fr alfa produziu inibição do crescimento e morte celular para todas as linhagens.

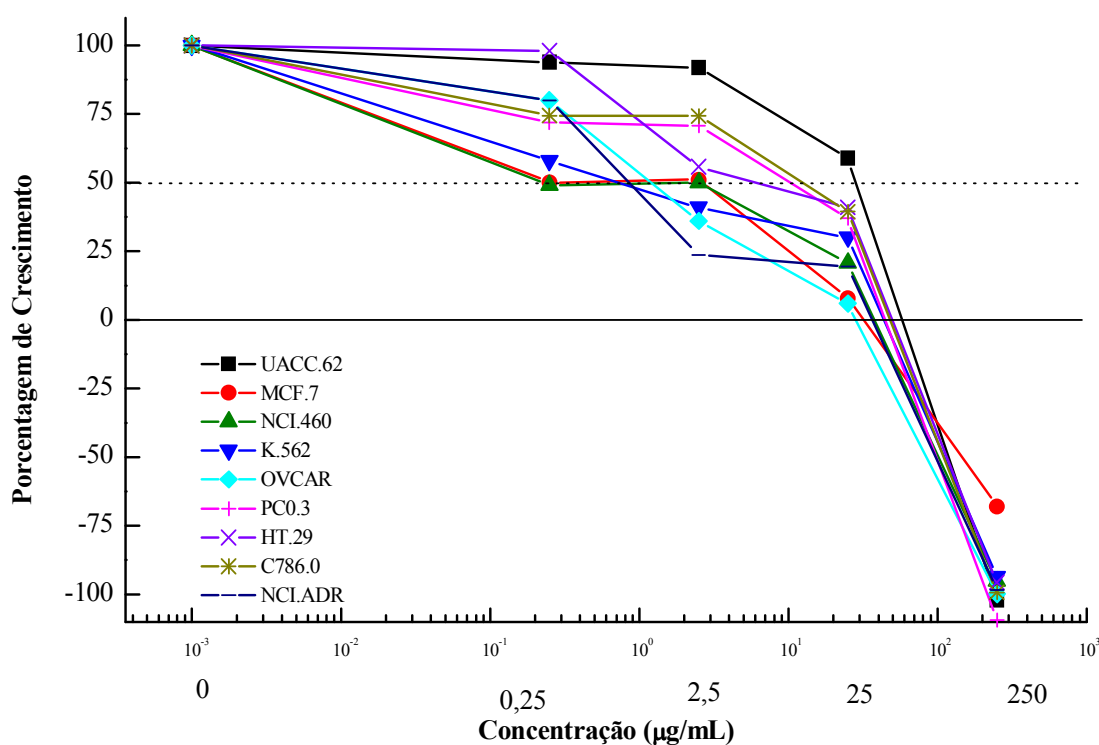


Gráfico 12: Curva concentração-resposta da fração alfa sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.12. Atividade antiproliferativa da Fração Beta (Fr Beta)

O gráfico 13 representa a curva-concentração-resposta da fração Fr Beta sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que a Fr Beta produziu inibição do crescimento e morte celular para seis linhagens, com boa correlação entre concentração e efeito e seletividade. Não produziu efeito sobre ovário resistente (NCI-ADR) e somente atividade citostática sobre cólon (HT-29) e rim (786-0).

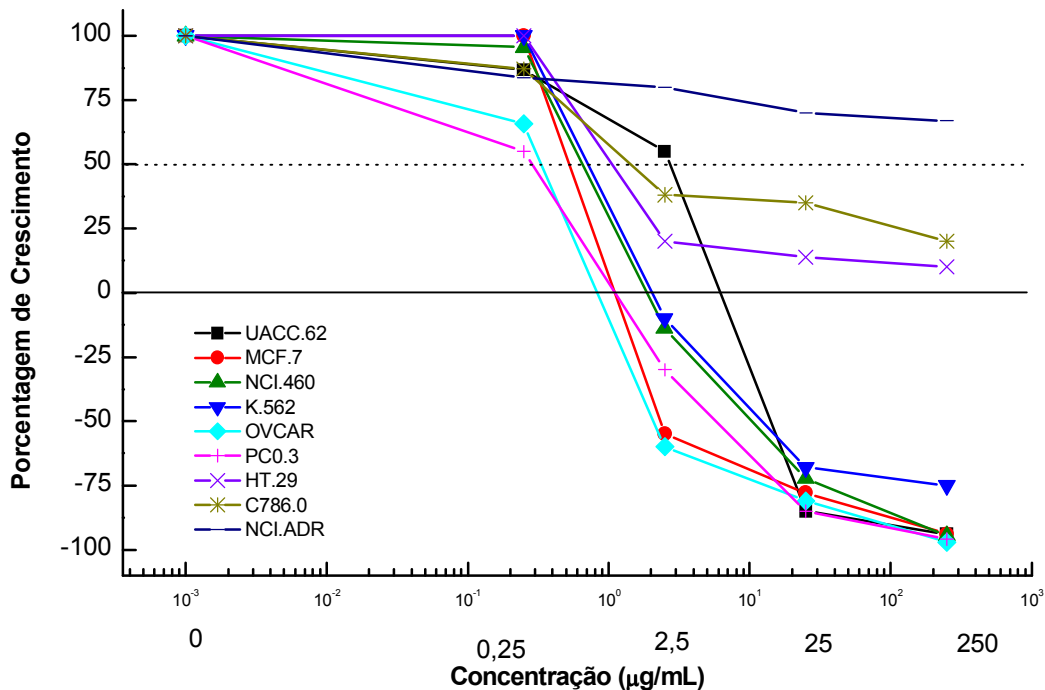


Gráfico 13: Curva concentração-resposta da fração Fr Beta sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

6.2.13. Atividade antiproliferativa da Fração Gama

O gráfico 14 representa a curva-concentração-resposta da fração pura sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração do extrato utilizado. A análise desta curva demonstrou que essa fração produziu inibição de crescimento com elevada seletividade para a linhagem de PCO-3 e morte celular para a maioria das linhagens exceto para 786-0 e HT-29. Sobre a NCI-ADR não houve efeito significativo.

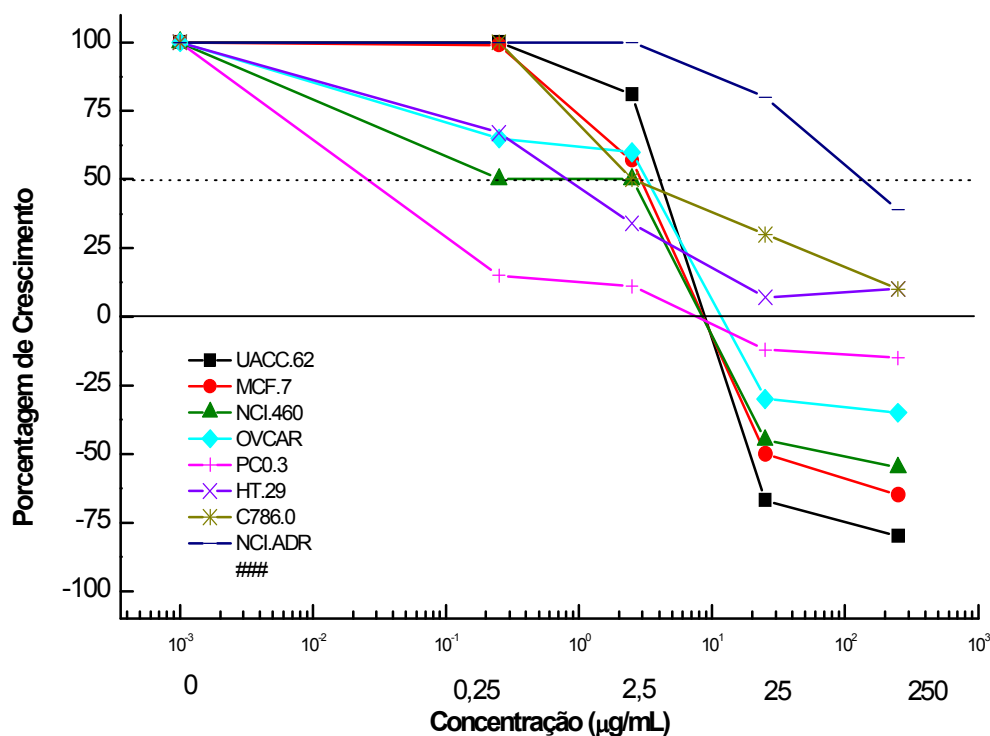


Gráfico 14: Curva-concentração-resposta da Fração Gama sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento e a concentração da fração utilizada.

