

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Atividade antitumoral da dihidrocucurbitacina B, um
composto isolado de *Wilbrandia ebracteata* Cogn:
estudos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.
Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau.

JARBAS MOTA SIQUEIRA JUNIOR

FLORIANÓPOLIS
2007

Siqueira Jr, Jarbas Mota. **Atividade antitumoral da dihidrocucurbitacina B, um composto isolado de *Wilbrandia ebracteata* Cogn: estudos *in vitro* e *in vivo***. Florianópolis, 2007, 113p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Defesa: 02/05/2007

A proposta para este trabalho foi investigar as propriedades antitumorais de um composto isolado de WE, a dihidrocucurbitacina B (DHCB), sobre células de melanoma murino B16F10. Nos ensaios do MTT e incorporação de timidina triciada para investigar a viabilidade e proliferação celular, os resultados demonstraram que tanto a fração diclorometânica de WE (WEDC) quanto DHCB reduzem de maneira significativa a proliferação sem alterações marcantes na viabilidade das células B16F10 em cultura, porém DHCB foi menos citotóxica. O mesmo perfil não foi observado em células de fibroblasto murino NIH3T3, onde DHCB promoveu efeito apenas nas maiores concentrações. Antiinflamatórios não esteroidais (Indometacina e Naproxeno) exibiram efeito inibitório sobre a viabilidade e proliferação de células B16F10 apenas em concentrações mais elevadas. Além disso, células B16F10 não expressaram COX-2 nas condições avaliadas. Este fato direcionou nosso estudo para a investigação do efeito da DHCB sobre eventos relacionados à proliferação celular. Análises da expressão de proteínas que participam no controle do ciclo celular revelaram que DHCB foi capaz de reduzir a expressão de ciclina A e principalmente ciclina B1. Ensaios de citometria de fluxo para observar as fases do ciclo celular demonstraram que DHCB promoveu um atraso na progressão do ciclo celular, acumulando as células na fase G2/M, este fato foi acompanhado pelo surgimento de células poliplóides. Ainda por citometria de fluxo, foi observado que DHCB não induz apoptose no ensaio de incorporação de Anexina V-FITC. O surgimento de células poliplóides foi confirmado por imunofluorescência e demonstrou ainda que DHCB promove importantes alterações na distribuição dos filamentos de actina, bem como, nos pontos de adesão focal, concentrando-os. Nos experimentos *in vivo*, a administração de DHCB por via oral foi capaz de reduzir ambos, o crescimento tumoral e a formação de metástase em pulmão induzidos pela inoculação de células B16F10 em camundongos. Nossos resultados revelam que DHCB reduz a taxa proliferação das células B16F10 devido, pelo menos em parte, à diminuição da expressão de ciclinas, principalmente ciclina B1 e ao dano na distribuição e/ou formação do citoesqueleto de actina, inibindo com isso a citocinese, mas não a cariocinese. Além disso, DHCB foi efetiva quando administrada por via oral em camundongos e não foram observados efeitos adversos como sangramentos, diarreia ou outra alteração comportamental. De maneira geral, nossos resultados sugerem que DHCB apresenta potenciais perspectivas para utilização na terapia de combate ao câncer.

Palavras-chave: *Wilbrandia ebracteata*, Dihidrocucurbitacina B, atividade antitumoral, ciclo celular, citoesqueleto.

"Na Idade Média, as pessoas acreditavam que a Terra era plana, porque elas tinham ao menos a evidência de seus sentidos; nós acreditamos que ela é redonda não porque um por cento de nós pôde dar as razões científicas para uma crença tão fantástica, mas porque a ciência moderna nos convenceu de que nada que é óbvio é verdadeiro, e que tudo que é mágico, improvável, extraordinário, gigantesco, microscópico, cruel ou excessivo é científico."

George Bernard Shaw (1856-1950)

*À Deus por ter iluminado meus caminhos,
dando-me a tranqüilidade para seguir sempre
em frente.*

*À minha família, pelo apoio incondicional em
todos os momentos, mesmo à distância, me
incentivando em todas as minhas decisões.*

*À minha namorada Camila D'Agostin Donadel,
pela cumplicidade, carinho e presença sempre
importantes em minha vida.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Rosa Maria
Ribeiro do Valle Nicolau, pelo incentivo,
amizade e por acreditar no meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por possibilitar a execução deste trabalho, pela amizade, incentivo, pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos durante todo o período em que trabalhamos juntos.

Agradeço ao Prof. Dr. Artur José de Brum-Fernandes, pelo período em que passei em seu laboratório na *Université de Sherbrooke*, onde tive a oportunidade de aprender muito, tanto nos aspectos científicos quanto pessoais.

À Profa. Dra. Marení Rocha Farias e sua equipe, em especial à Andressa Gazola por ter fornecido os compostos testados e também pela amizade.

À equipe do Prof. Artur Fernandes, Maxime Gallant, Marianne Durand, Philippe Dufort e Mihai Nedelcescu pela convivência durante o período em que estive no Canadá.

À minha namorada Camila D'Agostin Donadel, pelo companheirismo, amor, paciência e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos Silvia Dal Bó, Mariana Appel Hort, Andreza Campos, Prof. Paulo Dias, Karin Scheschowitsch, Eduardo Moreira, Suelen Goulart, Christiane Borges, Ângela Bet e Geisson Nardi, pela convivência, amizade, discussões, apuros e momentos agradáveis que passamos.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, por participar na minha formação.

À Profa. Dra. Cristine Bressan pelo auxílio em algumas metodologias.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia.

Aos demais colegas do Departamento de Farmacologia pelo bom convívio.

Aos amigos do fabuloso time de futebol da farmacologia, o “campeão dos campeões” (ao menos no bom humor), pelos momentos de descontração memoráveis.

Aos funcionários do departamento Pedro, Diana, Rita, Zú e outros pela atenção e ajuda prestada.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Controle do ciclo celular: participação de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas.....	11
Figura 2 -	Folhas e raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>	28
Figura 3 -	Estruturas de Cucurbitacinas encontradas em <i>Wilbrandia ebracteata</i> COGN.....	29
Figura 4 -	Dihidrocucurbitacina B.....	35
Figura 5 -	Efeito da WEDC (A) e DHCB (B) sobre a viabilidade e proliferação celular em células B16F10.....	45
Figura 6 -	Efeito da DHCB sobre a viabilidade e proliferação em células NIH3T3.....	47
Figura 7 -	Efeito da DHCB sobre a viabilidade de células NIH3T3 por fluorescência (LIVE/DEAD).....	48
Figura 8 -	Efeito de AINEs sobre a viabilidade e proliferação celular. Expressão basal da COX-2 em células B16F10.....	50
Figura 9 -	Análises morfológicas por microscopia em tempo real	52
Figura 10 -	Efeito da adição de DHCB (10 µg/mL) sobre a distribuição das células B16F10 nas fases G1 e G2/M do ciclo celular.....	54
Figura 11 -	Verificação da indução de apoptose pelo ensaio da incorporação de Anexina-V FITC.....	55
Figura 12 -	Expressão de proteínas que participam na regulação do ciclo celular no início de G1 (A) e na transição G1/S (B).....	57
Figura 13 -	. Expressão de proteínas que participam na regulação do ciclo celular na transição G2/M.....	58
Figura 14 -	Influência da DHCB sobre o citoesqueleto e núcleo de células B16F10, avaliado por microscopia de fluorescência.....	60
Figura 15 -	Influência da Citocalasina D sobre o citoesqueleto e núcleo de células B16F10, avaliado por microscopia de fluorescência.....	61
Figura 16 -	Teste de proliferação celular em células B16F10 na presença de concentrações crescentes de citocalasina D.....	62
Figura 17 -	Influência da DHCB sobre o citoesqueleto, núcleo e pontos de adesão focal de células B16F10, avaliado por microscopia de fluorescência.....	64

<i>Figura 18 - Efeito do tratamento v.o. com DHCB ou veículo, sobre o crescimento tumoral.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 19 - Efeito do tratamento com DHCB sobre a formação de metástases em pulmão.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 20 - A história da quimioterapia.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 21 - Possível mecanismo de ação da Dihidrocucurbitacina B sobre células tumorais.....</i>	<i>83</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	- Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	- Análise de variância
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
AP-1	- Ativador de proteína 1
ATP	- Adenosina trifosfato
FGF	- Fator de crescimento de fibroblastos
Cdk	- Quinase dependente de ciclina
COX-1 e -2	- Ciclooxygenase- 1 e -2
DHCB	- Dihidrocucurbitacina B
DMEM	- Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
DMSO	- Dimetilsulfóxido
TCA	- Ácido tricloroacético
FITC	- Fluoresceína
RNAse	- Ribonuclease
EPM	- Erro Padrão da Média
GLG	- Glicosaminoglicanas
HSPGs	- Proteoglicanas de sulfato de heparana
IGF	- Fator de crescimento similar à insulina
IGF-R	- Receptor para fator de crescimento similar à insulina
IL	- Interleucina
IL-R	- receptor de interleucina
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
MTT	- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolil
NFAT	- Fator nuclear de células T ativadas
NF-kB	- Fator nuclear kB
p-ERK	- Quinase reguladora de sinal extracelular fosforilada
PKC	- Proteína quinase C
Rb	- Retinoblastoma
RNAm	- RNA mensageiro
s.c.	- Via subcutânea

TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
v.o.	- Via oral
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
WEDC	- Fração diclorometano de <i>Wilbrandia ebracteata</i>

RESUMO

Nosso grupo tem caracterizado *Wilbrandia ebracteata* COGN (WE) como fonte de substâncias biologicamente ativas com atividade antiinflamatória conhecidas como cucurbitacinas. A proposta para este trabalho foi investigar as propriedades antitumorais de um composto isolado de WE, a dihidrocucurbitacina B (DHCB), sobre células de melanoma murino B16F10. Nos ensaios do MTT e incorporação de timidina triciada para investigar a viabilidade e proliferação celular, os resultados demonstraram que tanto a fração diclorometânica de WE (WEDC) quanto DHCB reduzem de maneira significativa a proliferação sem alterações marcantes na viabilidade das células B16F10 em cultura, porém DHCB foi menos citotóxica. O mesmo perfil não foi observado em células de fibroblasto murino NIH3T3, onde DHCB promoveu efeito apenas nas maiores concentrações. Antiinflamatórios não esteroidais, Indometacina e Naproxeno, exibiram efeito inibitório sobre a viabilidade e proliferação de células B16F10 apenas em concentrações mais elevadas. Além disso, células B16F10 não expressaram COX-2 nas condições avaliadas. Este fato direcionou nosso estudo para a investigação do efeito da DHCB sobre eventos relacionados à proliferação celular. Análises da expressão de proteínas que participam no controle do ciclo celular, revelaram que DHCB foi capaz de reduzir a expressão de ciclina A e principalmente ciclina B1. Ensaios de citometria de fluxo para observar as fases do ciclo celular demonstraram que DHCB promoveu um atraso na progressão do ciclo celular, acumulando as células na fase G2/M, este fato foi acompanhado pelo surgimento de células poliplóides. Ainda por citometria de fluxo, foi observado que DHCB não induz apoptose no ensaio de incorporação de Anexina V-FITC. O surgimento de células poliplóides foi confirmado por imunofluorescência e demonstrou ainda que DHCB promove importantes alterações na distribuição dos filamentos de actina, bem como, nos pontos de adesão focal, concentrando-os. Nos experimentos *in vivo*, a administração de DHCB por via oral foi capaz de reduzir ambos, o crescimento tumoral e a formação de metástase em pulmão induzidos pela inoculação de células B16F10 em camundongos. Nossos resultados revelam que DHCB reduz a taxa proliferação das células B16F10 devido, pelo menos em parte, à diminuição da expressão de ciclinas, principalmente ciclina B1 e ao dano na distribuição e/ou formação do citoesqueleto de actina, inibindo com

isso a citocinese, mas não a cariocinese. Além disso, DHCB foi efetiva quando administrada por via oral em camundongos e não foram observados efeitos adversos como sangramentos, diarreia ou outra alteração comportamental. De maneira geral, nossos resultados sugerem que DHCB apresenta potenciais perspectivas para utilização na terapia de combate ao câncer.

ABSTRACT

We have characterized *Wilbrandia ebracteata* COGN (WE) as a source of cucurbitacins, substances with antiinflammatory properties. Our present study aimed to investigate the antitumoral properties of a compound isolated from WE, dihydrocucurbitacin B (DHCB), using murine B16F10 melanoma cells. In the MTT and H³-Thymidine assays used to investigate cell viability and proliferation, our results showed that addition of DHCB significantly reduced cell proliferation without important effects on viability. The same effect was not observed in murine NIH3T3 fibroblasts since, DHCB exhibited effects only at highest concentrations. Nonsteroidal antiinflammatory drugs Indomethacin and Naproxen exhibited an effect on B16F10 cell viability and proliferation only at the highest concentrations tested. Moreover, B16F10 cells did not express cyclooxygenase-2 under conditions evaluated. These results lead us to investigate the events that controlling cell proliferation. Western blot analysis for some cell cycle regulators demonstrated that DHCB decreased the expression of Cyclin A, and especially of Cyclin B1. Flow cytometry revealed that DHCB delayed cell cycle, accumulating cells in G2/M phases and raising the number of polyploid cells. Annexin V-FITC incorporation demonstrated that DHCB did not induce apoptosis. The increase in polyploid cell numbers was confirmed by immunofluorescence assays, which also demonstrated that DHCB promotes remarkable alterations in the cell cytoskeleton and focal adhesion points. In the *in vivo* experiments, administration of DHCB p.o. was able to reduce both tumor growth and metastase in mice without causing side effects such as bleeding, diarrhea or behavioral changes. The present results reveal that dihydrocucurbitacin B reduces cell proliferation. This effect is due, at least in part, to a decrease in the expression of cyclins, mainly cyclin B1 and disruption of F-Actin cytoskeleton inhibiting cytokinesis but not karyokinesis. Moreover, our results demonstrated that DHCB was effective when administered orally. Taken together, our findings suggest that DHCB might constitute a promising therapeutic tool against cancers.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico e aspectos gerais.....	2
1.2 Carcinogênese.....	5
1.3 Câncer e ciclo celular.....	8
1.4 Câncer e Apoptose.....	13
1.5 Câncer e Angiogênese.....	15
1.6 Invasão e Metástase.....	18
1.7 Câncer e Inflamação.....	21
1.8 <i>Wilbrandia ebracteata</i> COGN e cucurbitacinas.....	25
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos Gerais.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Procedimentos de extração e isolamento.....	34
3.2 Cultura de células.....	35
3.3 Ensaio de Viabilidade Celular.....	36
3.3.1 <i>Viabilidade celular por imunofluorescência (LIVE/DEAD)</i>	36
3.4 Ensaio de proliferação celular.....	37
3.5 Análise de Microscopia em tempo real (<i>Time lapse</i>).....	37
3.6 Avaliação de proteínas que participam da modulação do ciclo celular.....	38
3.6.1 <i>Protocolo para extratos celulares</i>	38
3.7 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	39
3.8 Avaliação de Apoptose por citometria de Fluxo (Incorporação de Anexina V-FITC).....	40
3.9 Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão focal por imunofluorescência.....	40

3.10	Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	41
3.10.1	<i>Animais</i>	41
3.10.2	<i>Influência sobre crescimento tumoral</i>	41
3.10.3	<i>Ensaio de metástase</i>	42
3.11	Drogas e Reagentes.....	42
3.12	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	<i>Efeitos sobre a viabilidade e proliferação celular</i>	44
4.1.1	Fração diclorometânica (WEDC) e dihidrocucurbitacina B (DHCB) derivadas de <i>W. ebracteata</i>	44
4.1.2	Efeito da dihidrocucurbitacina B (DHCB) sobre células de fibroblasto murino NIH3T3.....	46
4.1.3	Anti-inflamatórios não esteroidais e expressão da enzima ciclooxigenase-2.....	49
4.2	Análise da dinâmica e morfologia de células B16F10 por microscopia óptica em tempo real.....	51
4.3	Efeito da dihidrocucurbitacina B sobre o ciclo celular e apoptose avaliados por citometria de fluxo.....	53
4.4	Efeito da dihidrocucurbitacina B sobre a expressão de proteínas que participam na regulação do ciclo celular.....	56
4.5	Análises do citoesqueleto e núcleo das células B16F10 por microscopia de fluorescência.....	59
4.6	Análises da formação de pontos de adesão focal nas células B16F10 por imunofluorescência.....	63
4.7	Avaliação da atividade da dihidrocucurbitacina B sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	65
4.8	Avaliação da atividade da dihidrocucurbitacina B sobre a formação de metástases <i>in vivo</i>	67
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXOS	99

1. Introdução

1.1 Histórico e aspectos gerais

O câncer é uma doença antiga, sendo descrita na história da medicina desde os relatos médicos mais iniciais. Sete papiros, descobertos e decifrados no final do século XIX, proveram os primeiros conhecimentos diretos sobre as práticas médicas do antigo Egito. A descrição mais antiga, data-se de 1600 a.C. e contém detalhes de condições que são compatíveis com lesões relacionadas ao câncer. Neste manuscrito há a descrição de oito casos de tumores ou úlceras de mama que foram tratadas por cauterização, com uma ferramenta denominada “*the fire drill*” (broca de fogo), relatando ainda que não há tratamento para esta doença. Além disso, ossos remanescentes de múmias revelaram crescimento que sugere a ocorrência de osteosarcomas e em outros casos, há destruição óssea similar à observada em cânceres de cabeça e pescoço. Os médicos do antigo Egito tratavam pacientes para diferentes tipos de câncer correlacionando medicina e religião; prescrevendo pílulas e orelhas de porco; dispensando unguentos, enemas, óleo de rícino e partes de animais (Collins, 2004).

Após o declínio do Egito, os capítulos seguintes da história da medicina foram escritos por gregos e romanos (Collins, 2004). Hipócrates e Galeno, cujos conceitos dominaram o pensamento médico por cerca de 1500 anos, retiraram a medicina do campo da magia, superstição e religião, definindo doenças como sendo processo natural e baseando o tratamento em observação e experiência. Hipócrates (460 – 370 a.C.) foi o primeiro a utilizar o termo Câncer (origem grega *karkinos*, que significa caranguejo), para descrever tumores ulcerosos ou não.

A falta de anestesia e condições assépticas tornaram a cirurgia uma opção de risco para o tratamento do câncer no século XVII. No século seguinte, em 1761, Giovanni Morgagni, foi o primeiro a realizar autópsias para relacionar a doença do

paciente a achados patológicos após a morte. Este fato foi a base para o surgimento da oncologia como ciência para o estudo do câncer que, no século XIX, teve seu reconhecimento com Rudolph Virchow, fundador da patologia celular e com a utilização do microscópio moderno. Quando a anestesia tornou-se disponível, em 1846, surgiram os grandes cirurgiões e no final do século XIX, William Stewart Halsted, professor de cirurgia na Universidade Johns Hopkins, desenvolveu a mastectomia radical. E até 1950, a cirurgia era a terapia predominante para o tratamento do câncer. Em 1960, com a invenção do acelerador linear, a radioterapia se tornou uma ferramenta preciosa para o controle local e regional da doença, mas, do mesmo modo que a cirurgia, não era capaz de erradicar o câncer metastático. O tratamento efetivo para muitos pacientes necessitava alcançar cada órgão do corpo (Chabner, 2004). Desde então, com o passar dos anos, o desenvolvimento e uso de fármacos tem produzido resultados bem sucedidos no tratamento de muitas pessoas com câncer (Collins, 2004).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco à vida. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosa, é denominado carcinoma; se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Em geral, a progressão dos tumores segue uma

seqüência evolutiva: crescimento local, metástase em linfonodos regionais e para outros órgãos e óbito (Alisson, 2004).

Apesar dos recentes avanços biotecnológicos, o câncer ainda é a segunda maior causa de morte por doenças no mundo ocidental. Dados da Organização Mundial de Saúde em 2005 demonstraram que, dos 58 milhões de registros de morte em todo o mundo, cerca de 13 % (7,6 milhões) foram causados por câncer. A estimativa esperada para 2015 e 2030 é de 9 e 11,4 milhões de óbitos, respectivamente (WHO, 2006). O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH, *National Institutes of Health*) estimou que em 2005 foram gastos cerca de US\$ 209,9 bilhões, sendo \$74 bilhões com gastos médicos diretos; \$17,5 bilhões com morbidade (custo relacionado à doença); e \$118,4 bilhões com mortalidade (custo relacionado à morte). A estimativa para o ano de 2006 foi de aproximadamente 1,4 milhões de novos casos (ACS, 2006). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2000, o câncer, seguindo a tendência mundial, foi também a segunda maior causa de morte por doenças.

Após anos de rápidos avanços na ciência, a pesquisa científica sobre o câncer tem gerado uma rica, e ao mesmo tempo complexa, rede de conhecimentos revelando ser uma patologia que envolve alterações dinâmicas no genoma. A base tem sido situada na descoberta de mutações que produzem oncogenes que passam a exercer funções dominantes ou que anulam a função de genes supressores de tumor (Hanahan e Weinberg, 2000). Células tumorais diferem de células normais em muitas características importantes incluindo indiferenciação, capacidade de invasão e sensibilidade reduzida aos medicamentos. Estas diferenças não surgem simplesmente do descontrole no crescimento celular, mas também de um processo celular de evolução (Hartwell e Kastan, 1999).

1.2 Carcinogênese

Células normais são perfeitamente sintonizadas com o ambiente em que elas se encontram e respondem a sinais reguladores externos que podem estimular ou inibir a proliferação celular. Para que uma célula inicie eventos mitogênicos, fatores extracelulares são liberados e precisam desencadear uma cascata de eventos no interior da célula, que resulta na ativação de genes que estimulam a divisão celular. Com poucas exceções, muitas das populações celulares de um organismo adulto são diferenciadas e não proliferam por muito tempo. O câncer surge quando uma célula, por várias razões, perde o controle sobre o seu crescimento e começa a se dividir de maneira desregulada (Bertram, 2001).

Apesar de um eficiente sistema de reparo, danos ou alterações permanentes no genoma (mutações) podem ocorrer. Várias linhas de evidências indicam que a carcinogênese é um processo multifatorial onde cada evento é o resultado de alterações genéticas que conduzem à transformação progressiva de células normais em derivados malignos. Estas modificações incluem: pontos de mutação que causam substituições em aminoácidos; mutação por deleção ou inserção de nucleotídeos; desbalanço cromossomal ou instabilidade resultando em amplificação, expressão em níveis elevados ou expressão inapropriada de um gene particular; perda de um gene ou sua fusão com outro gene como resultado de ruptura cromossomal e rearranjo resultando em proteínas quiméricas com função alterada; modificações epigenéticas no DNA, dentre as quais a mais importante é a metilação de citosina em ilhas CpG, levando ao silenciamento de genes. Células tumorais apresentam mutações seletas que possuem duas funções básicas: mutações que aumentam a atividade das proteínas que elas codificam, denominadas oncogenes; ou mutações que inativam a função de genes classificados como supressores de

tumor. É importante observar que o dano ao DNA *per se* não é um evento mutagênico. A replicação do DNA e subsequente divisão celular são necessárias para converter o dano em alteração que pode ser transmitida. Assim, a proliferação é um fator vital na formação de mutações e na expansão de clones de células portadoras de alterações genômicas. Devido aos múltiplos pontos de controle que existem para limitar a proliferação inapropriada, com poucas exceções, células malignas humanas precisam acumular múltiplas mutações (em cerca de 4 – 5 genes) que permitam sua replicação autônoma e invasão (para revisão ver Bertram, 2001).