Tabela 2: TGI (Inibição Total de Crescimento) dos extratos e frações obtidas de *K.coriacea*. Esses valores foram calculados a partir da regressão sigmóide do gráfico gerado pelos valores de absorbância do experimento. Quanto menor o valor, maior a potência do extrato ou fração (Hoelbeck, 2004).

Linhagens Celulares	UACC 62	MCF-7	NCI.ADR	786-0	NCI-460	PC-03	Ovcar-3	HT-29	K562
TGI (µg/mL)									
EBE	>250	204,2	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
EBD	>250	62,7	>250	38,26	71,5	167,7	146,4	154,2	16,16
EBDQ	46,5	32,6	54,4	17,10	28,0	23,8	11,34	4,42	15,3
Fração1	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Fração 2	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Fração 3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Fração 4	>250	>250	>250	>250	>250	248	213,7	>250	222
Fração 5	56,7	55,9	104,2	99,2	158,5	61,4	66,12	192,7	114,7
Fração 6	49,6	80,6	98,1	46,9	93,1	35,4	46,5	35,5	41,8
Fração 7	12,86	3,37	3,09	23,6	33,07	2,64	3,35	15,93	3,11
Fração Alfa	8,20	2,33	14,1	35,1	47,6	55,3	36,0	61,4	29,3
Fração Beta	15,38	1,54	>250	>250	22,21	1,15	0,86	111,68	2,59
Fração Gama	37,5	26,6	>250	>250	29,0	33,7	31,5	>250	25,3
Doxorubicina	3,55	4,7	>250	1,48	91,67	129,66	16,35	0,88	1,45

6.2.14. Teste de Atividade Geral (*screening hipocrático*)

Todos os grupos tratados (0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 g/kg) não apresentaram alteração de peso significativa (média $\pm$ 30 g), sem o aparecimento de óbitos durante os 15 dias de tratamento. Também não houve alterações de pêlo, nem diarreia e nenhuma outra alteração aparente, como depressão, excitação e convulsões. A coordenação motora e o tônus muscular estavam normais.

6.2.15. Atividade “in vivo” - *Hollow Fiber*

Padronização do ensaio in vivo – *Hollow fibe*

O gráfico 15 apresenta os resultados obtidos durante a padronização do modelo, utilizando o implante de células tumorais em fibras semi-permeáveis. Pode-se observar que a doxorrubicina inibiu o crescimento da linhagem MCF-7 nos dois sítios de implante. No entanto, não apresentou atividade sobre a proliferação da linhagem resistente às múltiplas drogas, reproduzindo os resultados dos testes em cultura de células.

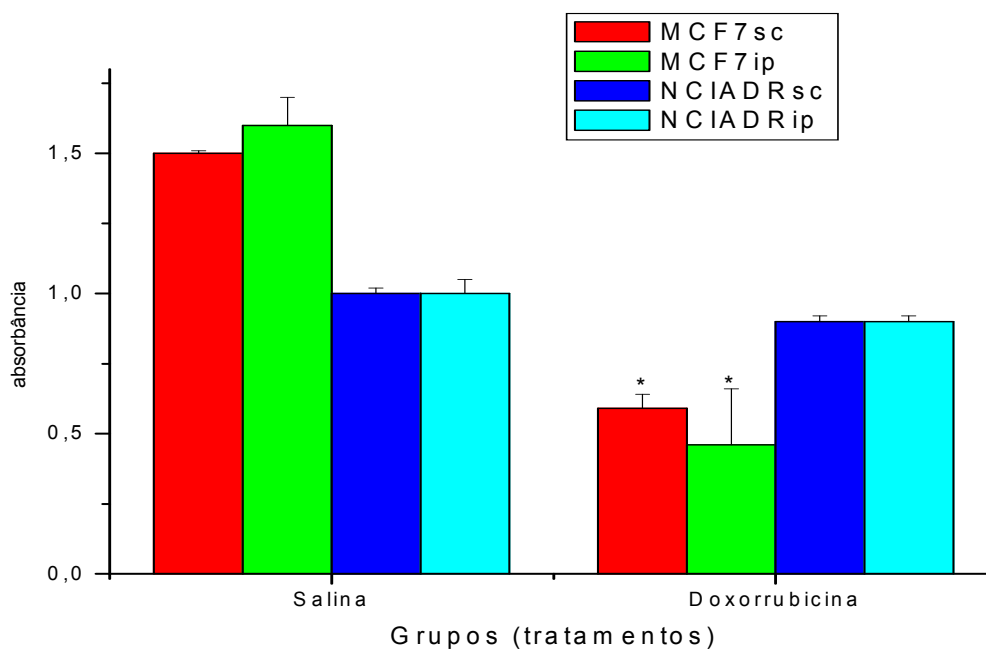


Gráfico 15: Inibição do crescimento celular da doxorrubicina nas linhagens MCF-7 e NCI-ADR na concentração de 10^6 . Tratamentos: salina (10mL/kg), doxorrubicina (6 mg/kg). ANOVA: MCF7 (s.c.): $F(16,2)= 6,1$ * $p<0,01$.

6.2.16. Avaliação da fração 7 e da doxorrubicina s.c

O gráfico 16 demonstra a atividade da Fr7 e da doxorrubicina sobre as linhagens MCF-7, NCI-ADR e OVCAR (10^6 cells/mL), contidas nas fibras semipermeáveis implantadas no compartimento subcutâneo (s.c.), dos camundongos. Comparada com o grupo controle, a Fr7 inibiu o crescimento celular da linhagem de mama (MCF-7) em 44% e a de ovário (OVCAR) em 27%. A doxorrubicina inibiu o crescimento celular da linhagem de mama (MCF-7) em 44% e a de ovário (OVCAR) em 36%

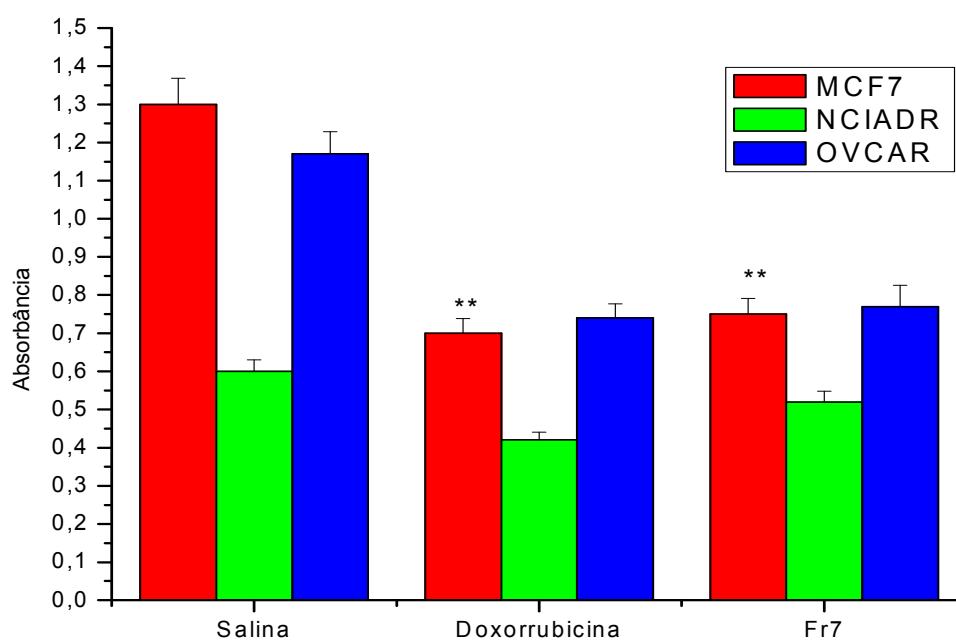


Gráfico 16: Inibição do crescimento celular da Fr7, doxorrubicina e salina sobre as linhagens celulares (s.c). Tratamentos: salina (10mL/kg), doxorrubicina (6 mg/kg) e Fr7(1g/kg). ANOVA: MCF7 (s.c.): $F(16,2) = 8,7$ ** $p < 0,01$.

6.2.17. Avaliação da fração 7 e da doxorrubicina i.p

O gráfico 17 demonstra a atividade da Fr7 e da doxorrubicina sobre as linhagens MCF-7, NCI-ADR e OVCAR (10^6 cells/mL), contidas nas fibras que foram implantadas no compartimento intraperitoneal (i.p.), dos camundongos. Comparada com o grupo controle, a Fr7 inibiu o crescimento celular da linhagem de mama (MCF-7) em 61% e a de ovário (OVCAR) em 62%. A doxorrubicina inibiu o crescimento celular da linhagem de mama (MCF-7) em 40% e a de ovário (OVCAR) em 46%.

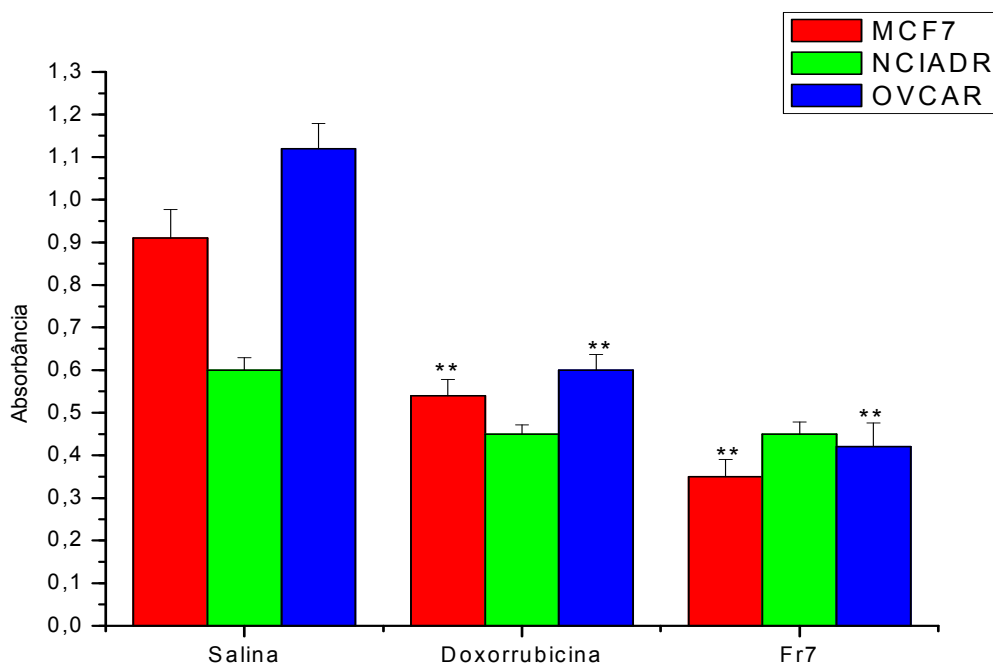


Gráfico 17: Inibição do crescimento celular da Fr7, doxorrubicina e salina sobre as linhagens celulares (i.p). Tratamentos: salina (10mL/kg), doxorrubicina (6 mg/kg) e Fr7 (1g/kg). ANOVA: MCF7(i.p): $F_{(15,2)} = 9,32$; OVCAR(i.p): $F_{(14,2)} = 12,92$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.2.18. Atividade sobre a liberação de Óxido Nítrico da Fração 7

O gráfico 18 representa a influência do tratamento prévio da linhagem MCF-7 com um estimulante da produção de NO, o lipopolissacarídeo (LPS), e um inibidor de NO sintase, o L-NAME, na ação da fração 7, relacionando a porcentagem de crescimento celular e os tratamentos utilizados. A análise do gráfico demonstrou que a atividade citostática da fração 7 foi intensificada com o tratamento prévio com LPS e diminuída com o bloqueio de NO sintase pela ação do L-NAME.

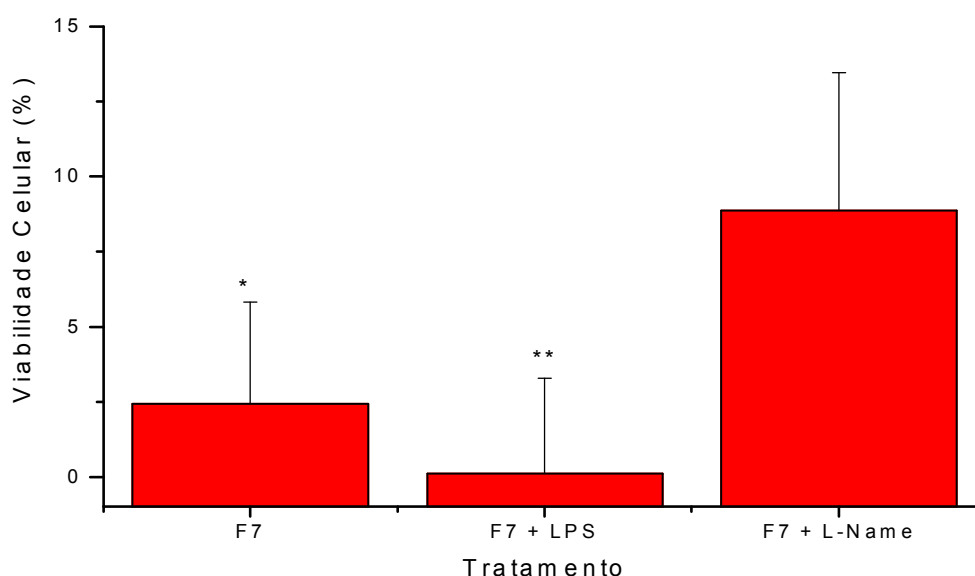


Gráfico 18: Inibição do crescimento celular da Fr7 (250 µg/mL) com LPS e Fr7 com o inibidor de óxido nítrico sintase L-NAME (6mM) sobre a linhagem MCF-7. (ANOVA: $F = 8,6$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$)

6.2.19. Avaliação sobre o de Crescimento de Fibroblastos Humanos:

Como já discutido na introdução, a fim de avaliar se a FR7 poderia também estimular ou inibir o crescimento de fibroblastos, realizou-se experimento onde as células foram expostas a uma situação de carência de fatores de crescimento (suplementação do meio com apenas 0,3% de soro fetal bovino) e em seguida essas mesmas células foram colocadas na presença das amostras em análise. Nessas condições

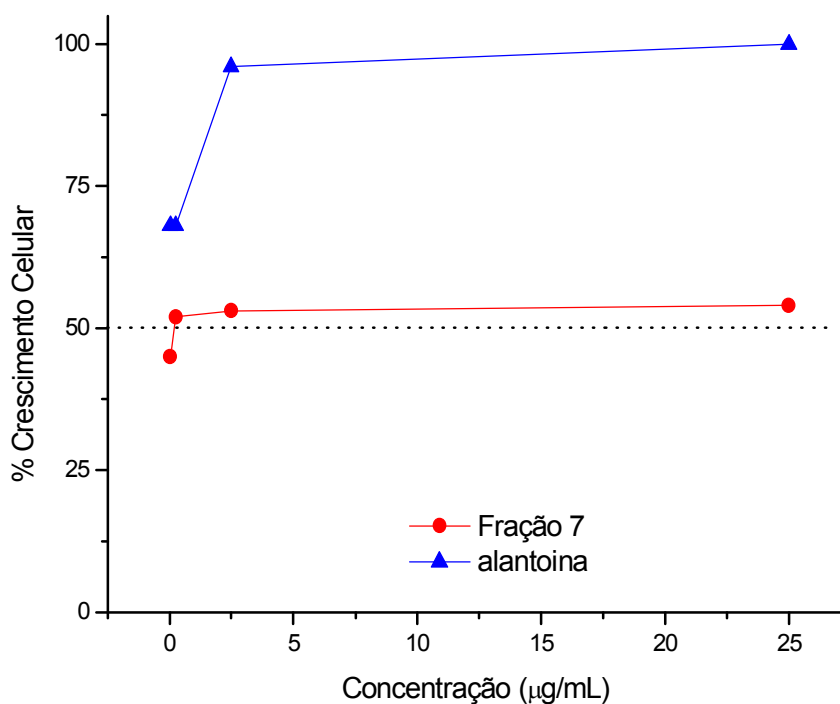


Gráfico 19: Curva-crescimento celular *versus* concentração do ensaio de indução de crescimento em fibroblastos.

Discussão

7. Discussão

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas vem desde as antigas civilizações. Nos últimos anos, a população de muitos países tem mostrado grande interesse na busca da medicina alternativa ou em complementar a medicina tradicional (Yee e col., 2005). Muitas espécies de plantas são uma importante fonte de novas drogas utilizadas no tratamento de doenças de difícil cura, como o câncer (Sarcoman, 2008).