Acredita-se que a transformação de uma célula normal em célula tumoral é um processo que pode atravessar vários estágios ao longo de vários anos ou décadas. Os estágios de carcinogênese incluem iniciação, promoção e progresso. O primeiro envolve uma reação entre a substância promotora do câncer (carcinógeno) e o DNA das células do tecido podendo haver suscetibilidade genética. Este estágio pode permanecer latente, podendo ser um risco para o desenvolvimento de câncer em uma fase tardia. O segundo ocorre muito lentamente por um período que compreende muitos meses ou anos. Durante este estágio, a alteração na dieta e estilo de vida podem ter um efeito benéfico podendo até não ocorrer o câncer. O terceiro estágio envolve a progressão e expansão do câncer (Reddy et al., 2003). Este processo pode ser ativado por vários carcinógenos ambientais (cigarro, dejetos industriais, vapores de combustíveis), agentes inflamatórios (ex. TNF) ou ainda, promotores de tumor (ésteres de forbol), dentre outros fatores (Hartwell e Kastan, 1999). Hanahan e Weinberg (2000), sugerem que a grande diversidade de genótipos de células cancerosas é resultante da manifestação de seis alterações essenciais na fisiologia celular que, coletivamente, orientam o desenvolvimento maligno: 1) auto-

suficiência em sinais de crescimento; 2) sensibilidade reduzida aos fatores que inibem o crescimento celular; 3) evasão de morte celular programada (apoptose); 4) potencial replicativo ilimitado; 5) angiogênese sustentada; 6) invasão tecidual e metástase.

Células normais requerem sinais de crescimento mitogênicos para que então possam iniciar a transição de um estado quiescente ao estado de proliferação ativa. Estes sinais são transmitidos no interior da célula por receptores transmembrana que ativam distintas classes de moléculas: fatores de crescimento que se difundem, componentes de matriz extracelular e moléculas de adesão. A aquisição de autonomia de sinais de crescimento foi a primeira das 6 capacidades adquiridas pela célula tumoral a ser claramente definida pelos pesquisadores em câncer; em grande parte por causa da prevalência de oncogenes dominantes que têm sido encontrados, que participam desta modulação. Três estratégias moleculares comuns para adquirir autonomia são evidentes, envolvendo alterações em sinais de crescimento extracelulares, em transdutores transcelulares destes sinais, ou de circuitos intracelulares que traduzem estes sinais em ação (Rak et al., 1995).

Os receptores localizados na superfície celular, que fazem a transdução de sinais estimulatórios de crescimento para o interior das células, são alvos de falhas na regulação durante a patogênese tumoral. Receptores de fatores de crescimento, que freqüentemente estimulam a atividade da tirosina quinase em seus domínios citoplasmáticos, estão expressos em maior quantidade em muitos tipos de câncer. A elevada expressão destes receptores pode fazer com que a célula tumoral se torne hiperresponsiva em ambientes onde os níveis de fatores de crescimento, normalmente, não seriam suficientes para ativar a proliferação (Rak et al., 1995).

Os mecanismos mais complexos para a aquisição da autonomia em sinais de crescimento estimulatórios são derivados de alterações em componentes da sinalização citoplasmática que processam e recebem os sinais emitidos pelos receptores ativados por seus ligantes. Por exemplo, a via SOS-Ras-Raf-MAPK onde, cerca de 25 % dos tumores humanos apresentam proteínas Ras estruturalmente alteradas, sendo capazes de iniciar um fluxo de sinais mitogênicos no interior das células, sem necessitar de ativação prévia de receptores sensíveis a fatores de crescimento (Medema e Bos, 1993).

De maneira ampla, células tumorais possuem defeitos em circuitos regulatórios que governam sua proliferação, incluindo perda na sensibilidade aos estímulos inibitórios para a proliferação. No interior de um tecido normal, múltiplos estímulos antiproliferativos operam com a finalidade de manter a célula em seu estado quiescente e também a homeostase do tecido. Estes estímulos antiproliferativos podem bloquear a proliferação por dois mecanismos distintos: as células podem ser forçadas a permanecer em seu estado quiescente, podendo reiniciar o ciclo celular se houver estímulo suficiente para tal; ou as células podem ser induzidas a abandonar de maneira permanente seu potencial proliferativo, sendo conduzidas à estados pós-mitóticos, usualmente associados com aquisição de traços diferenciados específicos (Weinberg, 1995).

1.3 Câncer e Ciclo celular

O câncer tem sido considerado, dentre outros fatores, como uma doença do ciclo celular onde a compreensão dos mecanismos moleculares que produzem proliferação inapropriada pode conduzir à identificação de alvos que poderiam ser

manipulados terapeuticamente no combate a tumores (Pines, 1995). Diferentemente de células normais, que só proliferam quando ativadas por sinais mitogênicos, a proliferação de células tumorais procede de maneira independente, sugerindo que muitos tumores apresentam “defeitos” na maquinaria de controle do ciclo de celular (Malumbres e Carnero, 2003). Isto não significa dizer que os passos envolvidos no ciclo celular de células tumorais sejam diferentes do que ocorre em células normais, mas células malignas proliferam, pois não possuem influências inibitórias derivadas do estroma, nem necessitam de fatores de crescimento para iniciar ou ainda mantê-las em estado proliferativo (Deshpande et al., 2005).

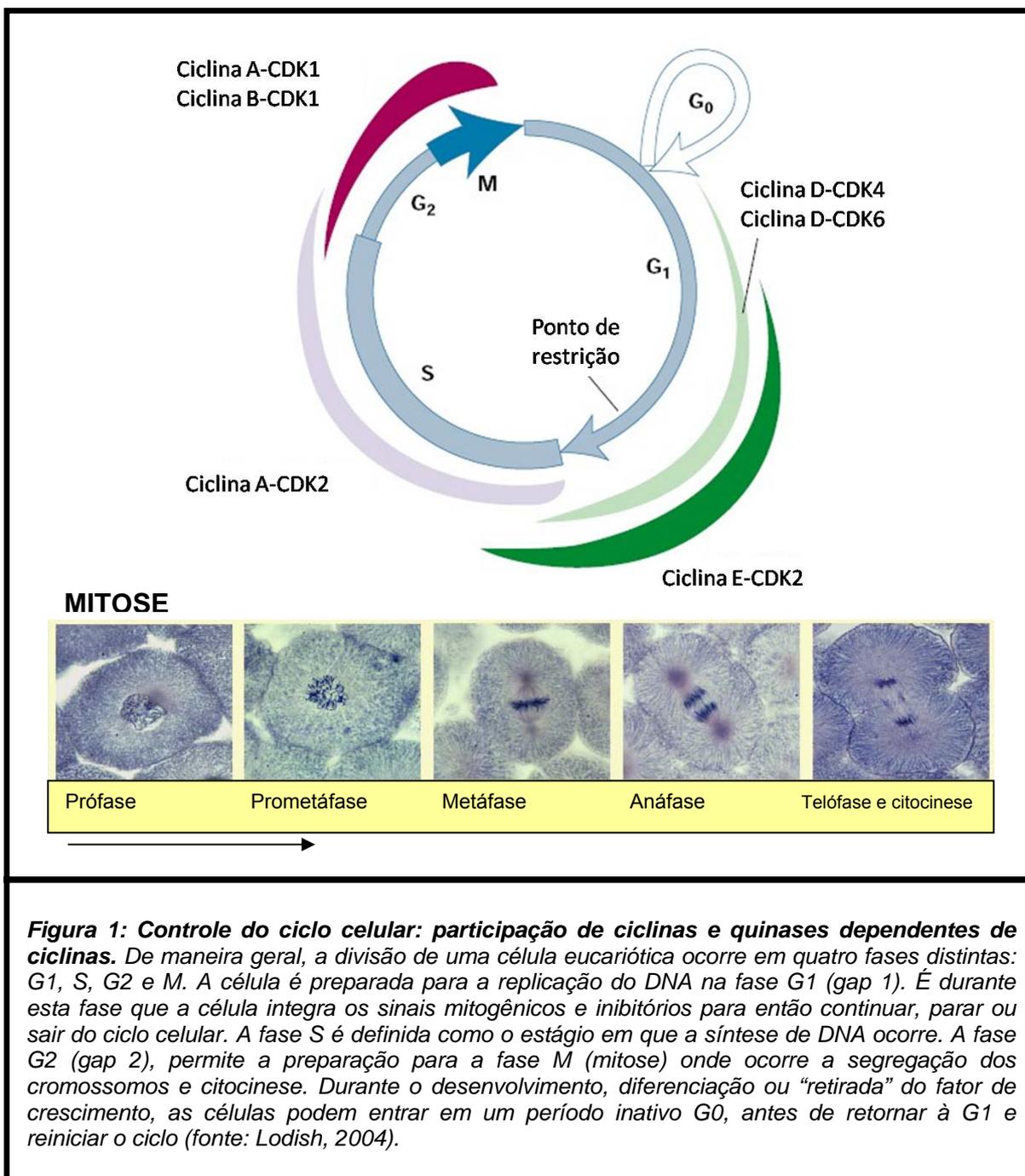
Recentes avanços na compreensão do ciclo celular têm revelado vários pontos de regulação que asseguram a ordem dos eventos, bem como processos integrados de reparo que permitem sua progressão. De maneira geral, a divisão de uma célula eucariótica ocorre em quatro fases distintas: G1, S, G2 e M. A célula é preparada para a replicação do DNA na fase G1 (*gap 1*). É durante esta fase que a célula integra os sinais mitogênicos e inibitórios para então continuar, parar ou sair do ciclo celular. A fase S é definida como o estágio em que a síntese de DNA ocorre. A fase G2 (*gap 2*), permite a preparação para a fase M (mitose) onde ocorre a segregação dos cromossomos e citocinese. Durante o desenvolvimento, diferenciação ou “retirada” do fator de crescimento, as células podem entrar em um período inativo G0, antes de retornar à G1 e reiniciar o ciclo (Johnson e Walker, 1999).

Etapas de verificação, conhecidas como “pontos de checagem”, asseguram a fidelidade da replicação e separação cromossomal, permitindo a manutenção da estabilidade genética. A falha nestes pontos de checagem para deter a célula após um estímulo apropriado (p.ex. mutações e dano no DNA) é uma das características do câncer. Um ponto de checagem ocorre na transição de G1 para S (ponto de

restrição) onde as células tornam-se independentes de fatores de crescimento e comprometidas com a divisão celular. O outro ponto de checagem ocorre na transição de G2 para M, sendo que este, responde ao dano no DNA e causa um atraso que permite seu reparo antes que a célula progrida à fase M; o terceiro ponto ocorre antes da anáfase e assegura a correta formação do fuso, garantindo a manutenção da integridade genômica (Molinari, 2000; Swanton, 2004).

A progressão no ciclo celular é basicamente regulada por duas classes de proteínas: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (cdks) (Figura 2). Em G1, o ponto de restrição é coordenado por duas famílias de ciclinas, D (D1, D2 e D3) e E (E1 e E2). As ciclinas tipo D interagem com as cdks 4 e 6 e as ciclinas E1 e E2 com a cdk2. As atividades de ambas as ciclinas são requeridas para regular a transição de G1 para S, mediada parcialmente pela fosforilação do retinoblastoma (Rb - proteína supressora de tumor). Em sua forma não-fosforilada, Rb reprime a transcrição dos genes, mediada por E2F, que seriam necessários para a entrada na fase S e replicação do DNA. Esta supressão ocorre por no mínimo 3 vias: primeiro o Rb induz modificações nas histonas do nucleosoma através do recrutamento da histona deacetilase para o sítio do fator E2F. A deacetilação de histonas altera a associação entre o DNA e nucleosomas, danificando o acesso ao aparato transcripcional do DNA; segundo, o Rb regula a estrutura do nucleosoma, recrutando complexos dependentes de ATP para agentes promotores como SWI/SNF; e terceiro, atuando sobre a estrutura da cromatina, através do recrutamento de SUV39H1 metilase e HP1 para o gene promotor da ciclina E, levando à metilação da histona H3 e assim, silenciando a ciclina E (Harbour et al., 1999; Ezhevsky et al., 2001). O estado fosforilado do Rb é crucial no controle da sua atividade repressiva e, a ativação seqüencial das ciclinas D/cdk-4 ou -6 seguidas pela ciclina E/cdk-2,

parece ser necessária para a fosforilação do Rb e ativação dos genes dependentes de E2F (Johnson e Walker, 1999; Swanton, 2004).



Fatores de crescimento e sinais mitogênicos convergem sobre o ciclo celular e estimulam a expressão das ciclinas da família D (D1, D2 e D3). A ciclina D é o integrante principal destes sinais celulares para iniciar a progressão através da fase

inicial em G1. Esta família de ciclinas age de duas maneiras: primeiro por fosforilação dependente de cdk-4 ou -6 e inativação parcial da atividade supressora do Rb, e uma segunda por seqüestro da molécula p27 de complexos inativos de ciclina E/cdk-2/p27 (Tetsu e McCormick, 1999).

A família das ciclinas E (E1 e E2) são reguladas pela atividade da ciclina D/cdk de duas maneiras. Primeiro, a inativação parcial do efeito supressor do Rb, permite que o fator de transcrição E2F inicie a transcrição da ciclina E; segundo, como dito anteriormente, complexos ciclina D/cdk seqüestram o inibidor p27^{Kip1} dos complexos previamente inativos ciclina E/cdk2/p27. O complexo ativo ciclina E/cdk2 fosforila outros substratos da fase G1, tais como o complexo SWI/SNF, que auxilia na inibição da atividade do Rb.

A ciclina E atua também sobre componentes que participam da síntese de DNA, facilitando a formação de complexos necessários para os processos de replicação e ainda, fosforilando nucleofosmina, que leva à dissociação e duplicação de centrômeros (Porter et al., 1997; Strohmaier et al., 2001). As vias de sinalização que controlam a transcrição, translação e localização nuclear das ciclinas D e E fornecem alvos terapêuticos potenciais para inibir a proliferação celular em fases iniciais do ciclo celular (Swanton, 2004).

A regulação da transição G2/M e entrada em mitose dependem da correta ativação do complexo ciclina B/cdk-1 e sua localização subcelular. A ciclina B é citoplasmática até G2, quando inicia o acúmulo no núcleo. Proteínas quinases como wee1 e myt1 fosforilam e inativam, enquanto fosfatases como cdc25B ativam o complexo ciclina B/cdk-1 (para revisão ver Pines, 1999; Molinari, 2000; Smits e Medema, 2001).

1.4 Câncer e Apoptose

A habilidade de populações de células tumorais de se expandir em número é determinada não somente pela taxa de proliferação celular, mas também, pela taxa de atrito entre as células. A morte celular programada ou apoptose representa a maior fonte deste atrito. A evidência é crescente, principalmente nos estudos em modelos animais e culturas de células, bem como em análises descritivas em biópsias de tumores humanos que adquirem resistência para a apoptose, sendo esta, uma característica de muitos, talvez todos, os tipos de câncer (Hanahan e Weinberg, 2000).

A maquinaria apoptótica pode ser amplamente dividida em duas classes de componentes: sensores e efetores. Os sensores são responsáveis pela monitoração do ambiente extra e intracelular para condições que indicam se uma célula deve viver ou morrer. Estes sinais regulam a segunda classe de componentes, que funcionam como efetores da morte celular. As sentinelas incluem receptores de superfície celular que se ligam aos fatores que permitem a sobrevivência ou morte da célula. Exemplos de pares destes ligantes/receptores incluem sinais de sobrevivência ativados por IGF-1/IGF-2 através de seu receptor, IGF-1R, e por IL-3 e seu receptor IL-3R (Lotem e Sachs, 1996; Butt et al., 1999). Sinais para a morte celular são ativados pelo ligante FAS ao seu receptor FAS e por TNF- α através de seu receptor TNF-R1 (Ashkenazi e Dixit, 1999). Sensores intracelulares monitoram as condições da célula e ativam a via de morte em resposta à detecção de anormalidades, incluindo dano ao DNA, desequilíbrio na sinalização provocada por ação de oncogenes, insuficiência em fatores de sobrevivência ou hipóxia (Evan e Littlewood, 1998).

Muitos dos sinais que induzem apoptose convergem sobre a mitocôndria, que responde aos sinais pró-apoptóticos por liberação de citocromo C, um importante catalisador da morte celular. Membros da família das proteínas Bcl-2 possuem ambas funções pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim) ou anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W), e agem em parte, modulando a sinalização de morte celular através da liberação de citocromo C. A proteína supressora de tumor p53 pode induzir apoptose aumentando a expressão de Bax em resposta ao dano no DNA. Bax por sua vez, estimula a liberação do citocromo C mitocondrial (Green e Reed, 1998).

Os efetores finais da apoptose incluem uma disposição de proteases intracelulares denominadas caspases. Em especial duas caspases, 8 e 9, são ativadas pelos “*death receptors*”, como FAS ou pela liberação de citocromo C, respectivamente. Estas caspases proximais disparam a ativação de vários efetores que executam os processos de morte celular, através da destruição seletiva de estruturas sub-celulares e organelas, e também do genoma (Thornberry e Lazebnik, 1998).

Células tumorais podem adquirir resistência à apoptose através de uma variedade de estratégias. Certamente, a mais comum ocorre com a perda de um regulador pró-apoptótico, através da mutação que envolve o gene supressor de tumor *p53*. A inativação resultante do seu produto, a proteína p53, é observada em um número maior que 50 % dos cânceres humanos, e tem como resultado a remoção do componente chave para a resposta ao dano do DNA. Sinais evocados por outras anormalidades, incluindo hipóxia e hiperexpressão de oncogenes, são também convergidos, em parte via p53, à ativação da maquinaria apoptótica (Harris, 1996).

1.5 Câncer e angiogênese

Vasos sanguíneos são estruturas constituídas basicamente por camadas de células endoteliais, as quais se interconectam para formar tubos que viabilizam o fluxo do sangue e a perfusão tecidual no organismo (Tobelem, 1990; Sweeney, 1998). No sistema de microcirculação sanguínea é possível distinguir três compartimentos: a superfície luminal do vaso, delimitada pelas células endoteliais, o interstício ou espaço extracelular da parede vascular e o espaço intracelular (Bergers e Benjamin, 2003).

A formação de vasos sanguíneos pode ocorrer a partir de diversos processos, como a vasculogênese e a angiogênese, nos quais estão envolvidos diferentes mecanismos celulares, como proliferação, migração e diferenciação (Risau, 1997). Vasculogênese é um processo definido como o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir da diferenciação *in situ* de células mesodérmicas progenitoras de células endoteliais (angioblastos e hemangioblastos). Estas células precursoras são recrutadas de áreas de mesoderma adjacentes ao embrião e/ou originadas por divisão celular local, organizando ilhotas sanguíneas e estabelecendo um plexo vascular primordial (Ruiter et al., 1992).

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (Hanahan e Folkman, 1996). Durante a resposta angiogênica, as células endoteliais, normalmente não proliferativas, são ativadas (Folkman, 1995a). Este evento é regulado por diversos fatores ativadores pró-angiogênicos, incluindo o bFGF (*fibroblast growth factor – basic*, ou, *type-2*), o VEGF-A (*vascular endothelial growth factor – type A*) – um membro de uma grande família de proteínas estruturalmente relacionadas – e a família dos VEGFs (Fachinger et al., 1999; Yancopoulos et al., 2000). Esses fatores interagem com

glicosaminoglicanas (GLG) e proteoglicanas, tais como HSPGs (*heparan sulfate proteoglycans*), presentes na matriz extracelular, na lâmina basal e em receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência das células endoteliais entre uma variedade de tipos celulares (Solimene et al., 1999; Chipperfield et al., 2002). A manutenção do sistema vascular é baseada na coexistência de sinais angiogênicos (ativadores) e angiostáticos (inibidores) em um equilíbrio dinâmico de concentrações estritamente controladas (D'Amore e Thompson, 1987).

No transcorrer do processo de angiogênese, as células endoteliais migram em uma direção determinada à formação de um novo vaso, agrupam-se em uma estrutura tubular para formar um lúmen e diferenciam-se, adequando a forma e aderindo firmemente umas às outras (tubulogênese). A continuidade da proliferação celular na parede vascular permite a ampliação do diâmetro do vaso sanguíneo. Assim, a estabilidade dos vasos sanguíneos está normalmente condicionada à redução da atividade proliferativa das células endoteliais, em decorrência do recrutamento para a parede do vaso e da adesão de células periendothelias ou perivasculares de suporte, derivadas do músculo liso. A estabilidade é complementada com a organização de uma lâmina basal e com o restabelecimento dos contatos com a matriz extracelular recém reconstituída (Lockshin e Zakeri, 2001).

Na ausência de contatos com células perivasculares e com a matriz extracelular, os vasos sanguíneos tornam-se susceptíveis à regressão, o que consiste em uma forma de apoptose (*anoikis* – indução de morte celular, em razão da perda de adesão celular ao suporte na matriz extracelular). Na perspectiva de que a estabilidade dos vasos sanguíneos seja mantida às expensas de sinais

voltados não só à sobrevivência, mas também à morte das células endoteliais, estas devem estar constantemente aptas a resistir a inúmeros sinais de apoptose por *anoikis* (Melino, 2001). Paradoxalmente, durante a remodelagem vascular – transição entre os processos de vasculogênese e angiogênese – a perda da adesão celular constitui evento imprescindível para a formação de vasos secundários (*sprouting*), pois permite o acesso dos fatores de crescimento angiogênicos à superfície das células endoteliais (para revisão ver: Yancopoulos et al., 2000).

O papel da angiogênese na biologia do câncer foi descrito inicialmente por Folkman (1971), que postulou e descreveu o fenômeno da dormência do tumor, na ausência de vascularização. No tumor existe um balanço entre proliferação e regressão que impede a expansão tumoral (estado de “dormência”). Somente após o recrutamento de seu próprio suprimento sangüíneo é que o tumor pode expandir em tamanho. Isto envolve a produção de fatores angiogênicos secretados pelas células tumorais e é conhecido como “*angiogenic switch*”.

Assim que um tumor inicia a produção de fatores angiogênicos, ativa as células endoteliais presentes nos vasos do tecido circundante para iniciar a angiogênese. Este estímulo leva estas células endoteliais originalmente em estado quiescente para um fenótipo ativado (Auerbach e Auerbach, 1994). Estas células endoteliais produzem enzimas proteolíticas que rompem suas membranas basais. Este é um pré-requisito para que células endoteliais possam migrar em direção ao estímulo angiogênico e alterar sua forma para um fenótipo alongado, quando começam a expressar moléculas de adesão que permitem a migração ao longo da matriz extracelular, proliferando e formando novos vasos (Alisson, 2004).

Quando descontrolado, o processo de angiogênese torna-se crítico para o crescimento de tumores sólidos e formação de metástases. Geralmente um tumor

não pode crescer mais do que uns poucos milímetros, a menos que o desenvolvimento de um novo suprimento de vasos sangüíneos seja induzido, de modo a invadir e vascularizar a massa tumoral (Kandel et al., 1991; Carmeliet e Jain, 2000; Bergers e Benjamin, 2003). Isto não significa que a as células tumorais ficam incapazes de proliferar, mas um inadequado suprimento de oxigênio e nutrientes resulta em altas taxas de apoptose. A angiogênese fisiopatológica (neovascularização) também é característica em diversas doenças desprovidas de malignidade, mas que implicam em algum nível de incapacitação, incluindo a artrite reumatóide, a endometriose, a psoríase e retinopatias proliferativas (Folkman e Klagsbrun, 1987; Folkman, 1995b; Jones et al., 2001).

1.6 Invasão e metástase

O tumor primário é uma massa presente no local onde ocorre a conversão de uma célula normal em célula tumoral. Se as células tumorais permanecessem localizadas, o câncer não teria grande relevância clínica. Entretanto, células tumorais nem sempre permanecem na massa tumoral primária, podendo ser deslocadas por: (1) invasão, ou o movimento de células para o interior do espaço ocupado por tecidos vizinhos; (2) por metástase, onde há a formação de tumores secundários em outros órgãos localizados em pontos distantes do tumor primário (Oppenheimer, 2006).

Invasão, em seu conceito mais simples, é a expansão de células tumorais para o interior do tecido circundante, como resultado de divisão celular contínua. Entretanto, o movimento celular ativo pode ocorrer. Células em tumores possuem a tendência de promover fraca adesão entre si, o que facilita seu deslocamento e

locomoção. Este movimento não ocorre no tecido normal. Células normais, de fato, se movimentam quando em cultura e no curso do desenvolvimento embriológico, mas células normais em cultura, quando tocam umas nas outras, usualmente param o crescimento e o movimento (Oppenheimer, 2004). Entretanto, células tumorais, pelo menos em cultura, não são controladas pelo contato e no corpo continuam a crescer e se mover para o interior dos tecidos circundantes. Além disso, muitas células tumorais liberam proteases, que provavelmente as auxiliam rompendo tecidos circundantes e assim, facilitando a invasão (Mazzocca et al., 2005; Wilson et al., 2005).

Os resultados de experimentos clássicos demonstraram que células em tumores primários são menos adesivas que as células normais do mesmo tipo, e isto pode contribuir para o espalhamento do câncer. Nestes experimentos, a força mecânica requerida para separar pares de células tumorais foi menor que a necessária para separar células normais do mesmo tecido (para revisão ver: Oppenheimer, 2006).

Vários experimentos têm sugerido explicações para a reduzida aderência das células tumorais. É conhecido que muitos tecidos podem se desagregar simplesmente pela redução de cálcio do fluido. Análises das células utilizadas nos experimentos descritos anteriormente demonstraram que células tumorais contêm cerca da metade da concentração de cálcio que as normais do mesmo tecido, sendo este, um fator importante para sua fraca adesão (para revisão ver: Oppenheimer, 2006). Outra explicação é baseada nas altas concentrações de enzimas proteolíticas de superfície encontradas em muitas células tumorais. Uma vez que a incubação de quase todos os tecidos num meio contendo proteases efetivamente os separa, excessivas concentrações de proteases podem enfraquecer a força de adesão

célula-célula. Além disso, células tumorais exibem freqüentemente glicosilação alterada na sua superfície, possivelmente resultante de níveis desregulados da atividade de glicosiltransferase (enzima que catalisa o prolongamento de cadeias de açúcar), que influenciam a glicosilação padrão de proteínas (Oppenheimer, 1969; Gus, 2002). A síntese anormal de carboidratos de superfície e níveis alterados da atividade de glicosiltransferase de superfície pode reduzir a aderência em tumores primários.

Metástase é a propagação de células tumorais para áreas não diretamente adjacentes ao tecido primário. O espalhamento pode ocorrer por invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos, por penetração das células tumorais no interior da cavidade corpórea ou espaços que circundam órgãos. Após se desprender do tumor primário, a célula tumoral pode invadir o hospedeiro e penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos. Para tanto, a célula tumoral necessita se infiltrar na membrana basal que circunda os vasos sanguíneos. A membrana basal e o tecido conectivo extracelular contêm os quatro maiores grupos de moléculas: colágeno, elastina, glicoproteína e proteoglicanos, que diferem de tecido para tecido e de membrana para membrana. Essas estruturas da membrana são organizadas por cadeias de proteína-proteína e polissacarídeo-proteína que podem ser desestabilizadas por enzimas degradativas. Os principais alvos são moléculas de colágeno; sendo sua destruição essencial para a invasão e posterior metastatização. A célula tumoral pode invadir os vasos linfáticos diretamente, ou através dos vasos sanguíneos. Podem ainda passar dos canais venosos para os linfáticos, e vice-versa, indicando a existência de uma rede veno-linfática (Fidler, 2002).

Os linfonodos regionais podem servir de barreiras iniciais à disseminação da doença metastática, mas também podem disseminá-la. A maioria das células

tumorais que entra na circulação são rapidamente eliminadas, portanto, quanto maior for a sua agregação, maior a chance de sobreviverem na corrente sanguínea. A disseminação hematogênica ocorre quando o tumor penetra na circulação sanguínea, havendo aprisionamento e adesão dos êmbolos tumorais a órgãos distantes. Então, o tumor invade a parede do vaso com extravasamento para o tecido adjacente e inicia a multiplicação. Alterações no componente molecular, tais como depósito de fibrina, agregação plaquetária e adesão ao redor do tumor, podem proteger as células da trama mecânica, auxiliando a sua captura nos leitos vasculares, protegendo o tumor da resposta imunológica do hospedeiro. A alteração da coagulação também é relatada em pacientes com câncer, tais como o aumento dos níveis de tromboplastina, o pró-coagulante A, responsável pelo fator X da coagulação, e a presença de fosfatidilserina na membrana celular. Os fatores que, dentro do vaso sanguíneo, contribuem para a morte das células tumorais que entram na circulação são: fluxo sanguíneo turbulento, macrófagos, células *natural killer*, plaquetas e óxido nítrico. Após a agregação da célula tumoral no leito capilar, há a retração do endotélio, permitindo sua passagem para o tecido extracelular. O passo seguinte é o crescimento da célula tumoral. A sua inibição ou crescimento dentro do hospedeiro depende de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, além do sítio específico das metástases (Fidler, 2002; Oppenheimer, 2006).

1.7 Câncer e Inflamação

A relação funcional entre câncer e inflamação não é recente. Em 1863, Virchow pressupôs que o câncer era originado em locais que apresentavam inflamação crônica e em parte, baseou sua hipótese no aumento da proliferação

celular que algumas classes de agentes irritantes causavam em conjunto com o dano tecidual e inflamação persistente (Balkwill e Mantovani, 2001). Apesar de estar claro que somente a proliferação celular não causa câncer, a proliferação sustentada em um meio ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e agentes causadores de dano ao DNA, em conjunto, certamente potencializam e/ou promovem riscos de ocorrência tumoral. Durante o dano tecidual, a proliferação celular é aumentada enquanto o tecido se regenera e então o agente agressor é totalmente removido ou o processo de reparo se completa. Em contraste, células em proliferação portando um dano no DNA (e/ou agressão mutagênica) continuam a proliferar em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento e/ou de sobrevivência (que dão o suporte). De certo modo, é possível considerar que tumores agem como um ferimento que falhou ao cicatrizar (Dvorak, 1986).

Peyton Rous foi o primeiro a reconhecer que tumores se desenvolvem a partir de “estados neoplásicos sublimiares” causados por carcinógenos virais ou químicos que induzem alterações somáticas (para revisão ver: Coussens e Werb, 2002). Estes estados, agora conhecidos como “iniciação”, envolvem alterações do DNA, são irreversíveis podendo persistir em tecidos normais diferentes até a ocorrência de um segundo estímulo (agora referido como “promoção”). Este segundo estímulo pode resultar da exposição das “células iniciadas” a agentes químicos irritantes, como os ésteres de forbol, ou a hormônios, irritação crônica ou inflamação. Funcionalmente, muitos promotores induzem, direta ou indiretamente, a proliferação de células e/ou recrutamento de células inflamatórias, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, causando dano oxidativo ao DNA (para revisão ver: Coussens e Werb, 2002).

Talvez a melhor evidência para o significado da inflamação durante a progressão neoplásica venha de estudos onde é avaliado o risco de câncer em pacientes que utilizam aspirinas e outros antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) por um longo período. Muitos dados indicam que o uso destas drogas reduz o risco de ocorrência do câncer de cólon em 40–50%, e pode ser preventivo contra os de pulmão, esôfago e estômago (Barron e Sandler, 2000; Garcia-Rodriguez e Huerta-Alvarez, 2001). A capacidade dos AINEs em inibir as ciclooxigenases (COX-1 e 2) é a base de seus mecanismos de prevenção. Estas drogas podem possuir forte atividade anti-metastática devido ao efeito inibitório sobre a agregação plaquetária (Coussens e Werb, 2002). Porém, os AINEs podem agir através de mecanismos diferentes à inibição enzimática da COX, uma vez que, AINEs com baixa seletividade para estas enzimas demonstram eficácia na inibição do câncer de cólon (Elder et al., 1997). Outros mecanismos têm sido propostos, incluindo indução de apoptose através da liberação do citocromo C das mitocôndrias e subsequente ativação de caspase-9 e 3, e/ou interferência com a progressão do ciclo celular, redução da ativação de carcinógenos e estimulação da “supervisão” endógena pelo sistema imune (Brigati et al., 2002). Concentrações elevadas de COX-2 são comumente encontradas em tecidos malignos (Dannenberg et al., 2001). A elevada expressão de COX-2 aparenta ser uma consequência tanto de aumento nos níveis de transcrição elevados, quanto na estabilidade do RNAm (Dixon et al., 2000; Shao et al., 2000). Oncogenes, fatores de crescimento, citocinas, quimioterapia e promotores de tumor estimulam a transcrição da COX-2 por via da proteína quinase C (PKC) e da sinalização mediada por RAS (Subbaramaiah, 1996; Zhang, 1998; Smith et al., 2000; Subbaramaiah, 2002). Agentes que interferem com microtúbulos, incluindo taxanos, induzem COX-2 por ativação de PKC e proteínas quinases

ativadas por mitógenos (MAPKs) (Zhang, 1998). Dependendo do estímulo, tipo celular, e uma variedade de fatores de transcrição, incluindo o ativador de proteína 1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B), fator nuclear de células T ativadas (NFAT), dentre outros, podem modular a transcrição da COX-2 (Smith et al., 2000; Subbaramaiah, 2002).

Em adição à descoberta de que a COX-2 comumente tem sua expressão elevada em tecidos malignos, há evidências consideráveis que relacionam a COX-2 ao desenvolvimento do câncer. Dados mais específicos que dão suporte à conexão entre COX-2 e carcinogênese são provenientes de estudos genéticos. Camundongos fêmeas geneticamente alteradas para expressar COX-2 em concentrações elevadas nas glândulas mamárias desenvolvem hiperplasia localizada, displasia mamária e tumores de mama metastáticos (Liu et al., 2001).

Estas descobertas são consistentes com a idéia de que, em algumas condições, a expressão elevada de COX-2 induz a formação de tumores. Em estudos complementares, camundongos transgênicos que expressam elevadas concentrações de COX-2 na pele, desenvolvem hiperplasia e displasia epidermal (Neufang et al., 2001). Confirmando estes estudos em animais deficientes para a COX-2, há a redução do desenvolvimento de tumores intestinais e papilomas na pele (Oshima et al., 1996; Tiano et al., 2002). A importância do metabolismo do ácido araquidônico na carcinogênese é salientada pela descoberta de que animais deficientes para a expressão de COX-1 também apresentam proteção contra a formação de tumores intestinais e de pele (Tiano et al., 2002). O tratamento com inibidores seletivos da COX-2 reduz a formação de tumores intestinais, esofágicos, de mama, pele e bexiga em animais (Kawamori et al., 1998; Jacoby et al., 2002;

Subbaramaiah e Dannenberg, 2003), que servem de base para o conceito de que, inibidores seletivos da COX-2 podem ser benéficos para a prevenção do câncer.

Inibidores seletivos da COX-2 também suprimem o crescimento e metástase de uma variedade de tumores experimentais (Williams et al., 2000; Tomozawa et al., 1999). Embora inibidores seletivos para a COX-2 comumente reduzam a taxa de crescimento de tumores estáveis, a regressão do tumor raramente é observada. Por isso, apesar de parecer improvável que estes agentes possam vir a ter sucesso como monoterapia para o tratamento do câncer, se administrados em conjunto com a terapia padrão, é provável que apresentem resultados mais expressivos. Estudos pré-clínicos demonstram que o co-tratamento com inibidores seletivos da COX-2 potencializam o efeito antitumoral de quimioterapias, radiação, bioterapias e terapias fotodinâmicas (Ferrario et al., 2002; Subbaramaiah e Dannenberg, 2003). Administrados juntos, os dados genéticos e farmacológicos fortemente indicam que a COX-2 deve ser investigada como um alvo em potencial para a prevenção e tratamento do câncer (Subbaramaiah e Dannenberg, 2003).

1.8 Wilbrandia ebracteata COGN e cucurbitacinas

Plantas têm sido utilizadas como medicamentos por milhares de anos, inicialmente em sua forma bruta, como tinturas, chás, cataplasmas, pós e outras formulações (Balick e Cox, 1997). Frequentemente são utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência no uso das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que plantas medicinais apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades

biológicas (Farnsworth et al., 1985; Simões, 2003), justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades das espécies vegetais e sua utilização na formulação de medicamentos. O maior problema para a utilização terapêutica dos fitomedicamentos, no tratamento convencional das diversas doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e a segurança. Apesar da preferência das grandes indústrias farmacêuticas pelo desenvolvimento de medicamentos sintéticos, nas últimas décadas observa-se ainda um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (para revisão ver Calixto et al., 1998; Calixto et al., 2000; Koehn e Carter, 2005). Tal fato é comprovado pela evidência de que hoje cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (para revisão ver: Koehn e Carter, 2005).

Conhecida popularmente como taiuiá, a *Wilbrandia ebracteata* Cogn (Figura 2) é uma espécie da família *Cucurbitaceae* Juss empregada na medicina popular com diferentes objetivos terapêuticos (Hoehne, 1939). Esta espécie é encontrada, predominantemente nas regiões sul e sudeste do Brasil (Porto, 1974; Matos, 1979) e suas raízes eram empregadas industrialmente na elaboração de fitoterápicos comercializados em todo o Brasil e no exterior. As raízes dessecadas de *W. ebracteata* são citadas na literatura sobre o uso popular de plantas medicinais como: laxante, anti-helmíntico, anti-reumático, em afecções da pele, como contraceptivo ou abortivo.

Do ponto de vista químico, os principais representantes do metabolismo secundário da família *Cucurbitaceae* são cucurbitacinas, saponinas triterpênicas, óleos

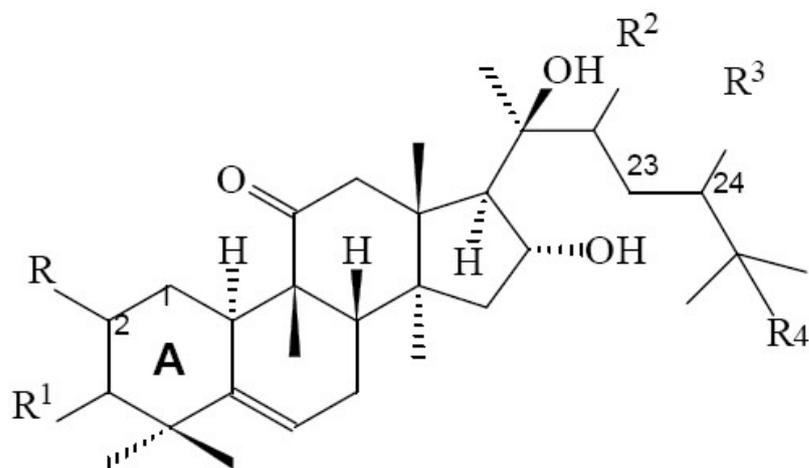
fixos contendo ácidos triênicos conjugados e aminoácidos não-proteinogênicos, além de Δ^7 -esteróides (Hegnauer, 1989; Schenkel et al., 1992). Também tem sido descrita a presença de proteínas e polipeptídeos biologicamente ativos (Hamato et al., 1995) e C-glicosilflavonóides (Bauer et al., 1985; Baranowska e Cisowski, 1995; Santos et al., 1996).

Estudos com o extrato etanólico de *Wilbrandia* sp., planta conhecida na região nordeste do Brasil como “cabeça-de-negro”, apresentou toxicidade média, semelhante à descrita posteriormente para uma fração purificada de *W.* cf. *verticillata*, com uma $DL_{50} = 1$ g/kg, quando administrada por via intraperitoneal. Essa mesma fração mostrou ainda uma baixa citotoxicidade em culturas de células KB (queratinócitos) e uma inibição em torno de 30% no crescimento tumoral do carcinosarcoma 256 (Rao et al., 1991), atividade esta também observada para o extrato hidroalcoólico, com um índice de inibição de 84% (Pessoa et al., 1994). Essa mesma fração inibiu a formação de granulomas induzidos pelo óleo de cróton, a resposta inflamatória aguda causada por carragenina e a artrite originada por formaldeído, além de reduzir a fertilidade de ratas (Teixeira et al., 1994).

Em relação ao estudo das atividades biológicas dos principais constituintes químicos dessa família, as cucurbitacinas, Miró (1995) apresenta uma revisão com uma variedade de efeitos farmacológicos, concluindo tratar-se de um grupo fitoquímico promissor para pesquisas de substâncias de interesse para a humanidade. Algumas cucurbitacinas apresentam atividade citotóxica e antitumoral (Kupchan, 1970; Lavie e Glotter, 1971; Füller et al., 1994; Dang et al., 1994; Ederly et al., 1995; Kim et al., 1997). Foram também descritas na literatura ações: laxante (Le Men et al., 1969), anti-helmíntica (Albert et al., 1970) e efeito inibidor sobre o vírus Epstein-Barr (Konoshima et al., 1995) para esses constituintes.



A atividade antiinflamatória de algumas espécies desta família tem sido atribuída às cucurbitacinas (Figura 3) (Yesilada et al., 1988; Ríos et al., 1990; Peters et al., 1997). Embora não sejam encontrados na literatura estudos específicos sobre o efeito destes compostos no sistema nervoso central (SNC), há o relato de uma ação potencializadora do efeito hipnótico de pentobarbital sódico pela cucurbitacina D (Edery et al., 1995). Para a *Ecbalium elaterium*, uma planta da família *Cucurbitaceae*, cujo suco dos frutos é preconizado para o tratamento da sinusite na região do Mediterrâneo, tem sido relatadas intoxicações fatais (Vlachos e Kanitsakis, 1994).



	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	outros
Cucurbitacinas com carbonila α,β -insaturada na cadeia lateral						
1	cucurbitacina B	\blacktriangleleft OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃ $\Delta^{23,24}$
2	cucurbitacina D	\blacktriangleleft OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OH $\Delta^{23,24}$
3	cucurbitacina E	—OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃ $\Delta^{23,24}$ $\Delta^{1,2}$
Cucurbitacinas com cadeia lateral saturada e carbonila em C-22						
5	dihidrocucurbitacina B	\blacktriangleleft OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃
6	dihidrocucurbitacina B - 2- β -D-glicosídeo	\blacktriangleleft OGlu	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃
7	dihidroisocucurbitacina B	\equiv O	\cdots OH	\equiv O	—H	—OCOCH ₃
8	dihidroisocucurbitacina B - 2- β -D-glicosídeo	\equiv O	\cdots OGlu	\equiv O	—H	—OCOCH ₃
9	dihidrocucurbitacina E	—OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃ $\Delta^{1,2}$
10	dihidrocucurbitacina E - 2- β -D-glicosídeo	—OGlu	\equiv O	\equiv O	—H	—OCOCH ₃ $\Delta^{1,2}$
11	cucurbitacina P	\blacktriangleleft OH	\blacktriangleleft OH	\equiv O	—H	—OH
12	cucurbitacina R	\blacktriangleleft OH	\equiv O	\equiv O	—H	—OH

Figura 3. Estruturas de Cucurbitacinas encontradas em *Wilbrandia ebracteata* COGN.
Fonte: Peters, 2003.

Estudos farmacológicos realizados anteriormente pelo nosso grupo demonstraram que a fração diclorometânica de *W. ebracteata* (WEDC) possui uma

potente ação antiedematogênica e analgésica. Especificamente foi observado que a WEDC causa diminuição do edema de pata induzido pela carragenina, redução da dor induzida pela formalina e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (Peters et al., 1997). Além disto, WEDC demonstrou atividade antiinflamatória através da redução da migração celular e do exudato pleural, avaliados no modelo da pleurisia. Ações estas relacionadas pelo menos em parte, com a inibição da liberação de prostaglandina E₂ (Peters et al., 1999). Nosso grupo tem observado ainda, que há a participação das vias das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase, com maior ênfase em um efeito inibitório sobre a atividade enzimática da ciclooxigenase-2, sendo estas ações responsáveis, pelo menos em parte, à atividade antiinflamatória exibida pela WEDC e dihidrocucurbitacina B (Peters et al., 2003; Siqueira et al., 2007).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar as propriedades antitumorais da dihidrocucurbitacina B (DHCB), composto isolado de *Wilbrandia ebracteata* COGN, através de ensaios *in vitro*, utilizando cultura de células de melanoma murino B16F10, bem como, ensaios *in vivo* de crescimento tumoral e formação de metástase.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da WEDC e/ou DHCB sobre a viabilidade e proliferação de células de melanoma murino B16F10 e fibroblastos NIH3T3;
- b) Avaliar os efeitos de fármacos antiinflamatórios não esteroidais sobre a viabilidade e proliferação celular, a fim de comparar o perfil exibido pelos produtos derivados de *W. ebracteata*, bem como observar se há expressão da enzima COX-2 nas condições experimentais avaliadas;
- c) Avaliar a influência da DHCB derivada de *W. ebracteta* sobre a expressão de proteínas implicadas na progressão do ciclo celular;
- d) Avaliar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo, na presença ou ausência de DHCB;
- e) Investigar, também por citometria de fluxo, se DHCB induz apoptose em células de melanoma murino B16F10;
- f) Avaliar possíveis alterações no citoesqueleto e a formação de pontos de adesão focal decorrentes da incubação de células B16F10 com DHCB;
- g) Investigar o potencial terapêutico da DHCB *in vivo*, administrada por via oral, sobre o crescimento tumoral e formação de metástases decorrentes da inoculação de células B16F10.

3. Materiais e Métodos

3.1 Procedimentos de extração e isolamento:

O material botânico foi coletado em setembro de 2004 (período de floração) na cidade de Siderópolis - Santa Catarina, Brasil. Amostras foram depositadas no herbário da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis), sob o número FLOR 34410.

Para o desenvolvimento deste trabalho, raízes de *W. ebracteata*, foram desidratadas, trituradas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi então concentrado, sendo ressuspenso em água e após, sucessivamente extraído com éter de petróleo e diclorometano. A partir da fração diclorometânica (WEDC), foi isolada a dihidrocucurbitacina B (DHCB, composto majoritário), através de cromatografia em coluna de sílica gel (0,05 – 0,20 mm) e solução de éter de petróleo / acetato de etila (1:2) como eluente. Em seguida, foi utilizada outra coluna de sílica gel (0,04 – 0,063 mm) com éter de petróleo / acetato de etila / isopropanol (20:10:0,8), como eluente, com o objetivo de purificar a DHCB isolada. A identidade do composto foi confirmada por cromatografia de camada delgada, HPLC (*High performance liquid chromatography*) e espectroscopia de ultravioleta em comparação com amostra padrão. Utilizando este método foi possível obter DHCB B (Figura 4) com teor de pureza de aproximadamente 92 % (Farias et al, 1993). Todos os ensaios fitoquímicos foram realizados pela equipe da Profa. Dra. Marení Rocha Farias, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

Células de melanoma da linhagem B16F10 ou fibroblastos NIH3T3 foram semeadas na concentração de 2.5×10^3 células/mL em placas de cultura de 96 poços, contendo meio de cultura DMEM. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo concentrações crescentes de WEDC, DHCB, Indometacina ou Naproxeno. Após 48 h, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS (100 μ L/poço). Um novo meio de cultura foi adicionado, desta vez contendo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolil; 0,5 mg/mL) e incubado por 3 horas à 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO₂. Decorrido este período, o meio foi novamente retirado, sendo adicionado 200 μ L de DMSO, para dissolver os cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. As placas foram então avaliadas por meio de um leitor de Elisa, a 540 nm, para estabelecer a relação linear do número médio de células por poço no ensaio do MTT (adaptado de Mosman, 1983). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.1 Viabilidade celular por imunofluorescência (LIVE/DEAD)

Células de fibroblasto murino NIH3T3 foram semeadas na concentração de 25×10^3 células/mL em placas de cultura de 24 poços, contendo meio de cultura DMEM. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo concentrações crescentes de Dihidrocucurbitacina B e após 48 h de incubação foi adicionado a cada poço, 5 μ L de SYBR 14 (300 nM; marcação para células intactas - cor verde) e foi incubado por 10 min 37 °C, sendo após, adicionado 5 μ L de iodeto de propídio (12 μ M; marcação para células mortas – cor vermelha) e incubado por mais 10 min. Decorrido este período, a placa foi levada ao microscópio

de fluorescência para a visualizar as células viáveis (marcadas em verde)/mortas (vermelho). As imagens foram captadas com objetiva de 10x.