O Brasil possui grande diversidade de espécies vegetais. O Cerrado é uma região típica brasileira ocupando 25% do território nacional, sendo encontrado nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste e Sul do país (Cortez e col., 1997). O potencial para descoberta de novas drogas a partir de extratos vegetais deste bioma motivou o estudo da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Clusiaceae), conhecida popularmente como “Pau-Santo” (Alves e col., 2000), seus extratos apresentaram atividade antiproliferativa significativa em testes preliminares e por isso foi selecionada para este projeto (Cortez e col., 1997).

Para preparação dos extratos brutos obtidos de planta fresca, o material vegetal (folhas e caule), foi moído com gelo seco com a finalidade de evitar a perda de substâncias termolábeis. Posteriormente foi feita a extração com diclometano, resultando no EBD (extrato bruto diclometânico). O resíduo vegetal deste processo foi retomado e esgotado com etanol 95%, fornecendo o EBE (extrato bruto etanólico). O EBD é rico em compostos de baixa e média polaridade e o etanólico de média e elevada polaridade. O EBD e o EBE foram avaliados no teste da atividade antiproliferativa “*in vitro*” utilizando linhagens tumorais humanas. A análise dos resultados demonstrou que o EBD apresentou melhor atividade antiproliferativa do que o EBE, produzindo inibição de crescimento e morte celular com seletividade para leucemia. Portanto, o EBD foi escolhido para dar continuidade a este estudo. Uma segunda parte do material vegetal foi seca em estufa, com a finalidade de impedir a hidrólise e bloquear o crescimento de microorganismos, que poderiam alterar as substâncias químicas presentes.

Para preparação do extrato bruto diclometânico obtido a quente, o material vegetal seco de *Kielmeyera coriacea* foi extraído com diclorometano, através de aquecimento em balão de vidro acoplado a um condensador de refluxo (aparelho soxhlet). Obteve-se assim o extrato bruto diclometânico quente (EBDQ). Este procedimento teve como objetivo a avaliação da estabilidade térmica dos princípios ativos do EBD. No teste de atividade em cultura de células tumorais humanas o EBDQ apresentou resultados semelhantes aos do EBD, com seletividade para cólon, ovário, rim e leucemia. Além dos resultados em cultura o rendimento desse processo foi maior e por isso, selecionado para o prosseguimento do trabalho de isolamento e identificação dos princípios ativos.

A identificação de substâncias ativas presentes nas plantas, bem como a determinação do mecanismo de ação, constituem no principal desafio para química farmacêutica e para a farmacologia, pois as espécies vegetais contêm inúmeros constituintes que nos extratos podem apresentar efeitos sinérgicos contribuindo com a mesma atividade, ou ainda efeitos antagônicos. Por isso, é importante o fracionamento do extrato bruto, levando ao isolamento de compostos que podem possuir maior atividade que o extrato bruto (Maciel e col., 2002; Houghton e col., 2007).

O EBDQ foi fracionado por meio de técnicas cromatográficas, dando origem a sete frações: de F1 à F7. Estas frações foram submetidas ao teste de atividade antiproliferativa “*in vitro*” e foi constatado que a fração F7 apresentou melhor atividade antiproliferativa. Esta fração apresentou inibição de crescimento e morte celular para a maioria das linhagens com boa correlação entre concentração e efeito e elevada potência e seletividade para mama, próstata, ovário e ovário resistente. A seletividade para linhagens que sofrem influência de hormônios sexuais foi a principal característica dessa fração.

A pesquisa de compostos com atividade anti-câncer descobertos através da triagem “*in vitro*”, depende da comprovação da eficácia “*in vivo*” em um ou mais modelos, pois dificuldades de absorção, distribuição e metabolização rápida podem inibir a atividade (Houghton, 2007). Esses modelos (*in vivo*) necessitam de uma quantidade considerável

de materiais, animais de laboratório, amostras teste, além de tempo e custos para determinar se uma amostra teria atividade antitumoral (Hassan e col., 2001). No entanto, desde 1995 o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos adotou uma metodologia utilizando fibras semi-permeáveis (Hollow Fiber) contendo células tumorais humanas que são introduzidas em camundongos imunodeficientes. Desde então inúmeros compostos têm sido selecionados com atividade antitumoral de acordo com esta metodologia (Suggitt e Bibby, 2005). Devido a sua praticidade e resultados promissores conseguidos, essa metodologia foi desenvolvida pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA. A Fração 7 foi escolhida para avaliação neste experimento, por ter apresentado atividade antiproliferativa significativa e bom rendimento.

O ensaio de Hollow Fiber (HF) não é utilizado em substituição ao modelo em que a massa tumoral é introduzida diretamente nos animais (modelo xenográfico), pois as células tumorais no ensaio HF, não interagem com os tecidos do hospedeiro provocando interações complexas e metástases. No entanto, é uma promissora ferramenta para avaliar a capacidade das células tumorais crescerem em dois compartimentos fisiológicos distintos, demonstrando a facilidade de agentes anticâncer alcançarem as células dentro das fibras produzindo atividade citocida e/ou citostática (Hollingshead e col., 1995; Decker e col., 2004). Além de ser um meio de investigar as propriedades farmacodinâmicas em animais cumpre plenamente com os princípios de “redução”, “refinamento” e “substituição” na pesquisa utilizando animais de laboratório, selecionando novas moléculas para posteriores testes pré-clínicos (Suggitt e col., 2006). Vários modelos xenográficos utilizando tumores humanos tem sido descritos nos últimos anos. Embora estes modelos tenham sido importantes no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, eles são acompanhados por limitações como alto custo (grande números de animais), tempo para completar o ensaio, além de necessitar de substâncias puras em quantidades adequadas para serem testadas em um grande número de animais. O ensaio do Hollow Fiber facilita esta triagem, pois além de ser rápido e sensível é aplicável em uma variedade de tipos de células (Hollingshead e col., 1995).

O protocolo do NCI-EUA envolve o uso de camundongos nude (imunodeficiente) nestes experimentos. Mas, a implantação de fibras tem sido demonstrada tanto em camundongos imunodeficientes, como em imunocompetentes, sem causar destruição imunológica pelo hospedeiro ou impedir o crescimento de células tumorais (Chu e col., 1998; Jonsson e col., 2000; Jonsson e col., 2001; Suggitt e col., 2006). Estes dados confirmam que várias linhagens de camundongos podem ser utilizadas no ensaio HF, com vantagens econômicas. Por isso, neste trabalho foram utilizados camundongos Balb/c imunocompetentes. Em estudos anteriores, Suggitt e colaboradores (2006), compararam o crescimento de células tumorais (HT-29) em fibras (HF) em animais imunocompetentes (NMRI mice) com animais imunodeficientes (NCR/nu). Chegaram à conclusão que o crescimento das células tumorais nas duas situações foi equivalente (Suggitt e col., 2006); Do mesmo modo, Jonsson e colaboradores (2000) desenvolveram o mesmo modelo animal (Hollow Fiber) com ratos imunocompetentes (Sprague Dawley Rat) para estudos farmacocinéticos e de toxicidade hematológica. Nesse modelo a ciclofosfamida apresentou atividade antiproliferativa significativa para a linhagem MCF-7 (mama), comprovando que este tipo de animal não altera os resultados quando comparado aos imunodeficientes (Jonsson e col., 2000). No ano seguinte este mesmo pesquisador avaliou atividade do CHS 828 - uma droga que pertence quimicamente à família das cianoguanidinas - em leucemia e câncer ovário, no modelo de HF utilizando ratos imunocompetentes (Sprague Dawley Rat), também obtendo resultados satisfatórios (Jonsson e col., 2001).

Depois dos testes de toxicidade aguda com a Fração 7 o estudo utilizando fibras semipermeáveis realizado. A atividade anti-câncer foi determinada nas linhagens mama (MCF-7), ovário (OVCAR-03) e ovário resistente (NCI-ADR/RES) contidas nas fibras. A linhagem NCI-ADR/RES era conhecida como uma linhagem de tumor de mama resistente a múltiplos fármacos, no entanto, estudos genéticos recentes (Liscovitch e Ravid, 2007) descobriram que trata-se de uma linhagem de ovário (OVCAR-8) que passou a expressar o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos. Isto provavelmente aconteceu devido a contaminação cruzada, em laboratório, da linhagem MCF-7 com células de OVCAR-8. A OVCAR-8 é derivada de pacientes com câncer em tratamento com quimioterapia, e provavelmente devido à mutação no gene p53 são mais resistentes a doxorrubicina". (Shoemaker, 2006; Liscovitch e Ravid, 2007).