3.4 Ensaio de proliferação celular

Células de melanoma da linhagem B16F10 e fibroblastos NIH3T3, não sincronizadas, foram semeadas na concentração de 25×10^3 células/mL em placas de cultura de 24 poços, contendo meio de cultura DMEM. Após 24 horas de incubação, foram adicionadas diferentes concentrações de WEDC, DHCB, Indometacina, Naproxeno ou Citocalasina D, juntamente com [metil- ^3H]-timidina ($2 \mu\text{Ci/mL}$). Após 48 h, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS (1 mL/poço) e uma vez com ácido tricloroacético (TCA, 10%). As células foram então fixadas com solução de éter:etanol (1:3) e deixadas à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido este período, foi adicionado $600 \mu\text{L/poço}$ de hidróxido de sódio (0,2 N) sendo a radioatividade incorporada verificada por medidor de cintilação.

3.5 Análises de microscopia em tempo real (time lapse)

Neste experimento, células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, foi adicionado DHCB $10 \mu\text{g/mL}$ ou veículo e imediatamente levadas para câmara umidificada em acrílico (5 % CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$) acoplada ao microscópio óptico. As placas foram posicionadas e o equipamento foi configurado para captar 1 imagem a cada 30 min (veículo) ou a cada 10 min (DHCB), sempre no mesmo

ponto, durante 48 h. Ao final do experimento as imagens obtidas com objetiva de 20x foram agrupadas, o que permitiu a observação da dinâmica e da morfologia celular.

3.6 Avaliação de proteínas que participam da modulação do ciclo celular.

Para este experimento, as células da linhagem B16F10 foram plaqueadas e 24 horas após, tratadas com 10 µg/mL de DHCB e incubadas por vários intervalos de tempo (0, 4, 8, 16, 24, 36 e 48 horas), sendo então lisadas e as amostras separadas em gel vertical para a avaliação da expressão de proteínas participantes do ciclo celular. Foram avaliadas as proteínas p-ERK-1/2, p-AKT, ciclinas -A, -B, -D1/D2, -E, cdk-1 cdk-2, E2F-1, E2F-4 e actina.

3.6.1 Protocolo para extratos celulares:

Após cada intervalo de incubação, as amostras foram obtidas pela lise das células B16F10 por meio de em solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), Triton X-100 (1%), NaCl (100 mM), EDTA (5 mM, pH 8.0), β-glicerolfosfato (40 mM), NaF (50 mM), ortovanadato de sódio (200 µM), Glicerol (5%) e inibidores de protease (PMSF, Leupetina, Aprotinina e Pepstatina). Proteínas (35 µg) a partir das amostras obtidas com as células lisadas e o marcador de peso molecular (BioRad) foram separados por gel SDS-PAGE (10%) e transferidas por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (Amersham-Pharmacia Biotechnology). Em seguida, foi feito o bloqueio com solução de PBS contendo leite em pó desnatado (5%) e Tween 20 (0,05%) por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram

então incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpos primários específicos para cada proteína diluídos em solução de bloqueio, e após, incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (monoclonais ou policlonais, 1:1000) por 1 h. Os *blots* foram visualizados utilizando o sistema ECL (Perkin Elmer). As quantidades proteínicas por amostra foram dosadas através do método de BCA (Lowry modificado) com BSA como padrão (Boucher et al., 2004).

3.7 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Células B16F10, não sincronizadas, foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 horas, DHCB (10 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,01 %) foi adicionado e incubado em estufa de CO₂ por 0, 4, 8, 16, 24 e 48 h. Decorridos os períodos de incubação, as células foram cuidadosamente coletadas, permeabilizadas com tampão H (Triton X-100 0,05 % - levemente hipertônico: 20 mM HEPES pH=7,2; 0,16 M NaCl; 1 mM EGTA), fixadas com a adição de paraformaldeído 2% frio e ressuspensas em tampão H contendo 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI) e 200 µg/mL de RNase A. Após 30 minutos em temperatura ambiente as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo (FACSCAN - Becton-Dickinson, 488 nm) para análise. Os dados foram analisados utilizando o software *CellQuest*[®] e a porcentagem de células agrupadas em cada estágio foi determinada (M1 = células em G1; M2= células em S; M3 = Células em G2/M; M4 = indicativo de poliploidia).

3.8 Avaliação de Apoptose por citometria de Fluxo (Incorporação de Anexina V-FITC)

Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 h, DHCB 10 µg/ml ou veículo (DMSO 0.01%) foi adicionado. Decorrido o intervalo de 48 h de incubação, o sobrenadante foi coletado (para verificar também células em suspensão) e logo após, as células aderidas foram cuidadosamente coletadas por tripsinização. As duas soluções (sobrenadante e células tripsinizadas) foram centrifugadas, ressuspensas e combinadas para posterior coloração com Anexina V-FITC e iodeto de propídio e análise em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o software *CellQuest*[®] e a porcentagem de células agrupadas em cada estágio (células viáveis – abaixo à esquerda; em apoptose – abaixo à direita; ou em necrose – acima à direita) foi determinada.

3.9 Avaliação do citoesqueleto e pontos de adesão focal por imunofluorescência:

Para estes experimentos foram utilizadas placas de 6 poços onde, lâminas circulares de vidro estéreis e tratadas com poli-L-lisina por (1 h, 37 °C) foram adicionadas a cada poço. Em seguida, células de melanoma murino B16F10 foram plaqueadas sobre as lâminas e deixadas em incubação por 24 horas, para a completa adesão. Após este período, o meio foi retirado e adicionado um novo meio de cultura contendo DHCB (10 µg/mL) ou veículo e novamente incubados por 24 e 48 horas. Após incubação com o composto, o meio foi removido e a lâmina contendo as células foi fixada em formaldeído 3,7 % por 30 min a 4°C, e depois permeabilizada com triton X-100 (0,05 % em PBS) por 30 min a 4 °C. Em seguida as

lâminas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com solução de rodamina/faloidina para a coloração das fibras de actina, Hoeschst 33342 para a coloração do núcleo e quando necessário, com anti-paxilina e anticorpo secundário (FITC) para a marcação dos pontos de adesão focal, sendo avaliadas com auxílio de microscópio de fluorescência.

3.10 Ensaios biológicos *in vivo*

3.10.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL6, machos, com idade entre 1,5 e 3 meses, pesando em média 20 – 30 g. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia (Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais), CCB, UFSC, alojados em gaiolas plásticas, em temperatura ambiente controlada (22 ± 1 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo número PP00016/CEUA.

3.10.2 Influência sobre crescimento tumoral

Células de melanoma da linhagem B16F10 foram inoculadas no dia zero (1×10^6 células; volume = 100 μ L/animal) por via subcutânea no dorso de camundongos C57BL6 machos (n = 7 – 9 animais), de seis semanas de idade. Os animais foram tratados por via oral (gavagem), com dose diária de DHCB (1, 3 e 10 mg/kg) ou veículo, durante 12 dias, iniciando quando os tumores se tornaram palpáveis. Ao final do experimento, tamanho dos tumores foi medido com auxílio de paquímetro

digital e após foram removidos para a obtenção do peso. O volume foi calculado de acordo com a fórmula (12º dia): volume do tumor (mm^3) = largura² x comprimento x 0,52 (Lee et al., 2003).

3.10.3 Ensaio de metástase

Os animais (n = 7 – 9) foram inoculados com 1×10^6 células de melanoma B16F10 em 0,1 mL através de injeção endovenosa. Os animais foram tratados por via oral com DHCB (1 ou 10 mg/kg), com dose diária com início no dia 0 (dia da inoculação) até o 12º dia experimental. Ao fim do experimento, os animais foram então sacrificados em câmara de CO₂ e o pulmão removido e fixado em solução de Bouin. Os nódulos visíveis (pontos negros) foram enumerados e comparados aos dos grupos controle.

3.11 Drogas e Reagentes

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Iodeto de propídio, Hoechst 33342 e outros reagentes utilizados nas análises de *immunoblot* foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RNase e Rodamina-Faloidina (Molecular Probes/Invitrogen). Anticorpos primários para a detecção de: ciclina-E (M-20), ciclina-A (H-432), ciclina-B1 (H-433), cdk-1 (17), cdk2- (M2), p27^{Kip1} (C-19), actina (c-2) e demais anticorpos (*Santa Cruz Biotechnologies* - Santa Cruz, CA, USA). Anticorpos secundários utilizados nas análises de *immunoblot*, Timidina triciada (*[methyl-³H]-thymidine*), membranas de nitrocelulose (Hybond™-ECL™) e hiperfilmes (ECL™) foram obtidos da Amersham-Pharmacia (Oakville, ON, Canada). Reagente de ECL™ para a detecção por *immunoblot* obtidos da PerkinElmer (USA).

Todos os outros reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich. Dihidrocucurbitacina B foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração final do solvente não ultrapassou 0,1% para os ensaios *in vitro* e 1% para os ensaios *in vivo*.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

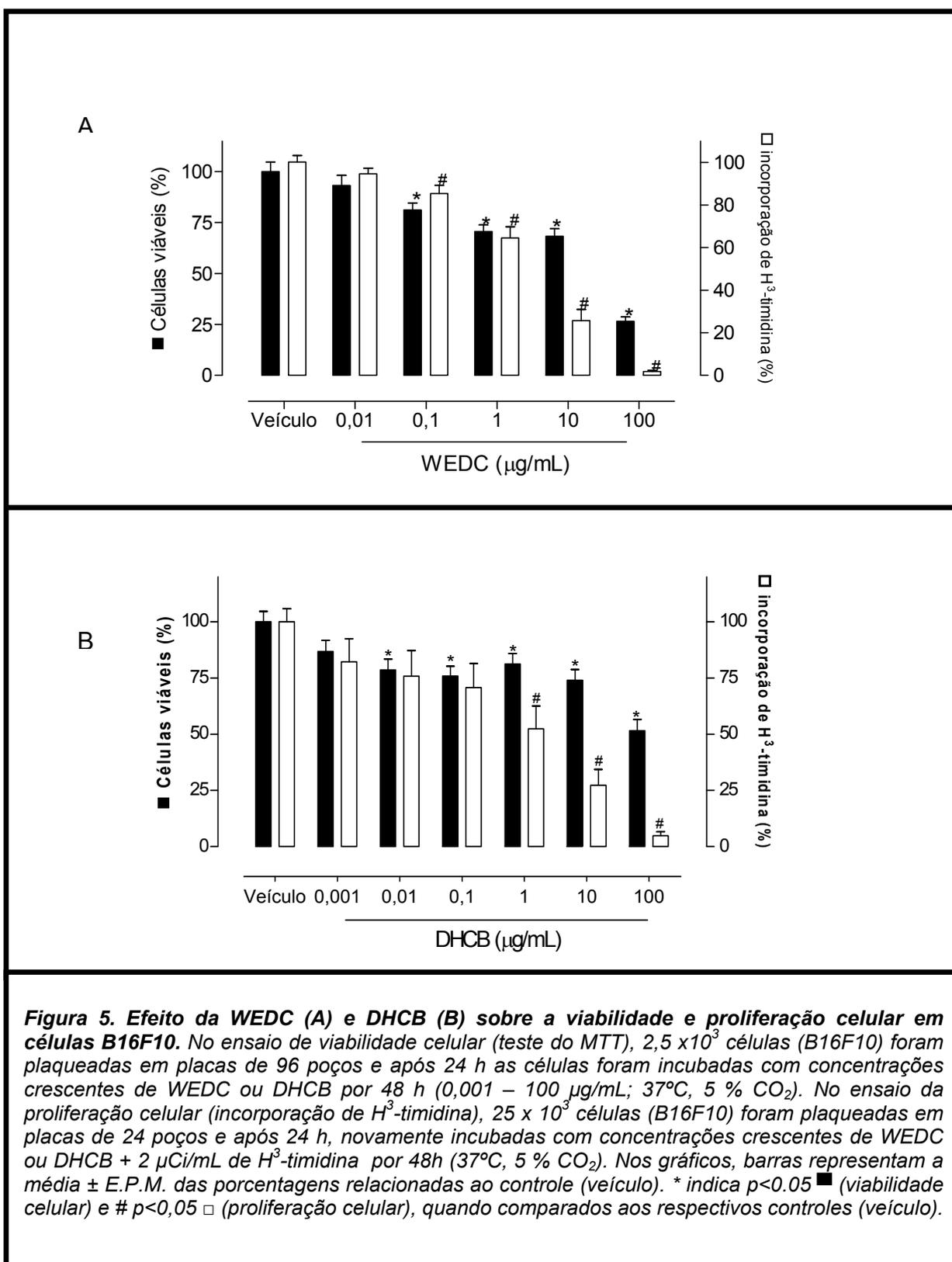
4. Resultados

4.1 Efeito sobre a viabilidade e proliferação celular:

4.1.1 Efeito da Fração diclorometânica (WEDC) e dihidrocucurbitacina B (DHCB) sobre células de melanoma murino B16F10:

Para investigar o efeito do tratamento com WEDC e DHCB sobre a viabilidade e proliferação celular foram utilizados os ensaios do MTT e incorporação de timidina triciada. Nesta série de experimentos, a incubação das células com concentrações crescentes de WEDC, por 48 horas, reduziu significativamente a viabilidade celular em até 73,5 % (29,4; 31,7 e 73,5 %, para 1, 10 e 100 µg/mL, respectivamente); enquanto que concentrações crescentes de DHCB foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular em até 48,4 % (18,7; 26 e 48,4 %, para 1, 10 e 100 µg/mL), quando comparados aos controles (veículo). Quanto à proliferação, concentrações crescentes de WEDC foram capazes de reduzir a incorporação de timidina triciada em até 98,2 % (35,6; 74,3 e 98,2 % para 1, 10 e 100 µg/mL, respectivamente), enquanto que DHCB reduziu a taxa de proliferação celular, após incubação de 48 h, em até 95,2 % (47,6; 72,7 e 95,2 % para 1, 10 e 100 µg/mL), quando comparadas aos controles (Figuras 5A e B).

Estes resultados sugerem que tanto WEDC quanto DHCB, reduzem a viabilidade e proliferação celular. Porém quando comparado ao composto isolado, WEDC apresenta maior citotoxicidade (efeito máximo para WEDC 73,5% contra 48,4% para DHCB, observados no teste do MTT). Este fato pode estar relacionado à constituição da fração diclorometânica de *W. ebracteata*, que possui a DHCB como composto majoritário e outras cucurbitacinas, como por exemplo a cucurbitacina B, descrita por sua elevada toxicidade.



4.1.2 Efeito da dihidrocucurbitacina B (DHCB) sobre células de fibroblasto murino NIH3T3:

Para investigar o efeito da adição de DHCB sobre a viabilidade e proliferação de células NIH3T3, foram utilizados os ensaios do MTT e incorporação de timidina triciada. Nesta série de experimentos, a incubação das células com concentrações crescentes de DHCB, por 48 horas reduziu significativamente a viabilidade celular em até 88,7% (83,0 e 88,7 %; para 10 e 100 µg/mL, respectivamente) e a proliferação em até 91,6% (85,37 e 91,6 %; para 10 e 100 µg/mL, respectivamente), quando comparados aos controles (Figura 6). Entretanto havia muitas células em suspensão nos poços que receberam DHCB 10 e 100 µg/mL. Foi verificada então a viabilidade celular desta vez por fluorescência, onde foi observado que a maioria das células estava viável e formando aglomerados (Figura 7). Estes resultados sugerem que, para esta linhagem celular, DHCB a partir de 10 µg/mL interfere na adesão das células NIH3T3 promovendo seu “descolamento” sem, contudo alterar de maneira expressiva, a sua viabilidade.

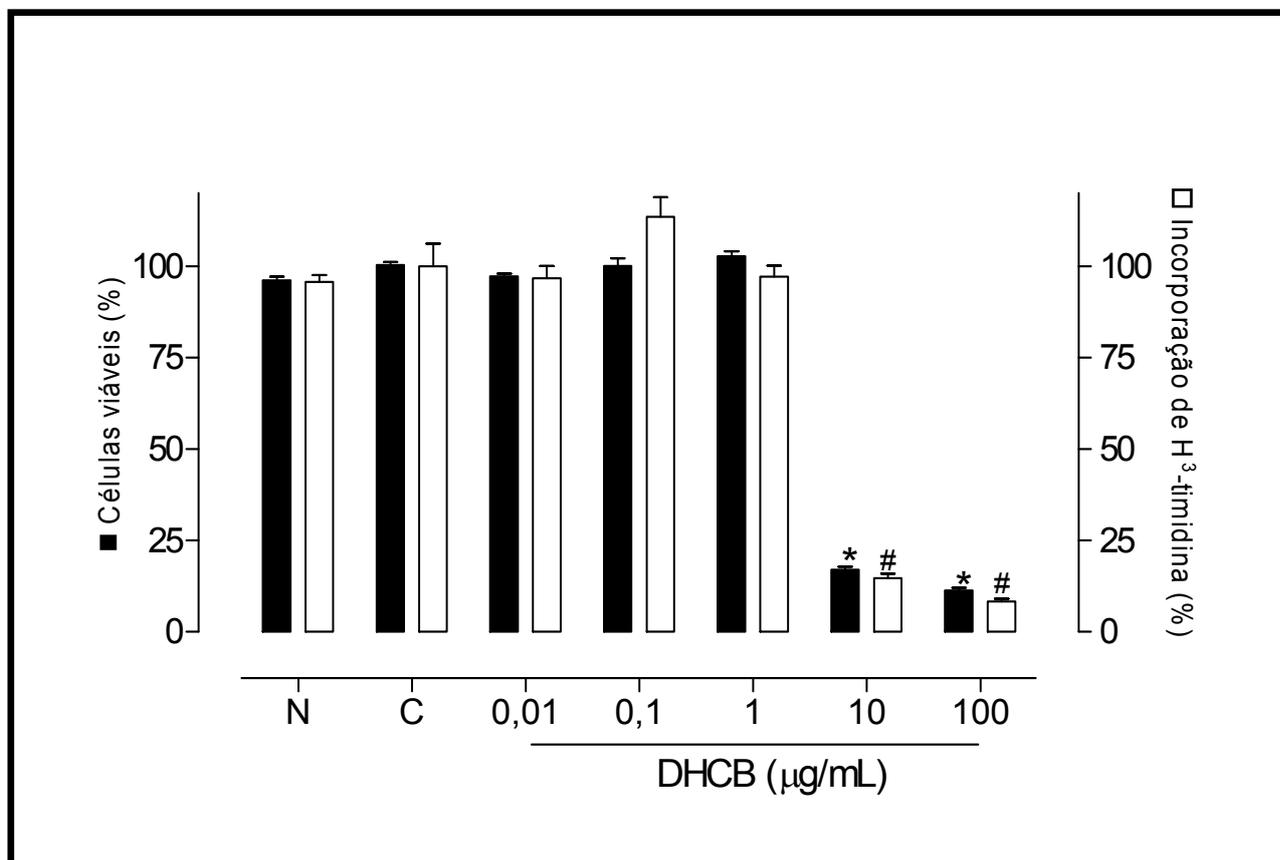
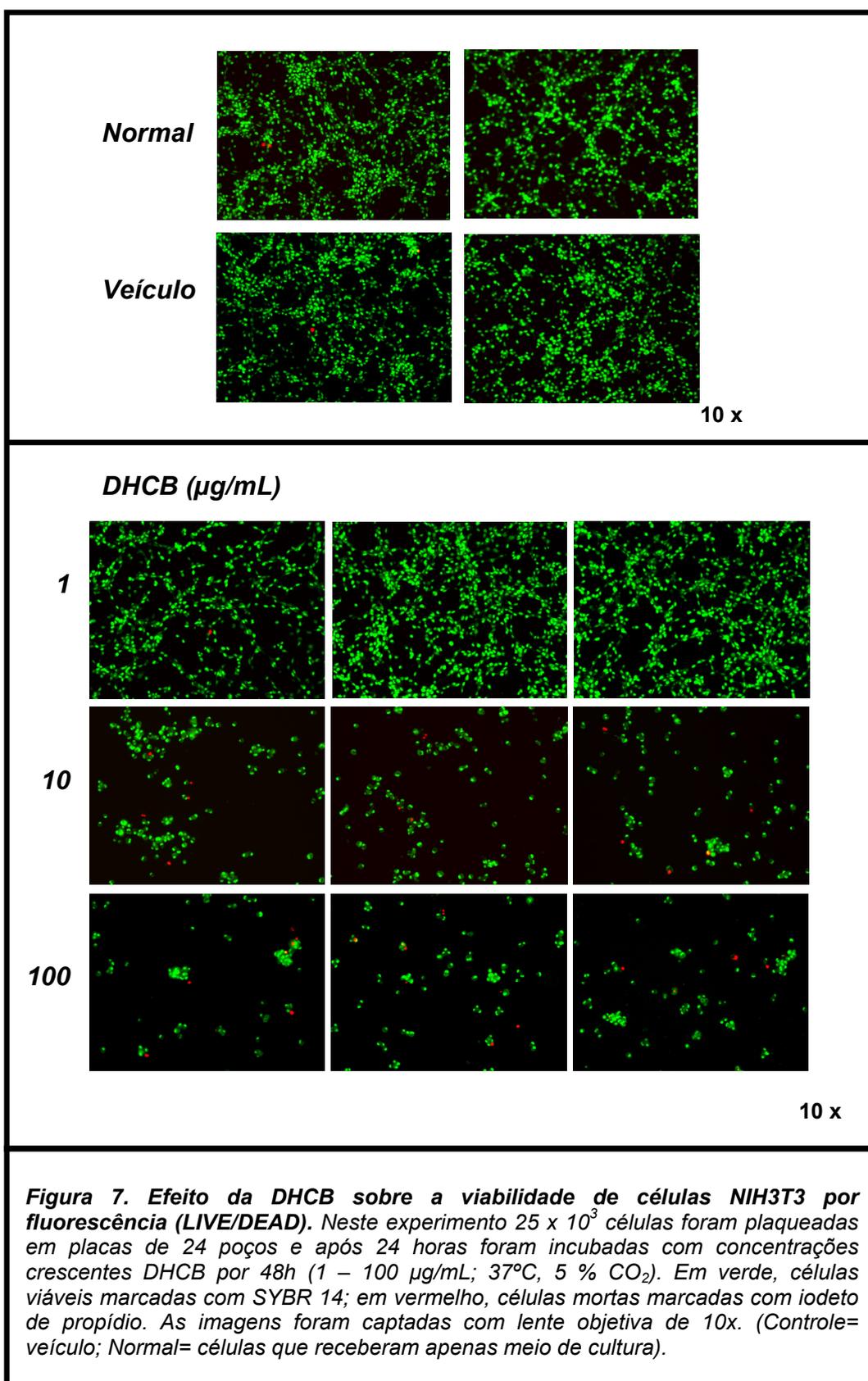


Figura 6. Efeito da DHCB sobre a viabilidade e proliferação em células NIH3T3. Efeito de concentrações crescentes de DHCB (0,01 – 100 µg/mL) sobre a viabilidade e proliferação de células de fibroblasto murino NIH3T3. No ensaio de viabilidade (teste do MTT), $2,5 \times 10^3$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 h, as células foram incubadas com concentrações crescentes DHCB por 48 h (37°C, 5 % CO₂). No ensaio da proliferação celular (incorporação de H³-timidina), 25×10^3 células (NIH3T3) foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 h, novamente incubadas com concentrações crescentes DHCB + 2 µCi/mL de H³-timidina por 48h (37°C, 5 % CO₂). Nos gráficos, barras representam a média ± E.P.M. das porcentagens relacionadas ao controle (veículo). * indica $p < 0,05$ ■; # $p < 0,05$ □, quando comparados ao veículo (C= controle), (N= células que receberam apenas meio de cultura).



4.1.3 Antiinflamatórios não-esteroidais e expressão da enzima COX-2

Como demonstrado em trabalhos anteriores, DHCB inibe a atividade da enzima COX-2, sendo este, pelo menos em parte, o mecanismo da sua atividade antiinflamatória. Como continuidade deste trabalho, investigamos se o efeito do tratamento observado com os produtos de *W. ebracteata* sobre a viabilidade e proliferação celular seriam decorrentes de interferência sobre a enzima COX-2. Para tal, as mesmas condições experimentais foram aplicadas, desta vez na presença dos inibidores Indometacina (IC50 para a COX-2 = 24,6 μ M) e Naproxeno (IC50 para a COX-2 = 28,4 μ M), a fim de observar se apresentariam o mesmo perfil exibido pela WEDC e DHCB. Os resultados demonstraram que apenas na concentração mais elevada (150 e 200 μ M, para Indometacina e Naproxeno, respectivamente) houve redução importante na viabilidade e proliferação celular, podendo estar relacionados a efeitos independentes à inibição da COX-2 (Figuras 8A e B). Como complemento, observamos ainda que, em condições basais, as células B16F10 não expressam a enzima COX-2 (Figura 8C). Os resultados obtidos até então, sugerem que os produtos derivados de *W. ebracteata* apresentam efeito inibitório sobre células tumorais e ainda, são independentes da atividade sobre COX-2, podendo interferir com eventos que conduzem a progressão do ciclo celular.

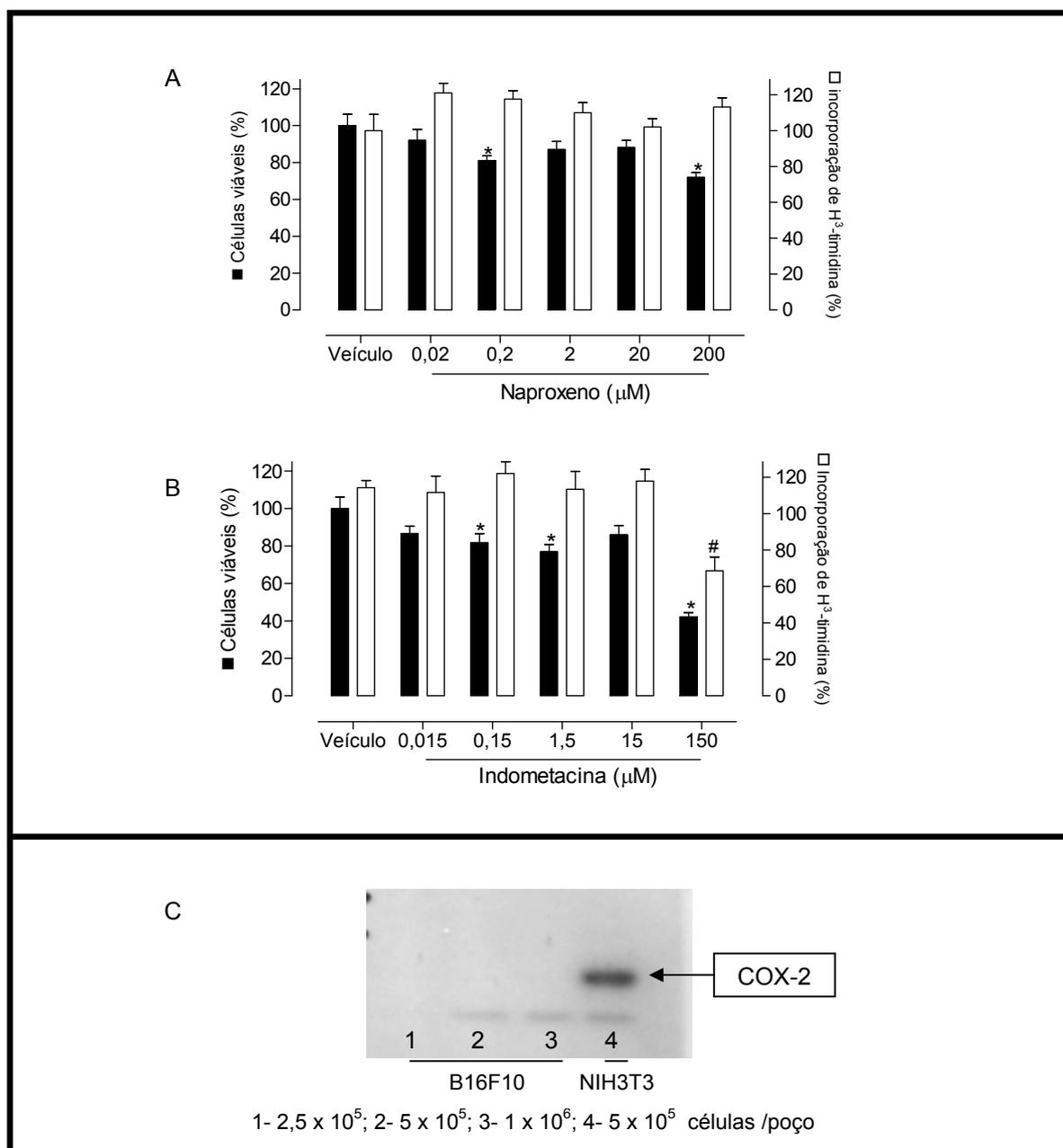


Figura 8. Efeito de AINEs sobre a viabilidade e proliferação celular. Expressão basal da COX-2 em células B16F10. No ensaio de viabilidade (teste do MTT), $2,5 \times 10^3$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 h, as células foram incubadas com concentrações crescentes dos compostos por 48 h (37°C , 5 % CO_2). No ensaio da proliferação celular (incorporação de H^3 -timidina), 25×10^3 células foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 h, novamente incubadas com concentrações crescentes dos compostos + 2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de H^3 -timidina por 48h (37°C , 5 % CO_2). Em (A), efeito da adição de Naproxeno (0,02 – 200 μM); Em (B) efeito da adição de Indometacina (0,015 – 150 μM). Para todos os gráficos, barras representam a média \pm E.P.M. das porcentagens relacionadas ao controle (veículo). * indica $p < 0,05$ ■; # $p < 0,05$ □, quando comparados ao veículo (controle). (C) Análise por Western blot da expressão da enzima COX-2, em condições basais e diferentes quantidades de células B16F10. Células B16F10 foram plaqueadas em diferentes quantidades ($2,5 \times 10^5$, 5×10^5 e 1×10^6 células) e após 24 horas, as células foram coletadas, lisadas e as amostras separadas em gel de acrilamida. NIH3T3 utilizada como controle.

4.2 Análise da dinâmica e morfologia de células B16F10 por microscopia óptica em tempo real:

Neste experimento, as imagens foram capturadas a cada 30 minutos para as células que receberam veículo e a cada 10 minutos para as células que receberam DHCB, durante 48 horas, sempre no mesmo ponto. Ao final, pôde-se observar a dinâmica e morfologia das células mantidas em cultura. Os resultados demonstraram que a adição de DHCB (10 µg/mL) promoveu alterações morfológicas, tornando as células mais arredondadas (fato observado a partir de poucas horas de incubação), durando até aproximadamente 24 horas, onde as células recomeçam a adquirir a morfologia normal. Outro fato marcante observado nas células incubadas com DHCB foi a inibição da sua motilidade quando comparada àquela de células que receberam veículo. Na figura 9, estão apresentadas imagens referentes às células expostas ou não ao tratamento com DHCB nos intervalos de 0, 8, 16, 24 e 48 h.

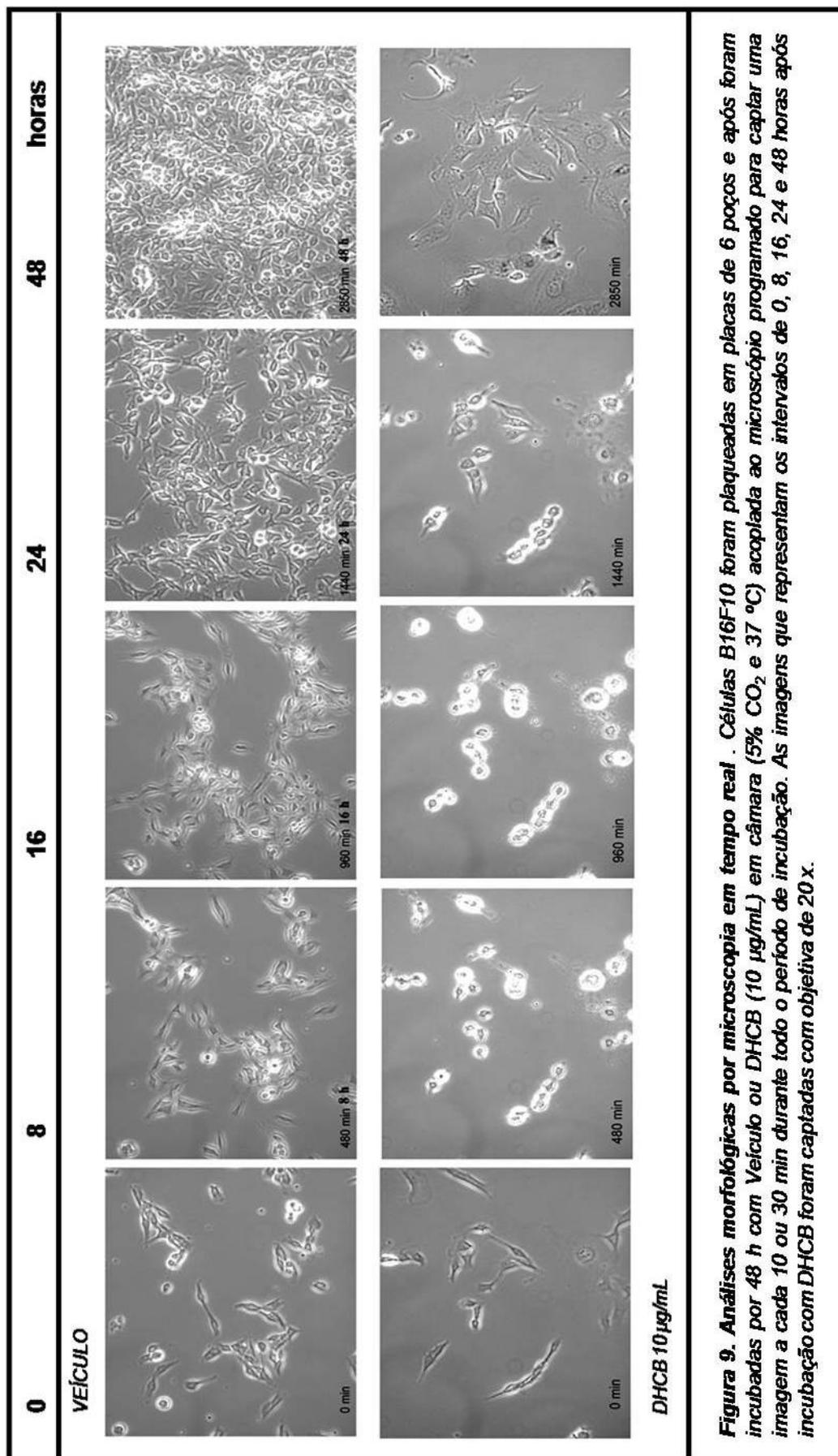


Figura 9. Análises morfológicas por microscopia em tempo real . Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após foram incubadas por 48 h com Veículo ou DHCB (10 µg/mL) em câmara (5% CO₂ e 37 °C) acoplada ao microscópio programado para captar uma imagem a cada 10 ou 30 min durante todo o período de incubação. As imagens que representam os intervalos de 0, 8, 16, 24 e 48 horas após incubação com DHCB foram captadas com objetiva de 20 x.

4.3 Efeito da dihidrocucurbitacina B sobre o ciclo celular e apoptose avaliados por citometria de fluxo:

Nesta série de experimentos, células B16F10 foram marcadas com iodeto de propídio para a obtenção da estimativa da distribuição das células nas fases do ciclo celular. Para tal, as porcentagens de células agrupadas em cada estágio (M1= células em G1; M3= células em G2/M) foram determinadas e revelaram que após adição de DHCB, as células tendem a permanecer em G2/M, pelo menos até 24 h (Figuras 10A, B e C). No intervalo de 48 horas, houve importante alteração, sugerindo a presença de células poliplóides (M4= poliplioidia), que teve seu início em 8 horas (indicado pelas setas; Figura 10C). A ocorrência de apoptose foi verificada pelo ensaio da incorporação de Anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os resultados demonstraram (Figura 11) que a adição de DHCB aumenta o número de células em apoptose para 6,8% (abaixo direita) e necrose para 10,37% (acima direita). Apesar disto, a população de células viáveis foi de 81,8% (abaixo esquerda), corroborando os resultados obtidos no ensaio de viabilidade no teste do MTT.

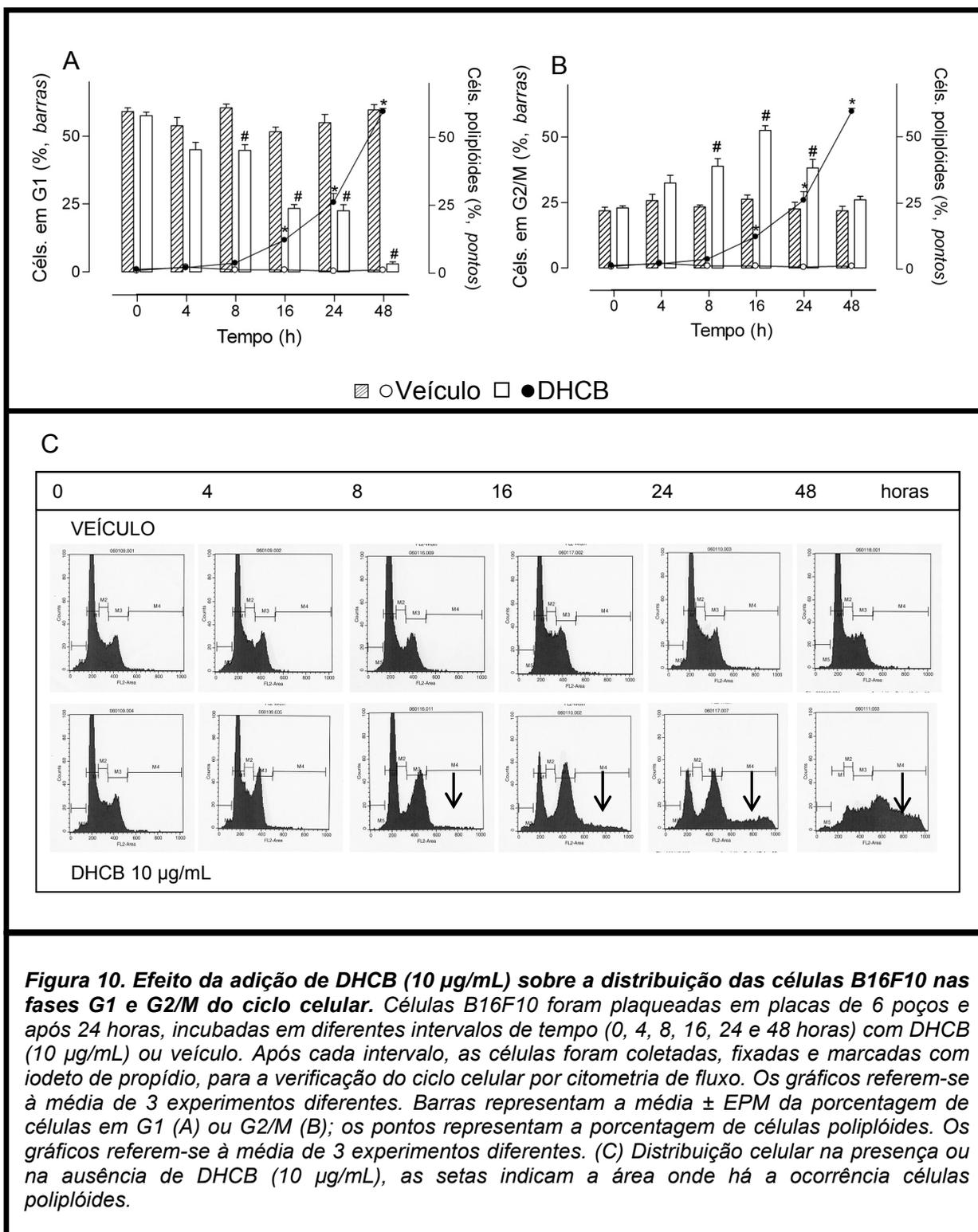
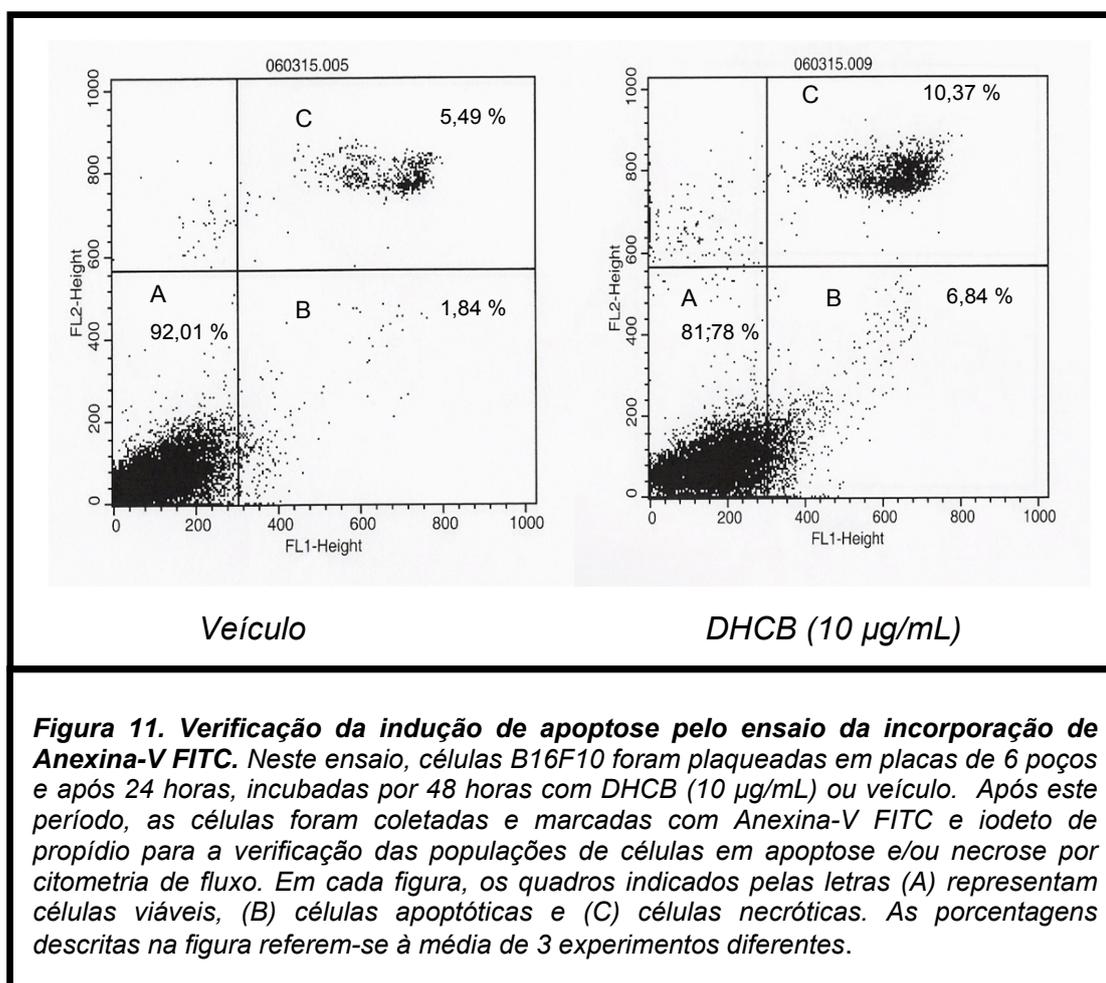


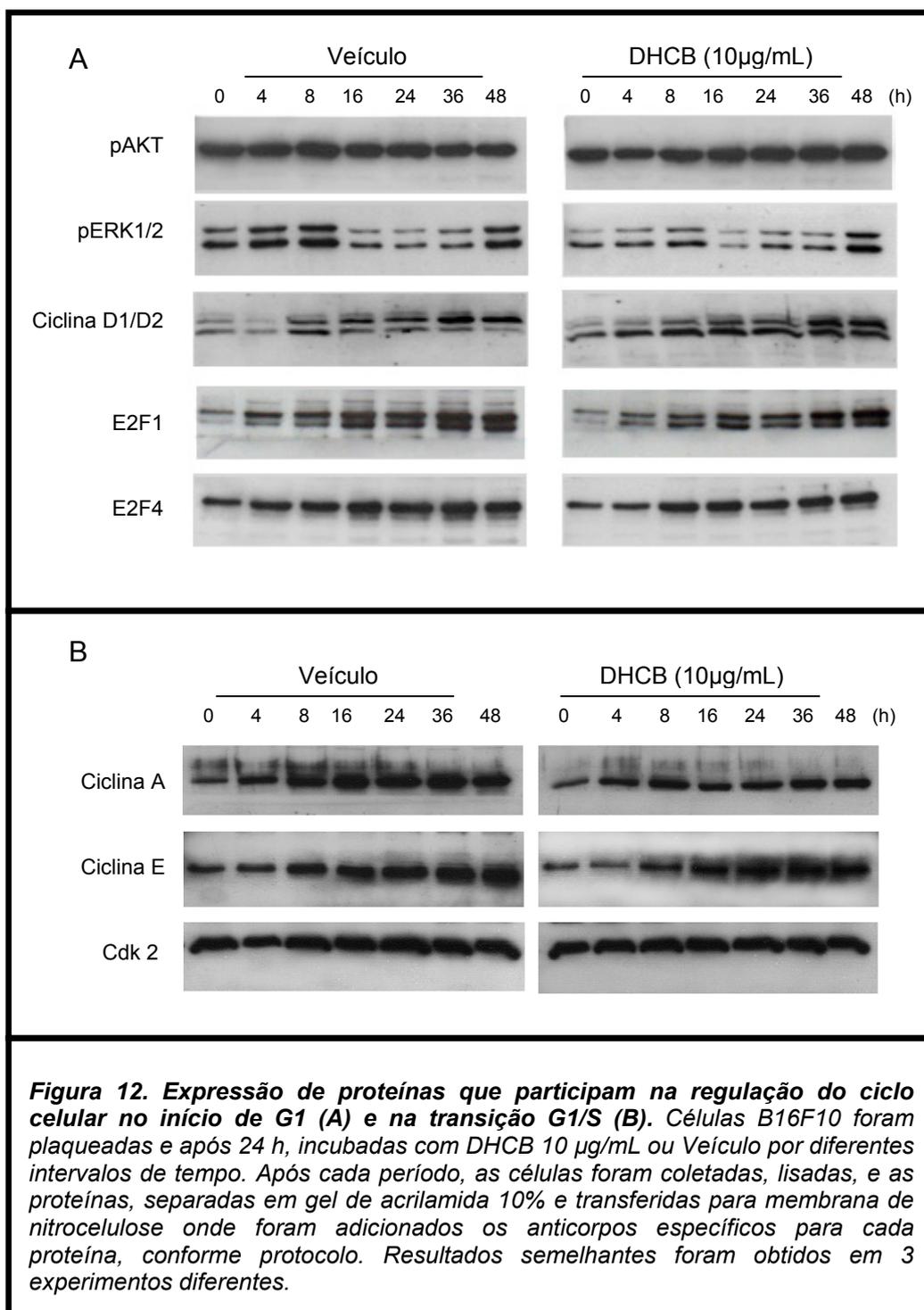
Figura 10. Efeito da adição de DHCB (10 µg/mL) sobre a distribuição das células B16F10 nas fases G1 e G2/M do ciclo celular. Células B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 24 horas, incubadas em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 8, 16, 24 e 48 horas) com DHCB (10 µg/mL) ou veículo. Após cada intervalo, as células foram coletadas, fixadas e marcadas com iodeto de propídio, para a verificação do ciclo celular por citometria de fluxo. Os gráficos referem-se à média de 3 experimentos diferentes. Barras representam a média ± EPM da porcentagem de células em G1 (A) ou G2/M (B); os pontos representam a porcentagem de células poliplóides. Os gráficos referem-se à média de 3 experimentos diferentes. (C) Distribuição celular na presença ou na ausência de DHCB (10 µg/mL), as setas indicam a área onde há a ocorrência células poliplóides.