Esses linhagens foram selecionadas de acordo com a seletividade apresentada pela fração 7 em cultura de células tumorais. Assim, o tratamento com a fração 7, reduziu a densidade celular da linhagem MCF-7 em 61% quando as fibras foram implantadas no abdômem (i.p), enquanto que a doxorrubicina, a droga padrão, mostrou redução de 44%. Nas fibras subcutâneas, a Fração 7 mostrou redução de 44%, mesmo valor obtido pela doxorrubicina. No câncer de ovário, tanto a Fração 7 quanto a doxorrubicina mostraram inibição significativa apenas nas fibras intraperitoneais. Para a linhagem NCI-ADR, tanto a Fração 7 quanto a doxorrubicina, não apresentaram efeito significativo. No entanto essa linhagem foi a que apresentou o menor crescimento no interior das fibras, quando comparada com as demais. Os resultados obtidos *in vitro* foram reproduzidos *in vivo* sugerindo que os princípios ativos têm condições de alcançar a circulação e chegar em diferentes locais do organismo. Com isso, a identificação dos princípios ativos responsáveis por essa atividade tomou-se fundamental. Desse modo, a fração 7 foi submetida a diversos procedimentos cromatográficos, originando três frações que foram biomonitoradas pelo teste de citotoxicidade.

Do fracionamento da Fração 7 foram obtidas as frações: Fr Alfa, Fr Beta, Fr Gama. A análise dos resultados demonstrou que a Fr Beta produziu inibição do crescimento e morte celular para a maioria das linhagens, com boa correlação entre concentração e efeito com seletividade para ovário, mama e próstata. Embora não houve efeito sobre a linhagem de ovário resistente o padrão de seletividade para as linhagens que sofrem influências de esteróides sexuais foi mantida. A comparação dos valores de TGI (tabela 2) demonstra também que substância da Fração 7 que produziu morte celular da linhagem de ovário resistente, muito provavelmente ficou na fração alfa que produziu morte celular dessa linhagem.

A identificação dos constituintes químicos teve importância fundamental para o trabalho. Como o rendimento da fração beta foi muito baixo um novo processo de extração e purificação utilizando quantidade elevada de material vegetal foi realizado. Para obtenção de 100 mg dessa fração foi consumido muito material e muito tempo. A cromatografia em camada delgada dessa fração apresentou mancha única sugerindo a

presença de um único composto. Dessa forma foi encaminhada ao Instituto de Química da UNICAMP para determinação de sua estrutura química. A análise por espectro de massas, RMN¹H e ¹³C porém, revelou a presença de mais do que uma substância. A comparação dos espectros de RMN¹H, RMN¹³C com dados de modelos de terpenos da literatura (Mahato e col., 1994, 1997) sugeriu que a fração β é uma mistura de triterpenos pentacíclicos de esqueleto oleânico e ursólico.

Considerando que os esteróides podem ser considerados derivados dos triterpenos, a seletividade dessa fração para as linhagens de mama, ovário e próstata reforça a hipótese dessas substâncias serem as responsáveis pelos efeitos observados.

Os terpenos formam uma classe de compostos onde já foram identificados aproximadamente 30.000 compostos. São divididos de acordo com o número de moléculas de isopreno (C₅) em monoterpenos (10), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (20), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (Dzubak e col., 2006). Na última década, o interesse na pesquisa de triterpenos teve um grande incentivo em virtude dos diversos efeitos farmacológicos observados. Existem pelo menos cerca de 4000 triterpenóides identificados na natureza como: triterpenos, triterpenos glicosídeos (saponinas), fitoesteróis e seus precursores (Connolly e col., 2002; Dzubak e col., 2006).

O Triterpenos possuem efeitos anti-inflamatórios, hepatoprotetor, analgésico, antimicótico, antiviral e também anti-cancerígenos (Chen e col., 2005). Os triterpenos com estrutura pentacíclica são aqueles que possuem maior capacidade anti-cancerígenas, como os ácidos ursólicos e oleânicos. Ambos são hepatoprotetores, isto é, são eficazes na proteção contra lesões hepáticas induzidas quimicamente em animais de laboratório (Liu J, 2005). Na China, o ácido oleanólico, é comumente utilizado no tratamento de hepatite (Chen e col., 2005). Ambos os ácidos também possuem atividade antiinflamatória (Lie J, 1995), sendo que este mecanismo de ação tem sido atribuído à inibição da liberação de histamina induzido pelo composto 48/80 (Tsuruga e col, 1991) e inibição da atividade das enzimas lipoxigenase e ciclooxygenase, reduzindo os fatores inflamatórios produzidos durante a cascata do ácido araquidônico.(Simon e col, 1992).

Os Triterpenóides Ursólicos são encontrados em diversas plantas, como por exemplo, o Alecrim (*Rosmarinus officinalis*); Lavanda (*Lavandula angustifolia*), hortelã (*Menta piperita*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), entre muitas outras. Os Triterpenóides oleanólico é também um triterpenóide pentacíclico, sendo um isômero do ursólico. Os dois são obtidos em igual quantidade, porém o oleânico exibe uma atividade inferior ao seu isômero. Mesmo assim, possui uma maior capacidade anti-cancerígena que a maioria dos triterpenóides. Ácido oleanólico, por exemplo, é encontrado em elevada concentração na raiz de Ginseng (*Panax Ginseng*) (Lie J, 1995; Patocka, 2003). Estudos em ratos mostraram a diminuição significativa da ocorrência de tumores de pele (Huang e col, 1994; Oguro e col., 1998), sendo que no Japão já são utilizados no tratamento de câncer de pele. (Muto e col., 1990).

Ambos triterpenóides agem em várias fases de desenvolvimento tumoral, inibindo a iniciação e promoção tumoral, induzindo a diferenciação celular e a apoptose. (Oguro e col., 1998). Induzem diferenciação celular em linhagem de teratocarcinoma (Lee e col., 1994) e possuem atividade antiangiogênica (Sohn e col., 1995; Ovesna e col., 2004). Os derivados do ácido oleanólico são igualmente eficazes contra leucemia mielóide aguda por induzir apoptose das células tumorais (Konopleva e col., 2004). Também induzem apoptose em células tumorais de pulmão e em células leucêmicas (Zou e col., 2004). Outro mecanismo estudado é a supressão da expressão de determinados oncogenes como c-jun e c-FOS (Rhew e col., 1993); Em teste “*in vitro*” apresenta-se como inibidor da Topoisomerase I e II humanas (Dzubak e col., 2006).

Depois desta etapa, o trabalho seguiu com a demonstração do provável mecanismo de ação. Foi avaliada a interferência do óxido nítrico na atividade antitumoral, pois estudos anteriores atestam que a massa tumoral apresenta uma elevada produção de óxido nítrico sendo que este possui atividade antitumoral dependente da concentração, induzindo a apoptose (Floyd e col, 2007).

Há tempos, foi descoberta que a ação vasodilatadora produzida por vários agentes farmacológicos é mediada por uma substância produzida nas células endoteliais, denominada até pouco tempo de EDRF (Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio).

Ignarro (1987) descobriu que o até então denominado EDRF era na verdade uma molécula já conhecida: o Óxido Nítrico (NO). A partir daí, essa molécula de potente ação vasodilatadora encabeçou a lista das substâncias mais pesquisadas pelos cientistas (Ignarro, 1987; Wink e col., 1998).

O óxido nítrico é uma importante molécula sinalizadora em numerosos processos fisiológicos e em condições patológicas, sendo produzida quando a enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) cataliza a conversão de L-arginina à L-citrulina. Existem três isoformas de NOS, sendo duas constitutivamente expressas pelo tecido endotelial e neuronal, responsáveis pela produção basal de NO e dependentes de Cálcio. Já a terceira isoforma, denominada NOS induzível, é cálcio-independente, não é expressa na maioria dos tecidos sob condições normais, mas pode se estimulada por lipopolissacarídeos e várias citocinas (Thomsen e col., 1998).

Diversos estudos sugerem que o NO apresenta atividade antitumoral mas também propriedades pró-tumorais, na dependência da concentração e do tempo de exposição, assim como pelo tipo de tecido. Baixas concentrações de NO podem estimular o crescimento celular e proteger vários tipos celulares do processo apoptótico, enquanto que concentrações elevadas podem inibir o crescimento celular e induzir a apoptose (Floyd e col, 2007). Os efeitos pró-apoptóticos parecem estar mais relacionados às condições fisiopatológicas, quando grandes quantidades de NO são produzidas por síntese induzida de NO (Simon e col., 2000).