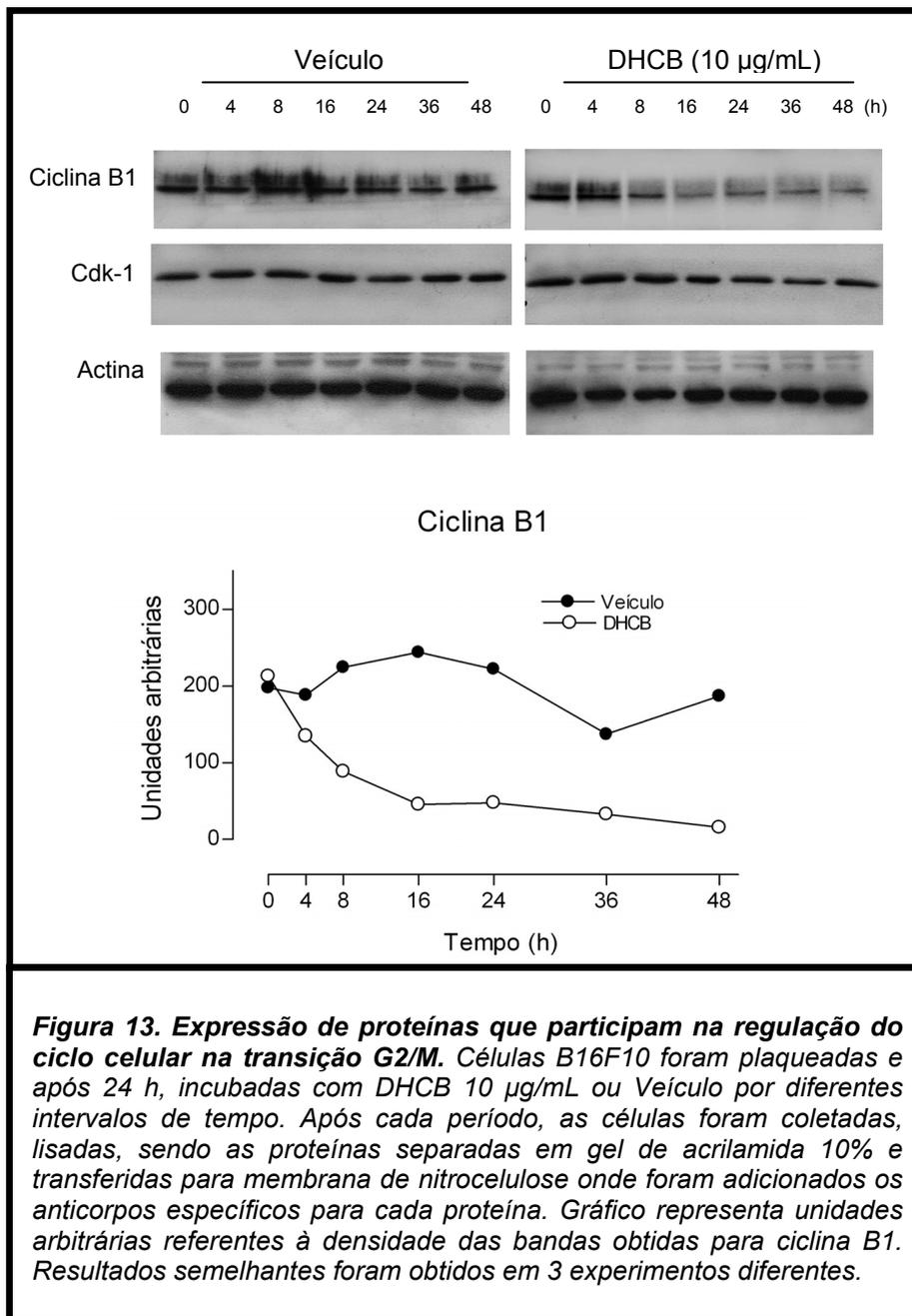


4.4 Efeito da dihidrocucurbitacina B sobre a expressão de proteínas que participam na regulação do ciclo celular:

Para este experimento, procuramos avaliar se DHCB poderia estar interferindo com a expressão de proteínas que participam do controle da proliferação celular. Para tal, observamos a expressão dos principais reguladores do ciclo celular nas diferentes fases. Nossos resultados demonstraram que DHCB não foi capaz de interferir significativamente na expressão das proteínas que participam da regulação do ciclo no início de G1 (Figura 12A). Quando observamos a expressão de ciclinas que participam da transição G1/S os resultados demonstraram leve redução na expressão de ciclina A (Figura 12B); por outro lado, a expressão da ciclina B1, que atua na transição G2/M, apresentou-se reduzida, a partir de 8 horas de incubação, permanecendo até o final do experimento (48 horas), quando comparadas ao controle (Figura 13).

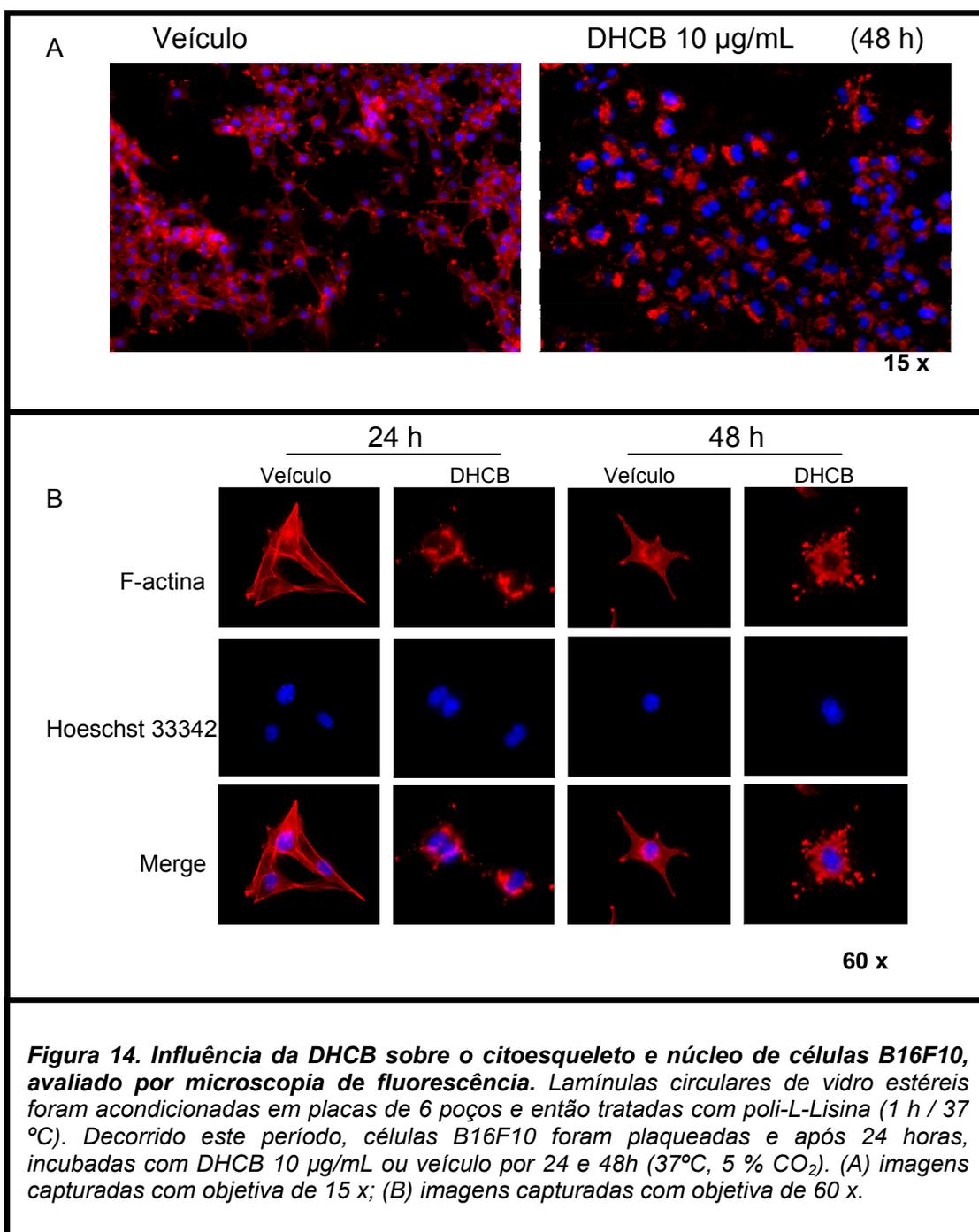
Estes resultados sugerem que a DHCB pode interferir no ciclo celular, promovendo um atraso na transição de G2/M e na saída de M, uma vez que a atividade do complexo ciclina B1/cdk1, necessária para a progressão nestas etapas do ciclo celular, se encontrou prejudicada devido à redução na expressão da ciclina B1.

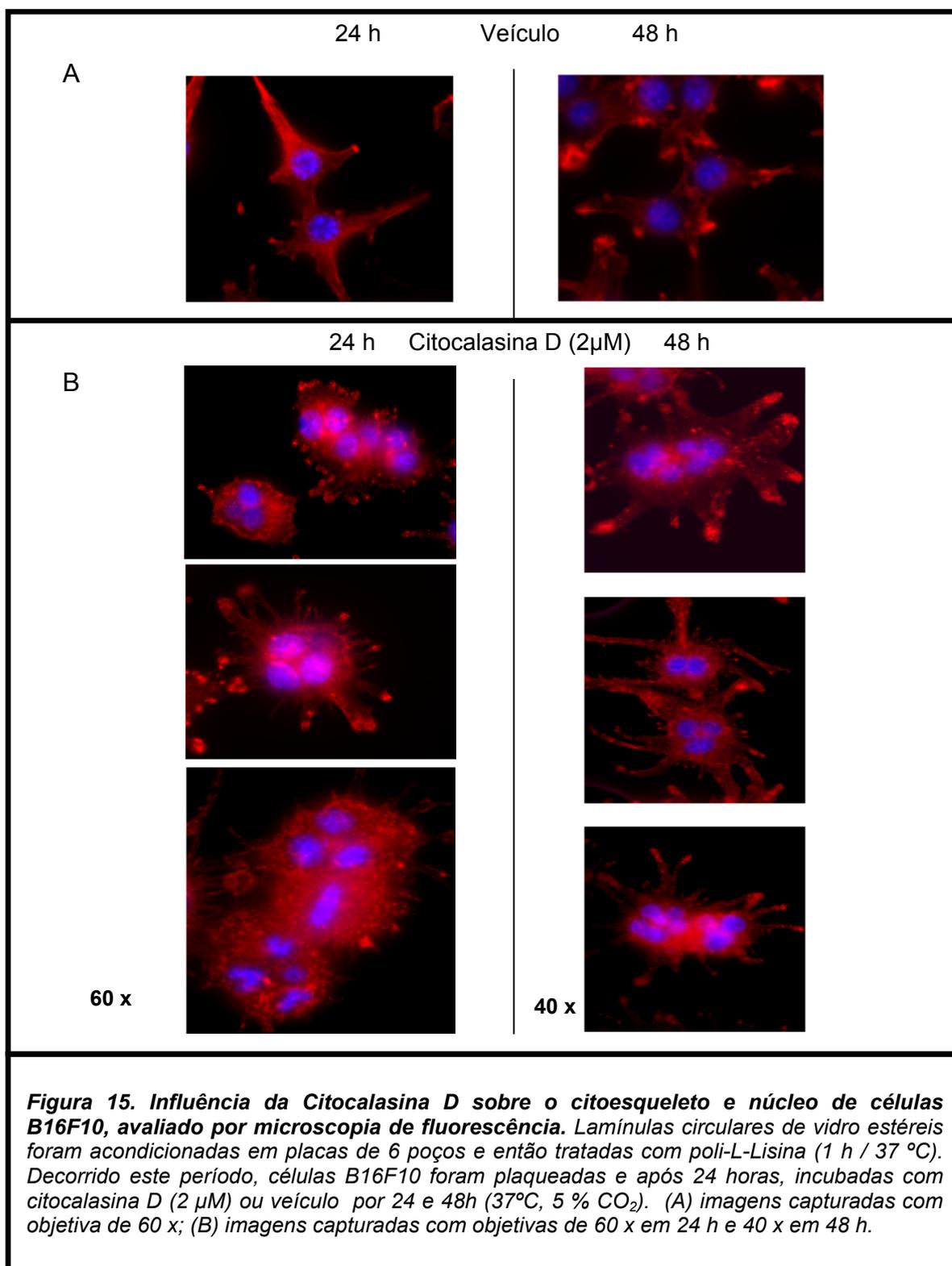


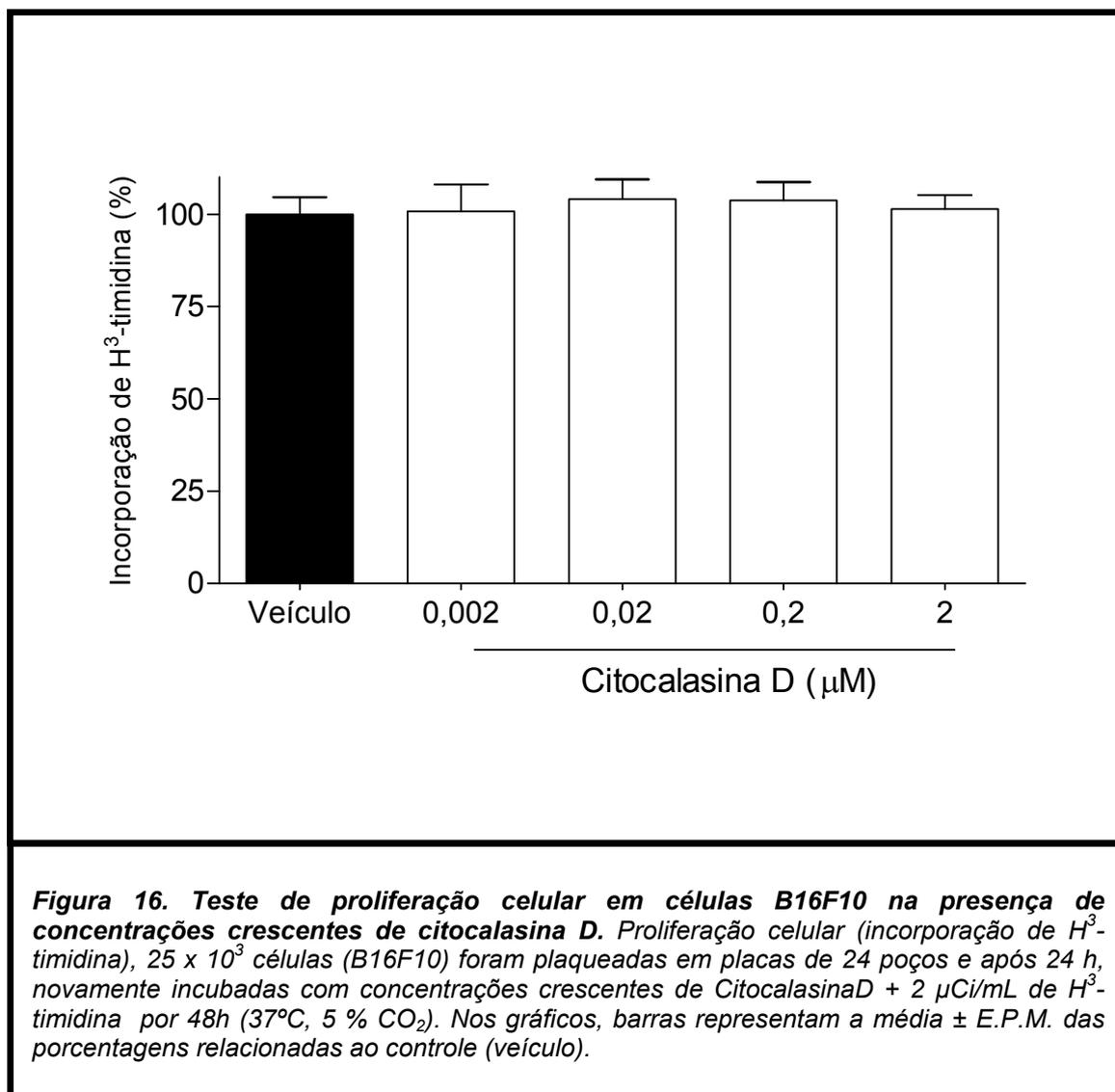


4.5 Análises do citoesqueleto e núcleo das células B16F10 por microscopia de fluorescência:

Para confirmar o surgimento das células poliplóides observadas na citometria de fluxo, foi utilizado Rodamina-Faloidina e Hoeschst 33342 para a marcação de filamentos de actina e núcleo, respectivamente. Os resultados qualitativos demonstraram que a incubação das células B16F10 com DHCB, após 48 horas de incubação, promoveu o surgimento de células poliplóides, com predominância de células binucleares (Figura 14A). Porém, foi também observado que DHCB promoveu importante alteração no citoesqueleto de actina (Figura 14B). Este fato, que se inicia após 4 horas de incubação com DHCB (dados não apresentados) poderia explicar, pelo menos em parte, as alterações na morfologia das células que receberam DHCB. Na tentativa de observar se fármacos que promovem prejuízo nas fibras de actina apresentariam o mesmo perfil, células B16F10 foram tratadas com citocalasina D (inibidor da polimerização das fibras de actina), marcadas com Rodamina-Faloidina e Hoeschst 33342 e ainda, como complemento, foram feitos também, ensaios de proliferação celular (incorporação de H^3 -timidina). Os resultados demonstraram que a citocalasina D (Figuras 15A e B) promove também um prejuízo na conformação das fibras de actina, mas, de maneira diferente da DHCB, não reduz a incorporação de timidina triciada (Figura 16) indicando que as células continuam a dividir seus núcleos (cariocinese), de modo que, ao final do experimento, haja o surgimento de células polinucleadas com 3 ou mais núcleos.





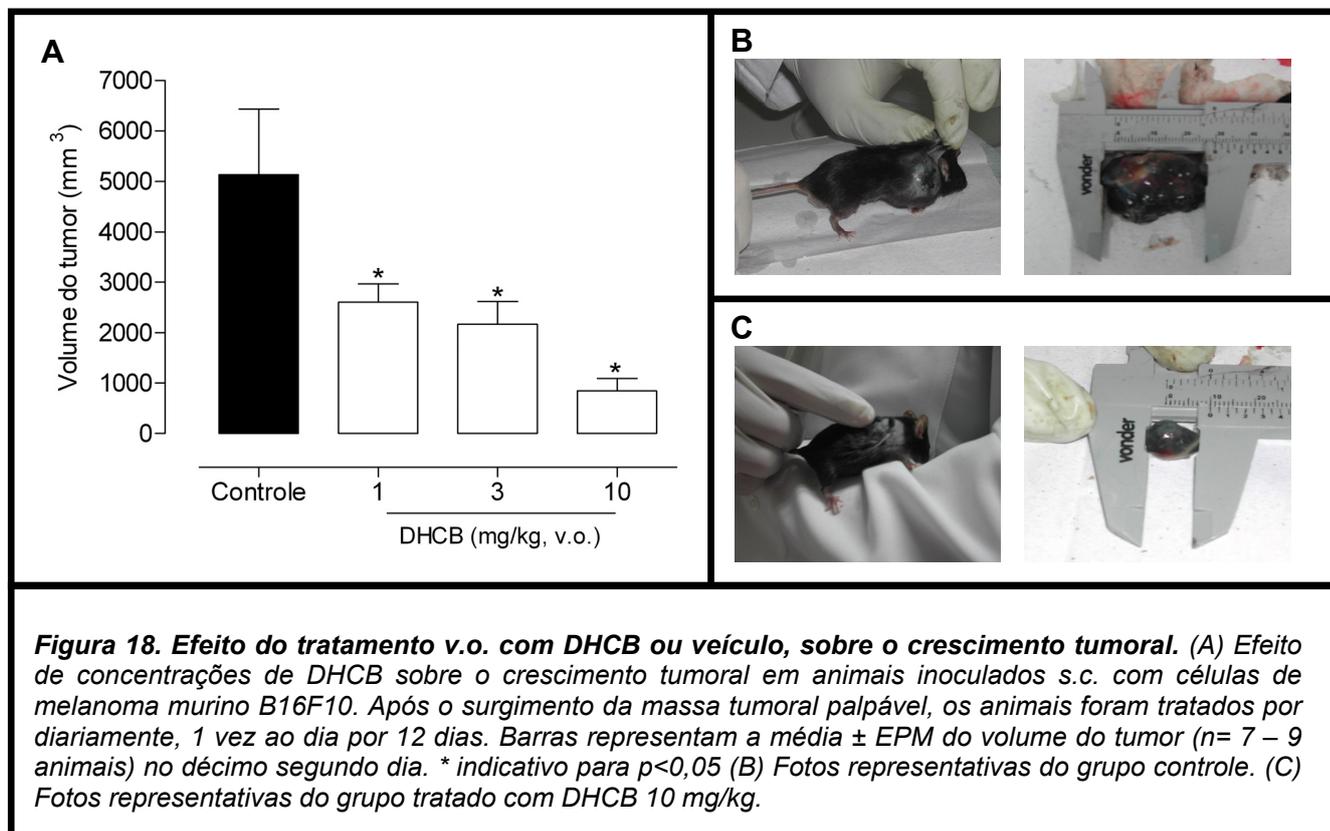


4.6 Análises da formação de pontos de adesão focal nas células B16F10 por imunofluorescência:

Este experimento foi proposto para observar se o prejuízo ao citoesqueleto de actina observado anteriormente poderia levar à alteração na distribuição de pontos de adesão focal. Para tal, as células foram novamente marcadas com Rodamina-Faloidina, Hoeschst 33342 (para os filamentos de actina e núcleo) e anticorpo anti-paxilina para a visualização dos pontos de adesão focal. Os resultados demonstraram que DHCB prejudica a organização da actina, bem como altera a distribuição dos pontos de adesão, concentrando-os e sobrepondo-os à marcação observada para o citoesqueleto (Figuras 17A e B).

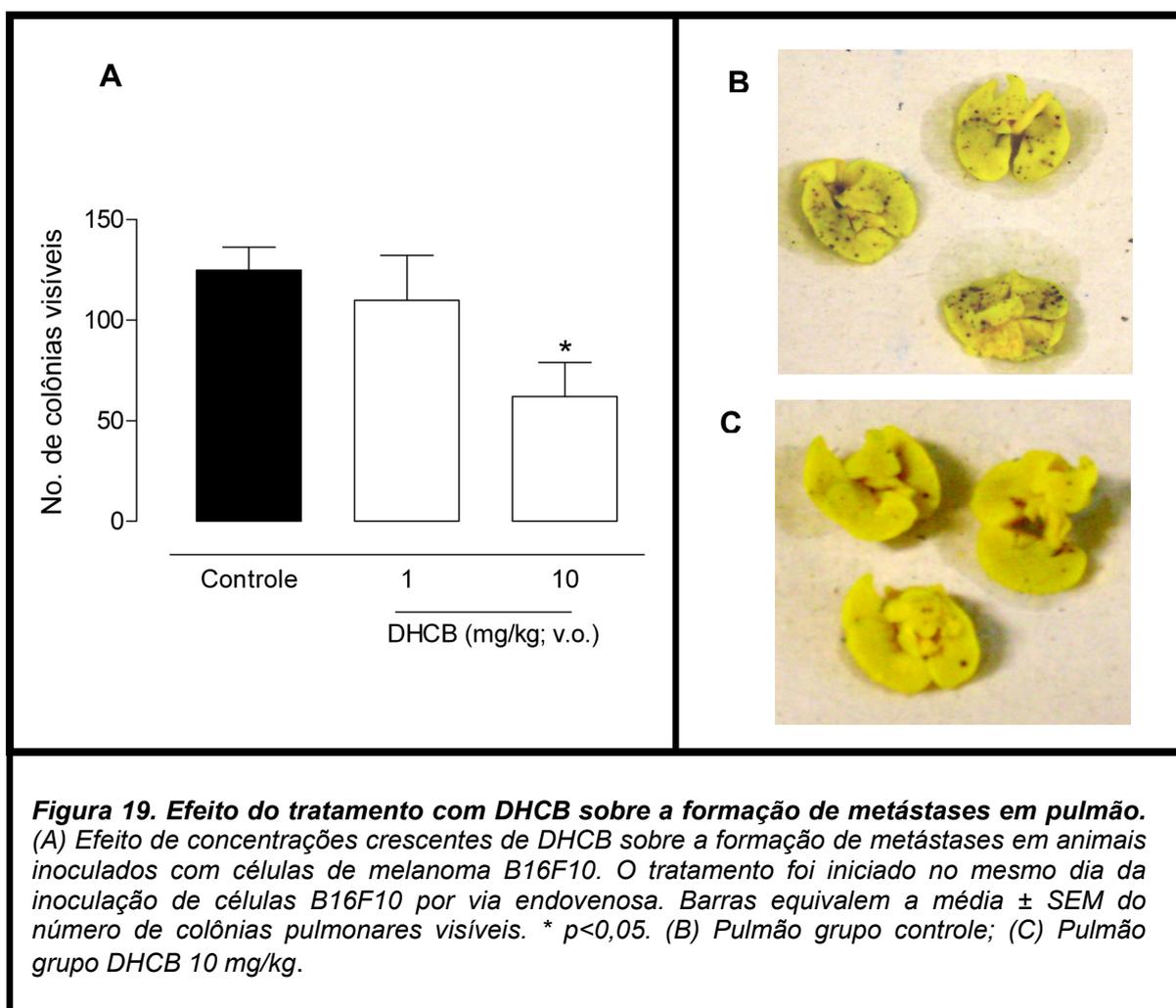
4.7 Avaliação da atividade da dihidrocucurbitacina B sobre o crescimento tumoral *in vivo*:

A fim de investigar o efeito do tratamento com DHCB *in vivo*, camundongos C57BL6 receberam injeção subcutânea de 1×10^6 células (100 μ L) B16F10 na região dorsal. Sete dias após a inoculação, com o surgimento da massa tumoral palpável, foi iniciado o tratamento com concentrações crescentes de DHCB (1-10 mg/kg; v.o.) ou veículo, 1 vez ao dia, durante 12 dias. Ao final do experimento, o grupo controle apresentou massa tumoral com volume médio de $5133,4 \pm 1302,4 \text{ mm}^3$. Quando comparados ao controle, os grupos tratados com DHCB apresentaram redução da massa tumoral em: 49,3; 57,8 e 83,5 % para as doses avaliadas (Figura 18A).



4.8 Avaliação da atividade da diidroocurbitacina B sobre a formação de metástases *in vivo*:

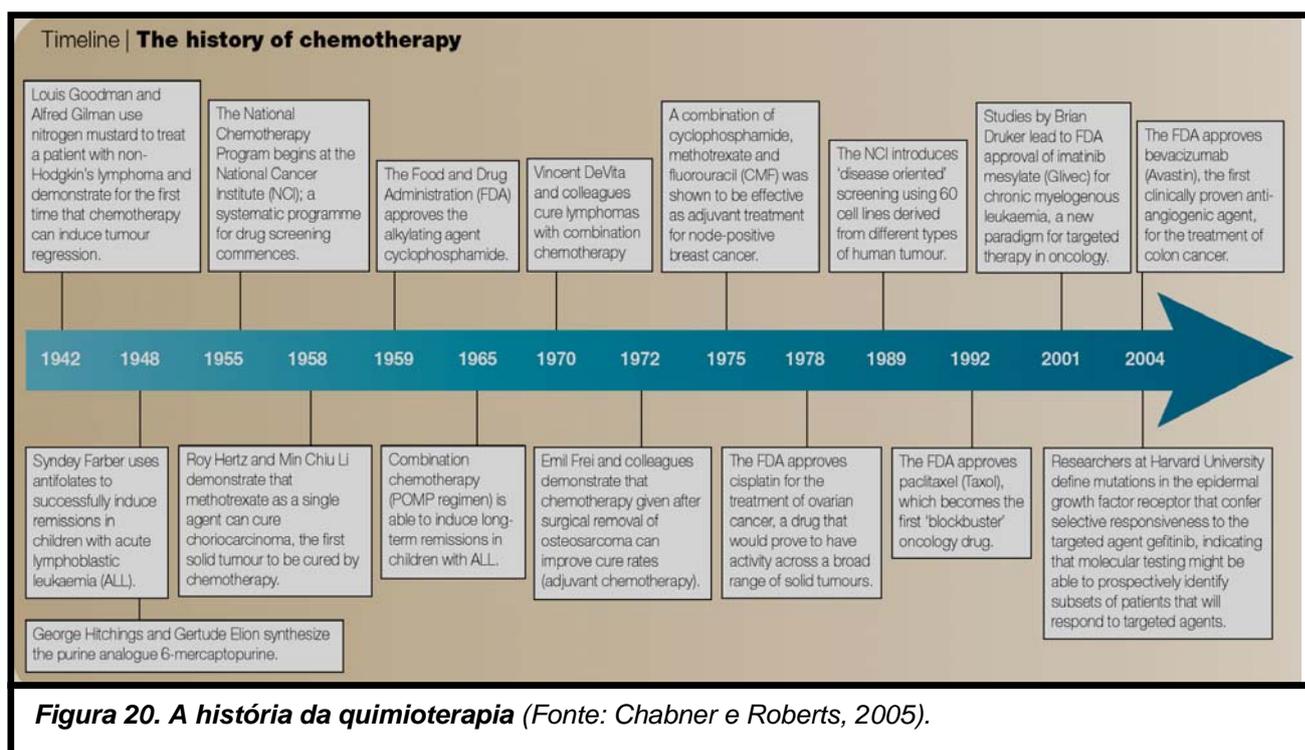
Para este ensaio, procurou-se observar se o tratamento com DHCB poderia ser também eficaz em reduzir o número de metástases pulmonares, provocadas pela injeção endovenosa de células B16F10. O tratamento com DHCB (1 e 10 mg/kg; v.o.) ou veículo, foi efetuado 1 vez ao dia, durante 12 dias, a iniciar no dia da inoculação. Ao final do experimento, o número de colônias pulmonares visíveis foi contado, tendo o grupo controle apresentado número médio de $124,8 \pm 11,3$ colônias visíveis. Quando comparados ao controle, apenas o grupo tratado com DHCB 10 mg/kg apresentou redução significativa do número de colônias em 50,3 % (Figura 19A).



5. Discussão

Dos muitos desafios da medicina, nenhum teve um início tão controverso quanto o da cura para o câncer. Embora o processo neoplásico tenha sido reconhecido por séculos, os conhecimentos sobre os mecanismos biológicos de transformação e progressão do tumor eram escassos até o advento da medicina molecular em meados do século 20. Até 1950, a terapia disponível para o câncer era predominantemente a intervenção cirúrgica. Com a invenção do acelerador linear, em 1960, a radioterapia se tornou uma ferramenta preciosa para o controle local e regional da doença, mas, do mesmo modo que a cirurgia, não era capaz de erradicar o câncer metastático. O tratamento efetivo para muitos pacientes necessitava alcançar cada órgão do corpo. Fármacos e terapias imunológicas transformaram-se no foco dos esforços para curar o câncer. A partir de então, dos primeiros experimentos com mostarda nitrogenada, realizados há cerca de 65 anos atrás, às atuais tentativas de desenvolver fármacos para alvos específicos relacionados ao câncer, a pesquisa científica se tornou multidisciplinar e tem trabalhado em conjunto na busca por medicamentos mais efetivos para o tratamento de tumores (Figura 20; Chabner e Roberts, 2005).

O controle e o tratamento do câncer, a segunda maior causa de morte por doenças em todo o mundo, têm apontado para a busca de novas diretrizes voltadas para o aprimoramento e a melhoria de terapias não convencionais. A descoberta de novos fármacos derivados de plantas medicinais (metabólitos secundários e derivados) possui um importante papel no tratamento do câncer. De todos os fármacos antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40% foram de originados de produtos naturais ou derivados (semi-sintéticos) (Newmman et al., 2000, 2003; Butler, 2004).



A introdução de agentes ativos derivados de produtos naturais tem alterado a história de muitos tipos de câncer humano e vários compostos de origem vegetal são atualmente empregados. Um dos exemplos mais significantes é a vincristina, um alcalóide extraído da Vinca (*Catharanthus roseus*), que é encontrada nas florestas de Madagascar. A introdução da vincristina foi responsável por um aumento nas taxas de cura para a doença de Hodgkin e algumas formas de leucemia. Outro exemplo de agente ativo derivado de plantas é o etoposídeo, que é uma epipodofilotoxina, derivada da *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*. Este composto apresenta grande eficácia na cura de câncer de testículo, quando utilizado em combinação com bleomicina (também derivada de produto natural) e cisplatina. Os taxanos, paclitaxel e docetaxel, derivados de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata* apresentam expressiva atividade antitumoral contra cânceres de mama, ovário e outros tipos de tumores malignos. Os derivados da campotecina, irinotecano e topotecano, têm demonstrado significativa atividade antitumoral contra câncer

colorectal e de ovário, respectivamente. Novas moléculas de origem natural oferecem uma grande oportunidade para avaliar não somente novas classes químicas de agentes antitumorais, mas também mecanismos de ação novos e potencialmente relevantes (para revisão ver Rocha et al., 2001).

Vários agentes de origem vegetal como, por exemplo, curcumina, resveratrol e catequinas interferem com as vias regulatórias do ciclo celular, o que as qualifica como agentes terapêuticos (Mukhopadhyay et al., 2002; Estrov et al., 2003). Em células de mieloma, a inibição da atividade do NF- κ B pela curcumina, reduz a expressão da ciclina D1 (Bharti et al., 2003), que resulta em diminuição da formação de complexo ativo ciclina D/cdk4, levando à supressão da proliferação e indução de apoptose. Em outro estudo, a este mesmo composto induz uma “parada” no ciclo celular em G0/G1 e/ou G2/M, através do aumento da expressão dos inibidores de cdk como p21^{Cip1/waf1}, p27^{Kip1} e diminuição da expressão de ciclina B1 e cdk-1 (Park et al., 2002). Além da curcumina, outros agentes fitoquímicos têm demonstrado atividade antitumoral, tais como a (-)-epigallocatequina-3-galato, a genisteína, alicina, licopeno, capsaicina, 6-gingerol, silimarina, eugenol, anetol, ácido elárgico, ácido ursólico e S-alil cisteína (Balunas e Kinghorn, 2005).

Existem poucos relatos na literatura correlacionando cucurbitacinas e câncer, e dentre eles, o efeito de cucurbitacina E sobre o citoesqueleto de células de tumor de próstata humano (Duncan et al., 1996); efeito inibitório de várias cucurbitacinas sobre o crescimento de células de câncer de mama, pulmão e cólon (Jayaprakasam et al., 2003); inibição da fosforilação de STAT3 pela cucurbitacina I e Q em células tumorais humanas e murinas (Blaskovich et al., 2003; Sun et al., 2005).

De acordo com observações feitas pelo nosso grupo em conjunto com outras evidências que demonstram a participação de enzimas pró-inflamatórias em

processos tumorais, a proposta inicial deste trabalho foi estudar a ligação entre inflamação e câncer, com o objetivo de relacionar a inibição da enzima COX-2 em processos tumorais com produtos derivados de *Wilbrandia ebracteata*, principalmente a Dihidrocucurbitacina B (Siqueira et al., 2007), composto majoritário da fração diclorometano de *W. ebracteata* (WEDC).

Vários relatos na literatura demonstram que a expressão elevada da COX-2 em diferentes células tumorais pode estar relacionada com proliferação celular aumentada, prevenção de apoptose, aumento do potencial metastático, produção de fatores angiogênicos e inibição da vigilância imunológica. Essas evidências sugerem que a inibição da COX-2 e/ou diminuição de sua expressão, poderiam ser uma das vias no controle do câncer (Tsuji et al., 1997, 1998; Banerjee et al., 2002).

Nossos resultados para esta etapa demonstraram que tanto WEDC quanto o composto isolado DHCB reduzem a taxa de proliferação celular, porém a DHCB demonstrou menor citotoxicidade. WEDC é uma fração rica em cucurbitacinas, tais como DHCB (composto majoritário, aprox. 45 %), cucurbitacina B (cerca de 3 %), cucurbitacina E, isocucurbitacina B e dentre outras. Nosso grupo tem caracterizado estruturas de várias cucurbitacinas derivadas de *W. ebracteata*, evidenciando suas diferenças. Por exemplo, comparando as estruturas da cucurbitacina B e da dihidrocucurbitacina B nota-se uma diferença entre os carbonos 23-24 (dupla ligação para a CUCB e ligação simples para a DHCB) (Farias et al., 1993; Valente, 2004). Como continuidade do trabalho, passamos então a verificar a expressão da enzima COX-2 e o efeito de antiinflamatórios não esteroidais de conhecida atividade, nas mesmas condições experimentais (condições basais), para as células de melanoma murino da linhagem B16F10 utilizadas para as avaliações de viabilidade e proliferação celular. As figuras 7A e B demonstram que nas células B16F10 a

viabilidade e proliferação após estímulo com os AINEs, não apresentam efeitos importantes, principalmente na faixa descrita para a inibição da enzima. Em adição a isto, em condições basais, as células não expressam a enzima COX-2. Em conjunto, estes resultados revelam que para esta linhagem, a COX-2 não participa nos eventos de proliferação celular, e com isso, os efeitos exibidos pelos produtos derivados de *W. ebracteata*, são independentes desta enzima.

Além dos efeitos acima citados, análises da dinâmica celular por microscopia em tempo real, demonstraram que a adição de DHCB promoveu importantes alterações na morfologia das células, tornando-as arredondadas e ainda, reduzindo sua taxa de proliferação. Estes fatos, em conjunto, redirecionaram nosso estudo para os efeitos da DHCB sobre o ciclo celular, um caminho que, apesar de complexo, proporciona um amplo leque de possibilidades para a investigação do potencial de fármacos com atividade antitumoral.

É bem estabelecido na literatura que a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a proliferação celular, permite a identificação de alvos que poderiam ser manipulados para utilização contra tumores (Pines 1995; Hanahan e Weinberg, 2000; Swanton, 2004). Frente ao exposto, investigamos os efeitos da DHCB sobre eventos relacionados ao estudo da proliferação celular, onde foram feitos ensaios de proliferação (incorporação de H³-timidina), estudos de citometria de fluxo com iodeto de propídio e análises por *Western blot* com células B16F10 não sincronizadas. Rodriguez-Ayerbe e Smith-Zubiaga (2000), em análises de viabilidade, proliferação celular e síntese de DNA demonstraram que células de melanoma murino B16F10 apresentam um clássico “congelamento” no ciclo celular, não podendo ser sincronizadas por protocolos de privação de soro.

Avaliando a expressão das proteínas que participam no controle do ciclo celular, podemos observar que não há alterações marcantes em proteínas que regulam o início do ciclo em G1, porém modificações começam a surgir na expressão da ciclina A, participante pela transição G1/S e G2/M e são marcantes na expressão da ciclina B1, que possui papel fundamental para a correta transição G2/M e saída de M. Análises do ciclo celular das células marcadas com iodeto de propídio corroboram as observações obtidas com a eletroforese e demonstram que após incubação com DHCB em diferentes intervalos de tempo, as células se acumulam em G2/M (4 – 24 h após incubação com DHCB). Estes resultados sugerem que DHCB provoca um retardo na progressão do ciclo celular acumulando as células em G2/M devido, pelo menos em parte, à redução da atividade do complexo ciclina B1/cdk-1, uma vez que, os níveis de ciclina B1 encontram-se reduzidos.

A progressão no ciclo celular é conduzida por complexos formados por proteínas quinases formadas por uma subunidade catalítica (cdk) e uma subunidade regulatória, as ciclinas que conferem especificidade, cada um com seu parceiro (por exemplo: ciclina E/cdk-2). Na transição G2/M, o complexo ciclina B/cdk-1 é conhecido por ser um mediador chave em todas as células eucarióticas. Esta quinase mitótica (também denominada MPF – *mitosis promoting factor*) é regulada em vários níveis, dentre eles: 1) a formação do complexo ciclina B/cdk-1 depende da disponibilidade da ciclina B, que inicia sua produção no final da fase S, acumula na mitose e é rapidamente degradada, preparando a célula para entrar na próxima fase G1; 2) a localização subcelular da ciclina B e a regulação do MPF pelo estado fosforilativo. Neste processo, fosfatases como cdc25B e cdc25C são responsáveis pela ativação e as proteínas quinases wee1 e myt-1 são responsáveis por inativar o

complexo (Molinari, 2000). A diminuição da expressão de ciclina B, observada nas células tratadas com DHCB, poderia caracterizar redução na sua disponibilidade e, dessa maneira, este fato nos leva a crer que seja racional sugerir que o acúmulo das células em G2 seja decorrente da redução da atividade do complexo ciclina B/cdk-1.

Outra observação importante no ensaio do ciclo celular foi o surgimento de células poliplóides iniciado após 16 h de incubação com DHCB. Para confirmar esta observação, foram feitas colorações observadas por microscopia de fluorescência. Este experimento demonstrou que principalmente após 48 h de incubação com DHCB, as células se apresentaram em maioria, binucleadas o que indica que as células estariam dividindo o material nuclear (cariocinese) e sendo incapazes de formar duas células (citocinese). Além disso, foi também observado um importante efeito sobre o citoesqueleto das células tumorais. É interessante notar que nos resultados obtidos com a incubação das células B16F10 com citocalasina D, também foi observado efeito sobre citoesqueleto, porém as células ao final de 48 h apresentaram mais de dois núcleos, e não houve redução na incorporação de timidina triciada. Drogas como citocalasinas são, há muito tempo, descritas como agentes químicos capazes de inibir a citocinese sem prevenir a divisão nuclear. Como consequência disto, células que se dividem na presença de citocalasina podem ser facilmente identificadas por apresentarem mais de um núcleo (Carter, 1967; Minissi et al., 1999). Fármacos que interferem nos filamentos de actina, apesar de não serem utilizados na clínica, estão em estudo (Giganti e Friederich, 2003). É curioso notar que até pouco tempo atrás, as citocalasinas eram os únicos compostos conhecidos que afetavam diretamente a polimerização e dinâmica dos filamentos de actina. Entretanto, durante os últimos anos, um número considerável de novos compostos, tem sido desenvolvido, todos derivados de produtos naturais, que

freqüentemente modulam eventos relacionados aos filamentos de actina, por um único mecanismo. Vários relatos sugerem que estes fármacos, devido à inibição da proliferação celular que provocam, possuem potencial como agentes para o tratamento do câncer (Jordan e Wilson, 1999). Nossos resultados demonstram que DHCB apresenta certa vantagem sobre citocalasina D, pelo efeito provocado sobre o ciclo celular onde há o acúmulo das células em G2/M e conseqüentemente, há redução na taxa de proliferação.

Quando as células entram em mitose, a fosforilação de componentes essenciais de estruturas subcelulares causa a completa reorganização da arquitetura da célula. Esta fosforilação é principalmente decorrente da ativação do complexo formado por ciclina B/cdk-1 (Nigg, 1993). A fosforilação mediada pela ciclina B também induz alterações na formação de microtúbulos, filamentos de actina e núcleo (Yamashiro et al., 1991; Ubersax et al., 2003). Por exemplo, acredita-se que cdk-1 pode fosforilar Eg5, uma proteína requerida para estabilizar as fibras do fuso mitótico. Por fosforilar a proteína caldesmon (relacionada à actina), o complexo ciclina B/cdk-1 enfraquece sua ligação com a actina, induzindo a dissociação dos microfilamentos, contribuindo para na alteração da morfologia celular para um formato arredondado (Yamashiro et al., 1990).

Alguns autores têm relacionado o surgimento de células poliplóides também com a atividade irregular do complexo ciclina B1/cdk-1 em alguns tipos celulares. Usando megacariócitos, Zhang e colaboradores (1998), relataram que a citocinese (divisão da célula como um todo), mas não a cariocinese (divisão do núcleo), parece ser completamente abolida quando os níveis da ciclina B estão reduzidos devido ao aumento em sua degradação. Este fato proporciona a formação de células multinucleares. Em outro trabalho, Fernández e colaboradores (2004) demonstraram

que SKF-104976 (inibidor da síntese de colesterol) induziu um retardo na transição G2/M seguido pela formação de células poliplóides em células de leucemia humana (HL-60). Este fato foi também acompanhado por diminuição na atividade ciclina B/cdk-1.

Por outro lado, Duncan e colaboradores (1996), demonstraram que cucurbitacinas, principalmente cucurbitacina E, são potentes “desorganizadores” da integridade do citoesqueleto por aumentar os filamentos ou induzir a polimerização da actina em células de carcinoma de próstata. Em 1997, os mesmos autores utilizando células endoteliais ECV304, observaram que cucurbitacina E é capaz de promover a formação de células poliplóides por alterar a distribuição dos filamentos de F-actina com perda de fibras de *stress* e acumulando-as na periferia (Duncan et al., 1997). Além disso, a similaridade da estrutura das cucurbitacinas com o colesterol, também sugere a possibilidade de um efeito parcial sobre membrana, como a desorganização de proteínas regulatórias que poderiam afetar a arquitetura do citoesqueleto como proposto por Fenton e colaboradores (1992). Em conjunto com nossos resultados, estes relatos indicam que DHCB interfere com o citoesqueleto e que este efeito pode ser parcialmente responsável pelo aparecimento de células binucleares. Uma vez que a função da actina não é apenas restrita à divisão celular, mas possui papel predominante em outros fenômenos associados à membrana como, por exemplo, movimentação celular (Wodarz, 2002), drogas que interferem na dinâmica da actina podem não somente inibir a citocinese, mas em paralelo, podem bloquear a movimentação descontrolada das células tumorais, gerando interesse particular para a terapia do câncer (Giganti e Freiderich, 2003).

O passo final na divisão celular no qual, o citoplasma se divide para formar duas células é conhecido como citocinese. Durante os estágios tardios do ciclo celular, um anel cortical contendo actina e miosina, é construído no local onde inicia a separação célula-célula. Em seguida à segregação do material genético e organelas nas duas metades da célula, a contração dos anéis de actina-miosina permite a invaginação da membrana plasmática e a conseqüente separação das duas células. A formação e contração do anel de actina-miosina é regulada por um processo minuciosamente controlado, assegurando que a separação das células aconteça no tempo exato (para revisão ver Huckaba e Pon, 2002). Por envolver dinâmica ativa de acoplamento e desacoplamento de filamentos de actina durante a citocinese, compostos que interferem com a polimerização ou organização espacial destes filamentos, poderão bloquear este processo e gerar células multinucleadas por desacoplar a divisão citoplasmática da divisão nuclear (Giganti e Friederich, 2003). Estes relatos complementam nossos achados com DHCB sobre o citoesqueleto de actina e poderiam estar diretamente relacionados à formação de células poliplóides e concomitante redução na proliferação celular.

Nossos experimentos por microscopia de fluorescência demonstram ainda que DHCB não provoca apenas um prejuízo na organização da actina, mas também altera a distribuição dos pontos de adesão focal, que aparecem sobrepostos à actina. Migração e adesão celular constituem um processo integrado que requer regulação coordenada de várias moléculas sinalizadoras, incluindo algumas quinases e fosfatases, que por sua vez, podem fosforilar e defosforilar proteínas-chave que atuam no correto funcionamento da adesão/migração. Os dois componentes principais da adesão focal são: a quinase de adesão focal (FAK) e a paxilina que interagem diretamente (Parsons et al., 2000; Turner, 2000). FAK é uma

proteína quinase que apresenta um domínio catalítico central flanqueado por domínios N- e C- terminais não-catalíticos. Paxilina é uma proteína que está localizada primariamente nos pontos de adesão relacionados à matriz extracelular, sendo o principal alvo de tirosinas quinase durante vários eventos celulares associados com adesão celular e controle do crescimento (Turner, 2000). O complexo formado pela FAK – Src medeia a fosforilação de duas moléculas bem conhecidas, paxilina e p130CAS (p130 – *Crk-associated substrate*). Paxilina e p130CAS podem recrutar outras moléculas para a adesão e regular o citoesqueleto de actina. Fibroblastos deficientes em paxilina apresentam defeitos no citoesqueleto cortical, propagação celular e migração (Webb et al., 2004).