O NO pode afetar a expressão e a atividade de proteínas críticas no ciclo celular, pois a exposição das células aos doadores de NO pode resultar em supra-regulação do gene supressor de tumor, o p53, possivelmente em resposta ao dano do DNA mediado pelo NO (Pedroso e col., 2000).

Portanto, visando correlacionar se a atividade anticâncer seria por esta via, isto é, se a atividade citotóxica estaria relacionada ao aumento da produção de óxido nítrico, a fração 7 foi avaliada em células de mama (MCF-7), tratadas com a Fração 7 + L-NAME, (L-NAME é um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase, portanto bloqueia a produção de óxido nítrico) e a Fração 7 + LPS (Lipopolissacarídeos de *E. coli*), que

estimula a produção de óxido nítrico. Os resultados demonstraram que a atividade foi reduzida na presença de bloqueio da síntese de NO e estimulada pelo LPS, sugerindo a participação do óxido nítrico no mecanismo de ação dos princípios ativos da fração 7.

Segundo You e colaboradores (2001), o ácido ursólico apresenta atividade anti-tumoral por estimular a liberação de óxido nítrico, induzindo dano ao DNA da célula levando esta à apoptose, corroborando com nossos resultados (You e col., 2001). Outro composto semelhante é o agente antineoplásico paclitaxel (Taxol), diterpeno originariamente extraído das cascas e folhas do *Taxus brevifolia*. Apresenta atividade contra câncer de mama e câncer de ovário, por impedir a despolimerização de microtúbulos e a progressão do ciclo-celular com conseqüente morte celular e inibição da progressão tumoral. No entanto, estudos recentes demonstraram que o paclitaxel estimula “*in vitro*” resposta similar ao LPS, induzindo a liberação de óxido nítrico, mediando a citotoxicidade de células tumorais (Kirikae e col., 1995; Mullins e col., 1998)

O princípio da seletividade (ação da droga específica para célula neoplásica) na maioria dos quimioterápicos, não é tão desejável quanto se gostaria, pois há muitos efeitos colaterais para o ser humano. Muitos dos efeitos colaterais resultam dos danos causados pela quimioterapia sobre as “células normais” (não-cancerígenas), uma vez que o tratamento afeta o processo de crescimento e de multiplicação, e mais especificamente das células de multiplicação rápida, como exemplos pode-se citar o revestimento do sistema digestivo: boca, esôfago, estômago e intestinos – com o aparecimento de mucosite, dor de garganta, diarreia além da queda de cabelo (Almeida e col.,2005).

A Fração 7 apresentou atividade antiproliferativa “*in vitro*” e “*in vivo*” em linhagens celulares de câncer. Com a finalidade de expandir os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos desta fração em células não-cancerígenas, foi realizado o ensaio (*in vitro*) em células de fibroblastos (“normais”) (Jorge e col., 2008). Os fibroblastos estão envolvidos em processo de cicatrização, que envolve processos como inflamação,

proliferação celular e formação de colágeno. O ensaio de indução de crescimento de fibroblastos apontou que a fração 7 embora tenha atividade antiproliferativa para linhagens celulares cancerígenas, possui baixa toxicidade para células “normais”. Nas mesmas condições a alantoína, cicatrizante, estimulou o crescimento de fibroblastos em até 90%. Estes resultados estimulam a continuidade dos estudos de atividade anticâncer e de toxicidade dos princípios ativos dessa espécie vegetal.

Conclusões

8. Conclusões

- ✓ O Extrato Bruto Diclorometânico obtido à quente (EBDQ) de *Kielmeyera coriacea* apresentou (*in vitro*) atividade antiproliferativa significativa em linhagens celulares tumorais humanas;
- ✓ Os resultados obtidos *in vitro* foram reproduzidos *in vivo* sugerindo que os princípios ativos têm condições de alcançar a circulação e chegar em diferentes locais do organismo.
- ✓ A fração Beta, é uma mistura de triterpenos pentacíclicos de esqueleto oleânico e ursólico;
- ✓ O ensaio de indução de crescimento de fibroblastos apontou que a fração 7 embora tenha atividade antiproliferativa para linhagens celulares cancerígenas, tem baixa toxicidade para células “normais”.
- ✓ A fração 7 apresentou atividade semelhante ao Lipopolissacarídeos de *E. coli* na linhagem tumoral de mama, levando-nos a sugerir que esta apresenta atividade antitumoral por inibir a produção de óxido nítrico.

Referências
Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

Alberts, B. *et al* . **Biologia Molecular da célula**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed. 2004.

Almeida V.L., Leitão A., Reina L.D.C.B., Montanari C.A., Donnici C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova** 28(1): 118-129,2005.

Alves, T.A.; Silva, A.S.; Brandão, m.; Grandi, T.M.; Smânia, E.; Zani, C.L. Biological. Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 95(3): 367-373, 2000.

Akbulut H., Altuntas F., Akbulut K.G., Ozturk G., Cindoruk M., Unal E., Icli F. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. **Cytokine** 20(4):184-90, 2002.

Baguley B.C., Marsall E.S. In vitro modelling of human tumour bahaviour in drug discover programmes. **Eur J Cancer**, 40 (6), 794-801, 2004.

Ballard-Barbash R, Mctierman A. Is the whole larger than the sun of the parts? The promise of combining physical activity and diet to improve cancer outcomes. **Journal of Clinica Oncology** 25 (17): 2335-2337, 2007.

Black P.C. Dinney C.P.N. Bladder Cancer Angiogenesis and Metastasis – translation from murine model to clinical trial. **Cancer Metastasis Rev** (26) 3-4: 623-634, 2007.

- Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J., Haromy A., Beaulieu C., Thompson R., Lee C.T., Lopaschuk G.D., Puttagunta L., Bonnet S., Harry G., Hashimoto K., Porter C.J., Andrade M.A., Thebaud B., Michelakis E.D. A Mitochondria-K Channel Axis is Suppressed in Cancer and its Normalization promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. **Cancer Cell** 11: 37-51, 2007.
- Broll R., Erdmann H., Duchrow M., Oevermann E., Schwandner O., Markert U., Bruch H.P., Windhovel U. Vascular endothelial growth factor (VEGF)—a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? **Eur J Surg Onco**, ;27(1):37-42, 2001.
- Campbell E.S., Richter W. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. **Acta Pharmacol Toxicol.**; 25(3):345-63, 1967
- Cechinel V.F. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** : 21 (1), 99-105, 1998.
- Chambers A.F., Naumov G.N., Varghese H.J., Nadkarni K.V., MacDonald I.C., Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. **Surg. Oncol. Clinics of North America**, 10: 243-255, 2001.
- Chanock S.J., Hunter D.J. When the smoke clears. **Nature** (452): 537-538, 2008.
- Chen Yajun, Liu Jie, Yang Xiangliang, Zhao Xiaoling, Xu Huibi. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. **Pharmacy and Pharmacology** (57): 259-264, 2005.
- Choi M., Kim S.H., Chung W-Y., Hwang J-K., Park k-k. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in

- experimental mouse lung metastasis model. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 326: 210-217, 2005
- Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**(19): 494-513, 2002.
- Chu M.Y.W., Lipsky M.H., Yee L.K., Epstein J., Whartenby K.A., Freeman S., Chen T.M., Chu E., Forman E.N., Calabresi P. Predictive Sensitivity of Human Cancer Cells in vivo Using Semipermeable Polysulfone Fibers. **Pharmacology** (56) :318-326, 1998.
- Cortez, D.A.G.; Young, M.C.M.; Marston, A., Wolfender, J.L.; Hostettmann, K. Xanthonenes, Triterpenes and biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry** 47(7): 1367-1374, 1997.
- Dancey J.E., Chen H.X. Strategies for Optimizing Combinations of molecularly targeted Anticancer Agents. **Nature Reviews** 5: 649-655, 2006.
- Decker S. The hollow fibre model in cancer drug screening the NCI experience. **European Journal of Cancer** (40) 6: 821 – 826, 2004.
- Degos, L. A new concept: treatment using differentiation of the malignant cell in man: **Bull.Acad.Natl.Med.**, 179, 1689-1700, 1995.
- Denny C., Zacharias M.E., Khon L.K., Foglio M.A., Carvalho J.E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17 (4): 598-603, 2007.
- Dharmarantne H.R., Wijesinghe W.M., Thevanasem V. Antimicrobial activity of xanthonenes from *Calophyllum* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Ethnopharmacol** 66: 339-342, 1999.

- Dryja T.P., Mukai S., Petersen R: Parenteral origin of mutations of the retinoblastoma gene. **Nature**: 339-556, 1989.
- Dzubak P., Hajdich M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M. Sarek J. Pharmacology activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Product Reports** (23): 394-411, 2006.
- Feder LS, Laskin DL Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF, and IL-1 beta following acute endotoxemia **Journal of Leukocyte Biology** 55 4: 507-513, 1994.
- Ferguson P.J, Cheng Y.C. Phenotypic instability of drug sensitivity in a human colon carcinoma cell line. **Cancer Research**, 49, 1148-1153, 1989
- Flor J, Davolos M.R.; Correa M.A. Protetores Solares. **Química Nova** 30 (1): 153-158, 2007.
- Floyd R.A., Kotake Y., Towner R.A., Guo W.X., Nakae D., Konishi Y. Nitric Oxide and Cancer Development. **Journal Toxicol Pathol** 20: 77-92, 2007.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med**. 6 (285): 1182-1186, 1971;
- Folkman F. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Ann Surg** 175: 409-416, 1972.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer** : 48-58, 2002. I
- Goulart Y.C.F, Sela V.R., Obici S., Martins J.V.C., Otobone F., Cortez D.A., Audi E.A. Evaluation of gastric antiulcer activity in a hydroethanolic extract from *kielmeyera coriacea*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (48): 211-216, 2005.

- Groninger E., Boer T.M., Koopmans P., Uges D., Sluiter W., Veerman A., Kamps W., Graaf S. Vincristine pharmacokinetics and response to vincristine monotherapy in an up-front window study of the Dutch Childhood Leukaemia. **European Journal of Cancer**: 41: 98-103, 2005.
- Grunfeld E., Zitzelsberger L., Evans W.K., Cameron R., Hayter C., Berman N., Stern H. Better knowledge translation for effective cancer control: A priority for action. **Cancer Causes and Control**: 15: 503-510, 2004.
- Hamburguer, M.; Hostettmann, K.; Bioactivity in Plants: The link between phitochemistry and medicine. **Phytochemistry**, 30 (12): 3864 – 3874, 1991.
- Hassan S.B., Torre M., Nygren P., Karisson M.O., Larsson R., Jonsson E. A hollow fiber model for in vitro studies of cytotoxic compounds: activity of the cyanoguanidine CHS 828. **Anti-Cancer Drugs** 12; 33-42, 2001.
- Hemminki K. Mutanen P. Genetic Epidemiology of Multistage Carcinogenesis. **Mutation Research** 473: 11-21, 2001.
- Holbeck S.L. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, 40, 785-793, 2004.
- Hollingshead, M.G.; Alley, M.C.; Camalier, R.F.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Malspeis, L.; Grever, M.R. In vivo cultivation of tumor cells in hollow fibers. **Life Sciences**, 57: 131-141, 1995.
- Horiguchi T., Rithner C.D., Croteau R., Williams R.M. Studies on taxol biosynthesis. Preparation of 5-acetoxytaxa-4 (20),11-dien-2, 10-diol derivatives by deoxygenation of a taxadiene tetra-acetate obtained from Japanese yew. **Tetrahedron** (59)2: 267-273, 2003.

- Houghton P.J., Hylands J., Mensah A.Y., Hensel A., Deters A.M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. ***Journal of Ethnopharmacology*** (100)1-2: 100-107, 2005.
- Houghton P.J., Howes M.J., Lee C.C., Steventon G. Uses and Abuses of in Vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an Elephant. ***Journal of Ethnopharmacology*** 110:391- 400, 2007.
- Huang, M.T., Ho, C-T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Lou, Y-R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D. and Conney, A.H. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents camosol and ursohc acid. ***Cancer Research*** 54, 701-708, 1994.
- Hung R.J., Mckay J.D., Gaborieau V., Boffetta P., Hashibe M., Zaridze D., Mukeria A., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Benko V., Foretova L.et. al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subnit genes on 15q25. ***Nature*** (452): 633-637, 2008.
- Ignarro L.J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. ***Proc Natl Acad Sci*** 84(24): 9265-269, 1987.
- Jonsson E., Friberg L.E, Karlsson O., Hassan S.B, Freijs A.,Hansen k., Larsson R. Determination of drug effects on tumour cells, host animal toxicity and drug pharmacokinetics in a hollow-fibre model rats. ***Cancer Chemother Pharmacol***: 46: 493-500,2000.
- Jonsson E., Friberg L.E, Karlsson O., Hassan S.B, Nygren P., Kristensen J., Tholander B., Binderup L., Larsson r. In vivo activity of CHS 828 on hollow-fibre cultures of primary human tumour cells from patients. ***Cancer Letters***: 162: 193-200, 2001.
- Jorge M.P., Madjarof C, Ruiz A.L.T.G., Fernandes A.T., Rodrigues R.A.F., Sousa I.M.O., Foglio M.A., Carvalho J.E. Evaluation of wound healing properties of

- Arrabidaea chica* Verlot. extract. **Journal of Ethopharmacology**: 1-6, 2008.
- Kaur G., Hollingshead M., Holbeck S., Schauer-Vukasinovic V., Camalier R.F., Domling A, Agarwal S. Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product. **Biochem. Journal**, 396: 235-242, 2006.
- Kelland L.R. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development **European Journal of Cancer**: .40(6):827-36, 2004.
- Kirikae F., Kirikae T., Qureshi N., Takayama K., Morrison D.C., Nakano M. CD14 Is not involved in *Rhodobacter sphaeroides* Diphosphoryl Lipid a Inhibition of Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide Induction by Taxol in Murine Macrophages. **Infection and Immunity**: 486-497, 1995.
- Kong G., Lee S.J., Kim H.J., Surh Y-J., Kim N.D. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by 2-(allythio) pyrazine. **Câncer Letters** (144): 1-8, 1999.
- Konopleva, M., Tsao, T., Estrov, Z., Lee, R.M., Wang, R.Y., Jackson, C.E., McQueen, T., Monaco, G., Munsell, M., Belmont, J., Kantarjian, H., Sporn, M.B., Andreeff, M. The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1 9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. **Cancer Research** (64): 7927–7935, 2004.
- Kruh G.D. Introduction to resistance to anticancer agents. **Oncogene** 22: 7262-7264, 2003.
- Lee Ho-Young , Chung Hae-Young , Kim Ki-Heun , Lee Jung-Joon and Kim Kyu-Won. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**: 513-518, 1994.

- Li W., Lam M.S., Birkeland A., Riffel A., Montana L., Sullivan M.E., Post J.M. Cell-based assays for profiling activity and safety properties of cancer drugs. ***Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*** (54): 313-319, 2006.
- Liscovitch M., Ravid D. A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OCAR-8 human ovarian carcinoma cells. ***Cancer Letter*** (245): 350-352, 2007.
- Liu Jie. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. ***Journal of Ethnopharmacology*** (49): 57-68, 1995.
- Liu Jie. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. ***Journal of Ethnopharmacology*** (100): 92-94, 2005.
- Maciel A.A.M., Pinto A.C., Veiga V.F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. ***Química Nova*** 25 (3): 429-438, 2002.
- Maciel A.A.M., Gomes F.E.S., Pinto A.C., Cólus I.M.S., Magalhães N.S.S., Grynberg N.F., Echevarria A. Aspectos sobre Produtos Naturais na descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos. ***Revista Fitos*** (3)1: 38-58, 2007.
- Mahato S.B., Kundu A.P. 13 C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. ***Phytochemistry***, 1994.
- Mahato S.B., Sen S. Advances in triterpenoid research, 1990–1994. ***Phytochemistry*** (44) 7: 1185-1236, 1997.
- Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. ***Nature Reviews*** (2): 143-148, 2002.
- Martins J.V.C., Jacques O.F., Sela V.R., Obici S.O., Trombelli M.A., Cortez D.A.G. e Audi E.A. Pharmacological activity of lyophilized hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems in rats. ***Acta Scientiarum*** (26): 365-368, 2004.

- Mensah A.Y, Sampson J., Houghton P.J., Hylands P.J. Westbrook J. Dunn M., Hughes M.A., Cherry G.W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing ***Journal of Ethnopharmacology*** 77 (2-3): 219-226, 2001.
- Ministério da Saúde. INCA. Instituto Nacional de Cancer, 2008. Disponível na Internet: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> consultado em 02/2008.
- Mullins D.W., Burger C..J, Elgert K.D. Tumor growth modulates macrophage nitric oxide production following paclitaxel administration. ***International Journal of Immunopharmacology*** (20): 537-551, 1998.
- Muto Y., Ninomiya, M. and Fujiki, H. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. ***Japanese Journal of Clinical Oncology*** 20, 2 19-224, 1990.
- Newman D.J., Cragg G.M. Plants as a source of anti-cancer agents. ***Journal of Ethnopharmacology*** (100) 1-2: 72-79, 2005.
- Newman D.J, Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. ***Journal of Natural Products*** 70 (3):461-477, 2007.
- Oguro, T., Liu, J., Klaassen, C.D., Yoshida, T., Inhibitory effect of oleanolic acid on 12 O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. ***Toxicological Sciences*** 45, 88–93, 1998.
- Oliveira R.B., Alves R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. ***Química Nova***, 25 (6), 976-984, 2002
- Ovesna, Z., Vachalkova, A., Horvathova, K., Tothova, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. ***Minireview Neoplasma*** 51, 327–333, 2004.

- Patocka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. ***Journal of Applied Biomedicine*** (1): 7-12, 2003.
- Pedroso M.C., Magalhães J.R., Durzan D. Nitric Oxide induces Cell Death in Taxus Cells. ***Plant Science*** 157: 173-180, 2000.
- Peeters C.F., de Geus L.F., Westphal J.R., de Waal R.M., Ruiter D.J., Wobbes T., Oyen W.J., Ruers T.J. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. ***Surgery***, 137(2):246-9, 2005.
- Peterson J.K., Houghton P.J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. ***European Journal of Cancer*** 40, 837-844, 2004.
- Peto J. Houlston R.S. Genetics and the Common Cancers. ***European Journal of Cancer*** 37: 88-96, 2001.
- Pinheiro L., Nakamura C.V., Filho B.P.D., Ferreira A.G., Young M.C.M., Cortez D.A.G. Antibacterial xantones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz***, vol.98 (4), 2003.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. ***Toxicon*** 39: 603-613, 2001.
- Rhew,T.H., Park, .SM., Park, K.Y., Chung, H.Y., Hah, J.C. and Lee, C.K. Effects of ursolic acid on oncogene expression detected by in situ hybridization in mice. ***Chemical Abstracts*** 119, 1993.
- Rubinstein L.V.^{*}, Shoemaker R.H., Paull K.D., Simon R.M., Tosini S., Skehan P., Scudiero D.A. Monks A., Boyd M.R. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay

- Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. ***Journal of the National Cancer Institute*** (82) 13: 1113-1117, 1990.
- Sarcoman J.L., Monteiro K.M. Possenti A., Figueira G.M., Foglio M.A. Carvalho J.E. Citotoxicity and Antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research*** 41: 411-415, 2008.
- Sausville A., Newell D.R. Preclinical models in cancer drug discovery and development ***European Journal of Cancer*** (40) 6: 783-784, 2004.
- Sausville E.A., Burger A.M. Contributions of Human Tumor Xenografts to Anticancer Drug Development. ***Cancer Research*** 66 (7), 200
- Schwartzmann G., Winograd B., Pinedo H.M. The main steps in the development of anticancer agents. ***Radiother Oncol***, 12, 301-313, 1988.
- Sell A.M., Costa C.P. Effects of Plants Lectins on in vitro Fibroblast Proliferation. ***Brazilian Archives of Biology and Technology***. (46): 349-354, 2003.
- Semenza G.L, Hypoxia and Cancer. ***Câncer Metastasis Rev*** 26: 223-224, 2007.
- Sezer O., Jakob C., Eucker J., Niemoller K., Gatz F., Wernecke K., Possinger K. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. ***Eur J Haematol*** , 66: 83-88, 2001.
- Shechors K., Evan G. Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer? ***Cancer Research*** 67 (15): 7059-7061, 2007.
- Shoemaker R.H. The NCI60 Human Tumour Cell Line Anticancer Drug Screen. ***Natural Review*** 6 : 813-823, 2006.

- Simon, A., Najid, A., Chulia, A.J., Delage, C. and Rigaud, M. Inhibition of lipoxygenase activity and HL60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). **Biochimica et Biophysica Acta** 1125, 68-72, 1992.
- Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis** 5 (5): 415-418, 2000.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**: 82, 1107-1118, 1990.
- Sohn K.H., Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Yi S.Y., Kim. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. **Cancer letter**: 1;94(2):213-218, 1995.
- Sporn M.B., Suh N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis** 21 (3): 525-530, 2000.
- Staquet M.J, Byar D..P, Green S.B. Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: Rationale for a three-stage strategy. **Cancer treat rep**, 67, 753-765,1983.
- Sugarbaker P.H. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastatic from colorectal cancer. **J. Surg. Oncol. Suppl**, 3 : 158-160, 1993.
- Suggitt M., Swaine D.J., Pettit G.R., Bibby M.C. Characterization of hollow fiber assay for determination of microtubule disruption in vivo. **Clinical Cancer Research**: 10: 6677-6685, 2004.
- Suggitt M., Bibby M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target driven approaches. **Clinical Cancer Research**, 11: 971-981, 2005.
- Suggitt M., Cooper P.A., Shnyder S.D. , Bibby M.C. The hollow fibre model – facilitating

- anti-cancer pre-clinical pharmacodynamics and improving animal welfare. ***International Journal of Oncology*** (29): 1493-1499, 2006.
- Thiébaud AC.M, Schatzkin A., Ballard-Barbash R., Kipnis V. Dietary Fat and Breast Cancer: Contributions from Survival Trial. ***Journal of the National Cancer Institute*** 98(24): 1753-1755, 2006.
- Thompson J., Stewart C..F, Houghton P.J. Animal models for studying the action of topoisomerase I targeted drugs. ***Biochimica et Biophysica Acta*** 1400 (1): 301-319, 1998.
- Thomsen L.L., Sargent J.M., Williamson C.J., Elgie A.W. Nitric Oxide Synthase Activity in Fresh Cells from Ovarian Tumour Tissue: Relationship of Enzyme Activity with Clinical Parameters of Patients with Ovarian Cancer. ***Biochemical Pharmacology*** 56: 1365-1370, 1998.
- Trosko J.E., Chang C.C. Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. ***Mutation Research*** 219-229, 2001.
- Tsuruga, T., Chun, Y.T., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells ***Chemical and Pharmacological Bulletin*** 39, 3276-3278, 1991.
- Verweij J., Jonge M.J.A. Achievements and Furure of Chemorerapy. ***Eur. J. Cancer*** 36:1479-1487, 2000.
- Xie K. Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. ***Free Radical Biology and Medicine*** (34) 8: 969-986, 2003.
- Zagoto J.N., Bracht A. Pagadigorria C.L.S., Ishii-Iwamoto E..L, Cortez D.A.G., Yamamoto N.S. Effects of the kielmeyera coriacea extract on energy metabolism in rat liver. ***Journal of Ethnopharmacology*** (105 -1 e 2): 47-54, 2006.

- Zou, W., Liu, X., Yue, P., Zhou, Z., Sporn, M.B., Lotan, R., Khuri, F.R., Sun, S. Yc-Jun NH2-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1 9-dien-28- oate in human lung cancer cells. **Cancer Research** 64, 7570–7578, 2004.
- Yee S.K., Chu S.S., Xu Y.M., Choo P.L. Regulatory control of chinese proprietary medicines in Singapore. **Health Policy** 71: 133-149, 2005.
- You HoJim, Choi Chul Yung, Kim Ji Young, Park Sung Jun, Hahm Kyung-Soo, Jeong Hye Gwang. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor-KB activation in the resting macrophages. **FEBS Letters** 509: 156-160, 2001.
- Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J., Laval F., Dewhirst M.W., Mitchell J.B. The multifaceted roles of Nitric Oxide in Cancer. **Carcinogenesis** 19 (5):711-721, 1998.
- Wu A.W., Gu J., Li Z.F., Ji J.F., Xu G.W. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**. 10(16):2323-6, 2004.

Anexos

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada
**“ Atividade Antitumoral, Isolamento e Identificação dos Princípios Ativos da
Kielmeyera coriacea Mart.”.**

() 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 **1252-1**).

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

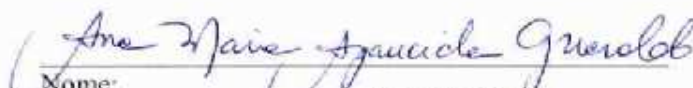

Aluna: Maria Carolina Bayeux Leme Montanari de Vasconcellos



Orientador: Prof Dr. 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
CEEAIIB - UNICAMP