Vale ressaltar que, de maneira interessante, o tratamento de fibroblastos NIH3T3 com DHCB apresentou um perfil diferente em relação às células B16F10. Para ensaios de viabilidade e proliferação celular na presença de DHCB, os resultados foram marcantes apenas nas maiores concentrações avaliadas. Porém este resultado foi resultante de um “descolamento” das células NIH3T3 em presença das concentrações mais elevadas de DHCB. Por sua vez, este “descolamento” não resultou na morte destas células conforme observado no experimento de viabilidade por microscopia de fluorescência.

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, passamos para os experimentos *in vivo* onde Dihidrocucurbitacina B foi administrada por via oral. Ao contrário de outros membros da família das cucurbitacinas, o tratamento com DHCB não provocou sinais de toxicidade como diarreia, sangramentos, alterações comportamentais ou mortalidade (resultados não apresentados) e o mais importante, foi efetiva em reduzir tanto o crescimento da massa tumoral primária, quanto o surgimento de metástases. É possível que os efeitos observados *in vitro*, possam ser responsáveis

pelos efeitos observados *in vivo*, mas outros aspectos relacionados à atividade da DHCB não devem ser descartados, como por exemplo, a potente atividade antiinflamatória relacionada com redução dos níveis de prostaglandina E2 decorrente da inibição da atividade da enzima COX-2 (Siqueira et al., 2007). É importante ressaltar que vários relatos na literatura relacionam a prostaglandina E2 e seus receptores à progressão tumoral em eventos relacionados à proliferação celular, invasão, angiogênese e imunossupressão (Wang e DuBois, 2006). Mediante isso, DHCB *in vivo* poderia também estar inibindo a síntese de PGE2, e em adição aos efeitos descritos neste trabalho, poderia estar contribuindo para o efeito final observado.

Os quimioterápicos para o tratamento do câncer, que estão atualmente em uso na clínica são basicamente classificados como:

- *Medicamentos de fase específica no ciclo celular*: neste caso estão incluídos os fármacos que podem atuar sobre as células em uma ou mais fases fora do período de “repouso” (G0), sendo mais eficazes contra tumores em crescimento rápido que têm maior proporção de células passando pela fase do ciclo em que o medicamento exerce seu efeito. Exemplos incluem os antimetabólitos, os alcalóides da vinca e outros agentes, como a asparaginase e a dacarbazina.

- *Medicamentos de fase inespecífica do ciclo celular*: são ativos contra células em divisão ou em “repouso”, sendo ativos em todas as fases do ciclo celular. Exemplos incluem os agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, nitrosuréias, hormônios e esteróides, e outros como a procarbazina.

Os mecanismos de ação são os mais variados, como por exemplo: inibição de enzimas (topoisomerase II – etoposídeo); inibidores de mitose (paclitaxel e vincristina); interferência na síntese e função de ácidos nucleicos (bleomicina,

mitomicina); hormônios e antagonistas hormonais (fluoximesterona, diethylbestrol); agentes alquilantes que estabelecem ligações cruzadas com o DNA impedindo sua replicação (mostarda nitrogenada, carmustina, lomustina), dentre outros.

Em resumo, demonstramos que dihidrocucurbitacina B, um composto isolado de *Wilbrandia ebracteata* Cogn, promove diminuição da expressão da ciclina B, mediador na transição de G2/M e saída de M, prejudicando este evento, e ainda, age sobre o citoesqueleto desorganizando filamentos de actina e distribuição dos pontos de adesão focal (Figura 21). Em conjunto, são capazes de reduzir a taxa de proliferação celular, tornando as células B16F10 binucleares. Provavelmente estes achados tenham implicações em processos fisiológicos (efeitos adversos), mas por outro lado, podem ser benéficos sobre eventos patológicos como, por interferir na capacidade migratória e invasiva de células tumorais e reduzir sua proliferação, sugerindo um grande potencial na quimioterapia para o tratamento do câncer. Para compostos com atividade semelhante à observada para DHCB, o fato de reduzir a taxa de proliferação e movimentação celular pode não ser suficiente para extinguir o tumor, porém, pode ser muito útil se administrados em conjunto com outros quimioterápicos convencionais. A associação poderia possibilitar, em teoria, redução do tempo de administração ou da dose do agente antineoplásico, diminuindo o efeito colateral provocado pela quimioterapia; prevenir o aparecimento de metástases, e outros benefícios a serem computados a favor do paciente.

Sendo assim, nossos resultados propõem que *Wilbrandia ebracteata*, popularmente conhecida como Taiuiá, pode ser considerada fonte potencial de substâncias farmacologicamente ativas, que auxiliariam na terapêutica do combate ao câncer.

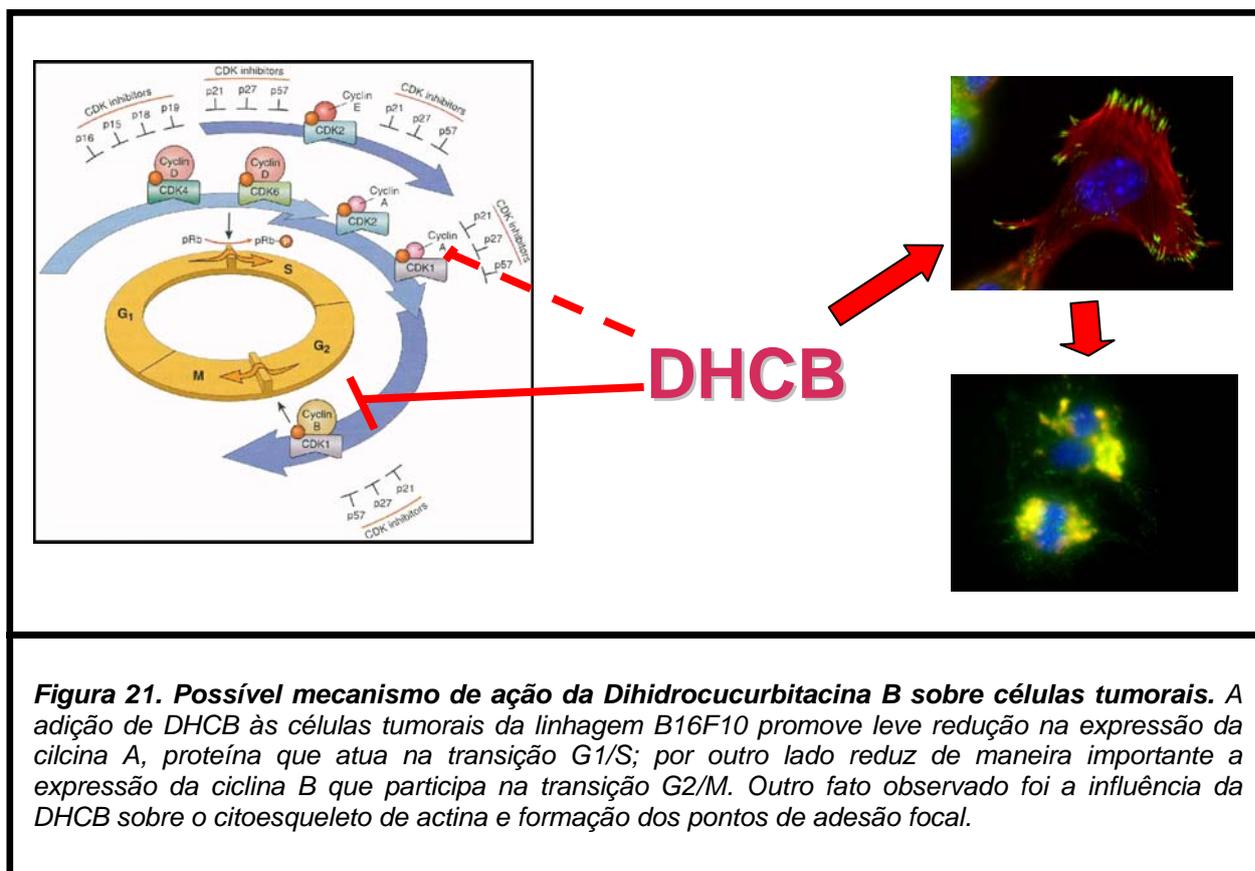


Figura 21. Possível mecanismo de ação da Dihidrocurbitacina B sobre células tumorais. A adição de DHCB às células tumorais da linhagem B16F10 promove leve redução na expressão da ciclina A, proteína que atua na transição G₁/S; por outro lado reduz de maneira importante a expressão da ciclina B que participa na transição G₂/M. Outro fato observado foi a influência da DHCB sobre o citoesqueleto de actina e formação dos pontos de adesão focal.

6. Conclusões

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- 1) Tanto a fração diclorometano de *W. ebracteata* quanto o composto isolado Dihidrocucurbitacina B, foram capazes de reduzir a viabilidade e proliferação de células de melanoma murino B16F10, porém o último apresentou menor citotoxicidade.
- 2) Os ensaios de microscopia em tempo real demonstraram que DHCB induz alterações expressivas na morfologia fusiforme das células B16F10, reduzindo também a taxa de proliferação durante o período total de 48 horas de duração do experimento.
- 3) Na presença de DHCB, células de fibroblasto murino da linhagem NIH3T3, não exibiram o mesmo perfil apresentado pelas células B16F10, uma vez que DHCB reduziu a viabilidade apenas nas concentrações de 10 e 100 µg/mL. Entretanto, utilizando um modelo de viabilidade celular por avaliado por microscopia de fluorescência, as células que receberam as concentrações acima descritas estavam em suspensão, porém viáveis.
- 4) Os Antiinflamatórios não esteroidais Indometacina e Naproxeno exerceram efeito inibitório sobre a viabilidade de células B16F10 apenas nas concentrações mais elevadas e, além disso, essas células não expressam COX-2 nas condições avaliadas, sugerindo que os resultados obtidos com WEDC e DHCB não são mediados por esta enzima.
- 5) Os ensaios sobre a expressão de proteínas que participam no controle do ciclo celular demonstraram que a adição de DHCB reduz a expressão de ciclinas como ciclina A, e principalmente, ciclina B, sugerindo que as células podem estar sendo acumuladas nas fases G2/M.

- 6) Nos ensaios por citometria de fluxo para a avaliação do ciclo celular foi demonstrado que as células que receberam DHCB se acumulam em G2/M, corroborando os achados anteriores e, após 48 h de incubação, se tornam poliplóides. Na análise da indução de apoptose por incorporação de Anexina V-FITC, foi observado que DHCB não induz apoptose apresentando ainda, cerca de 82 % de células viáveis.
- 7) Os ensaios por imunofluorescência confirmam o surgimento de células poliplóides (binucleares) e demonstram ainda que DHCB induz importantes alterações no citoesqueleto de actina e na distribuição dos pontos de adesão focal.
- 8) Nos experimentos *in vivo* o tratamento por via oral com DHCB foi capaz de reduzir tanto o crescimento tumoral, quanto a formação de metástases em camundongos inoculados com células B16F10, não sendo observados efeitos adversos como sangramentos, diarreia ou alterações comportamentais.
- 9) Em conjunto, podemos concluir DHCB promove um atraso na progressão do ciclo celular, acumulando as células em G2/M, pelo menos em parte, por reduzir a expressão de ciclinas que regulam essa transição e pela desorganização causada no citoesqueleto de actina. E ainda, DHCB é ativo por via oral, foi capaz de reduzir o volume do tumor primário e o número de colônias de células B16F10 (metástases) pulmonares. Além do efeito *in vitro* observado neste trabalho, deve-se considerar também que DHCB apresenta atividade antiinflamatória decorrente da diminuição dos níveis de PGE2, o que pode contribuir de maneira importante para a obtenção dos efeitos observados, sugerindo potenciais perspectivas para a terapia de combate ao câncer.

7. Referências Bibliográficas

- Albert O., Djetcha T., Lagrange E., Aurousseau M., Forgacs P., Provost J. e Tiberghien R. Étude expérimentale de l'activité anthelminthique de quelques cucurbitacines. *Chimica Therapeutica*, 5:205-210, 1970.
- Alisson M.R., *The cancer Handbook*. 1 ed. – 2 volumes – New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.
- ACS, American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2006*. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
- Ashkenazi A. e Dixit V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current opinion in Cell Biology*, 11:255-260, 1999.
- Auerbach W. e Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacology and therapeutics*, 63:265-311, 1994.
- Balick M.J., Cox P.A. *Plants, People, and Culture: the Science of Ethnobotany*. New York: Scientific American Library, 1977.
- Balkwill F. e Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357:539–545, 2001.
- Balunas M.J., Kinghorn A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5):431-441, 2005.
- Banerjee T., Van der Vliet V., Ziboh V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids*, 66(5-6): 485-492, 2002.
- Baranowska M.K. e Cisowski W. Flavonas C-glycosides from *Brionia Alba* e *B. dioica*. *Phytochemistry*, 39 (3): 727 - 729, 1995.
- Baron J. A. e Sandler R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annual Reviews of Medicine*, 51:511–523, 2000.
- Bauer R. e Wagner H. Cucurbitacin-containing drugs. Analysis and standardization of medicinal drugs and plant preparations by HPLC and other chromatographic methods, II. *Deutsch Apoth.-Ztg.*, 123: 1313 – 1321, 1985.
- Bergers G. e Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenesis switch. *Nature Reviews Cancer*, 3: 401 – 410, 2003.
- Bertram J.S. *The molecular biology of cancer*. *Molecular Aspects of Medicine* 21: 167-223, 2001.
- Bharti A.C., Donato N., Singh S., Aggarwal B.B. Cucurmin (diferuloylmethane) down regulates the constitutive activation of nuclear factor Kappa B and Ikappa alpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, 101:1053-1062, 2003.
- Blaskovich M.A., Sun J., Cantor A., Turkson J., Jove R., Sehti S.M. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of

- transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Research*, 63:1270–1279, 2003.
- Boucher M.J., Jean D., Vézina A. e Rivard N. Dual role of MEK/ERK signalling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286:G736-G746, 2004.
- Brigati C., Noonan D. M., Albini A. e Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical and Experimental Metastasis*, 19: 247–258, 2002.
- Butler M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67 (12): 2141– 2153, 2004.
- Butt A.J., Firth S.M. e Baxter R.C. The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology*, 77:256-262, 1999.
- Calixto J.B., Beirith A., Ferreira J., Santos A.R.S., Filho V.C., Yunes R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 14(6):401-18, 2000.
- Calixto J.B., Santos A.R., Cechinel Filho V., Yunes R.A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews*, 18:225–258, 1998.
- Carmeliet P. E., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249 – 257, 2000.
- Carter S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, 21:261–264, 1967.
- Chabner B.A., Roberts T.G. Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer* 5(1):65-72, 2005.
- Chipperfield H., Kuldip S.B., Simon M.C., Nurcombe V. Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. *International Journal of Developmental Biology*, 46: 661 – 670, 2002.
- Collins J. Letters from editor: The history of cancer. *Seminars in Roentgenology*, 39(3): 341-342, 2004.
- Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(19/26):860-867, 2002.
- D'amore P.A. e Thompson R.N. Mechanism of angiogenesis. *Annual Reviews of Physiology*, 49: 453 – 464, 1987.
- Dang G. V., Rode B. M., Stuppner H. Quantitative electronic structure-activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: Maytansinoids, quanssinoids and cucurbitacins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2: 331-350, 1994.

- Dannenber A.J., Altorki N.K., Boyle J.O., Dang C., Howe L.R., Weksler B.B., Subbaramaiah K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncology*, 2: 544–551, 2001.
- Deshpande A., Sicinski P., Hinds P.W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24(17):2909-15, 2005.
- Dixon D.A., Kaplan C.D., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 11750–11757, 2000.
- Duncan K.L., Duncan M.D., Alley M.C., Sausville E.A. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 52:1553–1560, 1996.
- Duncan M.D. e Duncan K.L.K. Cucurbitacin E Targets Proliferating Endothelia. *Journal of Surgical Research*, 69: 55–60, 1997.
- Dvorak H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine*, 315:1650–1659, 1986.
- Ederly H., Schatzber P.G., Gitter S. Pharmacodynamic activity of Elatericin (Cucurbitacin D). *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*. 130: 315-335, 1961 apud *Phytotherapy Research*, 9: 165, 1995.
- Elder D.J., Halton D.E., Hague A., Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clinical Cancer Research*, 3(10):1679-83, 1997.
- Estrov Z., Shishodia S., Faderl S., Harris D., et al. Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 102:987-995, 2003.
- Evan G. e Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*, 281:1317-1322, 1998.
- Ezhevsky S.A., Ho A., Becker-Hapak M., et al. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G1 cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 21:4773-4784, 2001.
- Fachinger G., Deutsch U., Risau W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene*, 18(43): 5948-5953, 1999.
- Farias M.R., Schenkel E.P., Mayer R., Rucker G. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Medica*, 59: 272 – 275, 1993.
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin World Health Organ*, 63(6):965-81, 1985.

- Fenton R.G., Kung H.F., Longo D.L. e Smith M.R. Regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins. *Journal of Cell Biology*, 117: 347-356, 1992.
- Fernandez C., Lobo M.M.V., Gomez-Coronado D., Lasuncion M.A. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Experimental Cell Research*, 300:109– 120, 2004.
- Ferrario A. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Research*. 62: 3956–3961, 2002.
- Fidler I.J. Critical determinants of metastasis. *seminars in Cancer Biology*, 12:89–96, 2002.
- Folkman J., e Klagsbrun M. Angiogenic growth factors. *Science*, 235: 442 – 447, 1987.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1: 27 – 31, 1995b.
- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 333: 1757 – 1763, 1995a.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 285: 1182 – 1186, 1971.
- Füller R.W., Carcellina J.H. II, Cragg G.M., Boyd M.R. Cucurbitacins: differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. *Journal of Natural Products*, 57(10):1442-1445, 1994.
- Garcia-Rodriguez L.A. e Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology*, 12: 88–93, 2001.
- Giganti A., Friederich E. The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Progress in Cell Cycle Research*, 5:511-525, 2003.
- Green D.R. e Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281:1309-1312, 1998.
- Gus H., Intaek L., Kamar M., Akiyama S.K., Pierce M. Aberrant N-glycosylation of beta 1 integrin caused reduced alpha 5 beta 1 integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Research*, 62: 6837–6845, 2002.
- Hamato N., Koshiba T., Phan T.N., Tatsumi Y., Nakamura D., Takano R., Hayashi K., Hong Y.M., Hara S. Trypsin and elastase inhibitors from bitter melon (*Momordica charantia* LINN.) Seeds: purification, Amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *Journal of Biochemistry*, 117: 432-437, 1995.
- Hanahan D. e Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
- Hanahan D. e Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353 – 364, 1996.

- Harbour J.W., Luo R.X., Del Santi A., et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98:859-869, 1999.
- Harris C.C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17:1187-1198, 1996.
- Hartwell L.H. e Kastan M.B. Cell cycle control and cancer. *Science*, 266(5192):1821-1828, 1994.
- Hegnauer R. *Chemitaxonomie der Pflazen*. Basel: Birkhauser, 363-375, 1989.
- Hoehne F. C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas*. São Paulo: Graphicars, 290-293, 1939.
- Huckaba T.M. e Pon L.A. Cytokinesis: rho and formins are the ringleaders. *Current Biology*, 10:12(23):R813-814, 2002.
- Jacoby R.F., et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the Min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Research*, 60: 5040–5044, 2000.
- Jayaprakasam B., Seeram N.P., Nair M.G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*, 189:11-16, 2003.
- Johnson D.G. e Walker C.L. Cyclins and the cell cycle checkpoints. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 39:295-312, 1999.
- Jones N., Ijijn K., Dumont D.J., Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, 2: 257 – 267, 2001.
- Jordan M.A., Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(1):123-30, 1998.
- Kandel J., Bossy-Wetzel L., Rabvanyi F., Klagsbrum M., Folkman J., Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, 66:1905–1104, 1991.
- Kawamori T. et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Research*, 58: 409–412, 1998.
- Kim D.K., Choi S.H., Lee J.K., Ryu S.Y., Park D.K., Shin D.H., Jung J.H., Pyo S.K., Zee O.P. *Archives Pharmacal Research*, 20(1):85-87, 1997.
- Koehn F.E. e Carter G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews in Drug Discovery*, 4(3):206-20, 2005.
- Konoshima T., Takasaki M., Kozuka M., Nagao T., Okabe H., Irino N., Nakasumi T., Tokuda H., Nishino H. Inhibitory effects of cucurbitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumor. II. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 18(2): 284-287, 1995.

- Kupchan S.M. Recent advances in the chemistry of terpenoid tumor inhibitors. *Pure Applied Chemistry*, 21: 227-46, 1970.
- Lavie D. e Glotter E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr Chem Org Naturst.*, 29:307-62, 1971.
- Le Men F., Buffard G., Provost J., Tiberghien R., Forgacs P., Albert O., Lagrange E., Aurousseau M. Relation entre la structure de quelques cucurbitacines, leur toxicité et leur activité laxative. *Chimica Therapeutica*, 6: 459-465, 1969.
- Lee Y.S. et al. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *European Journal of Pharmacology*, 465: 191– 198, 2003.
- Liu C.H. et al. Over-expression of cyclooxygenase Cox-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 18563–18569, 2001.
- Lockshin R.A. e Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 2 (7): 545-550, 2001.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J. *Molecular cell biology*. 5 ed – New York: W.H. Freeman and company, 2004.
- Lotem J. e Sachs L. Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia*, 10:925-931, 1996.
- Malumbres M, e Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research*, 5:5-18, 2003.
- Matos, F.J.A. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 40(7/9): 69-76, 1979.
- Mazzocca A., Coppari R., De Franco R., Cho J., Liebermann T.A., Pinzani M., et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor–stromal interactions. *Cancer Research*, 65:4728–38, 2005.
- Medema R.H. e Bos J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Critical reviews in oncogenesis*, 4:615-661, 1993.
- Melino G. The Sirens' song. *Nature*, 412(6842): 23 – 24, 2001.
- Minissi S., Gustavino B., Degrassi F., Tanzarella C., Rizzoni M. Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 14(1):43-9, 1999.
- Miró M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy Research*, 9: 159 – 168, 1995.
- Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*, 33: 261-274, 2000.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63, 1983.
- Mukhopadhyay A., Banerjee S., Stafford L.J., Xia C., Liu M., Aggarwal B.B. Cucurmin induced suppression of cell proliferation correlates with down regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, 21:8852-8861, 2002.
- Neufang G., Furstenberger G., Heidt M., Marks F., Müller-Decker K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98: 7629–7634, 2001.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66 (7): 1022–1037, 2003.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17 (3): 215– 234, 2000.
- Nigg E.A. Cellular substrates of p34(cdc2) and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biology*, 3 : 296-301, 1993.
- Oppenheimer S.B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances *Acta histochemica*, 108: 327—334, 2006.
- Oppenheimer S.B., Edidin M., Orr C., Roseman S. An L-glutamine requirement for intercellular adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 63:1395–402, 1969.
- Oshima M. et al. Suppression of intestinal polyposis in APCD716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Cell*, 87: 803–809, 1996.
- Park M.J., Kim E.H., Park I.C., Lee H.C., et al. Cucurmin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial cells by upregulating cyclin dependent kinase inhibitors p21WAF1/CIP1, p27 Kip1 and p53. *International Journal of Oncology*, 21:379-383, 2002.
- Parsons J.T., Martin K.H., Slack J.K., Taylor J.M., Weed S.A. Focal adhesion kinase: A regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, 19: 5606–5613, 2000.
- Pessoa, C., Ana, E.S., Moraes, M.O., Lima, R. Avaliação da atividade citotóxica da *Jatrofona*. In: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 1994, Fortaleza, v. 13: 301, 1994.
- Peters R.R., Farias M.R., Ribeiro do Vale R.M., Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *W. ebracteata*. *Planta Medica*, 63: 525-528,1997.

- Peters R.R., Saleh T.F., Lora M., Patry C., de Brum-Fernandes A.J., Farias M.R., Ribeiro do Vale R.M. Anti-inflammatory effects of the products from *W. ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sciences*, 64 (26): 2429-2437, 1999.
- Peters R.R., Krepsky P.B., Siqueira-Junior J.M., Rocha J.C.S, Bezerra M.M., Ribeiro R.A., de Brum-Fernandes A.J., Farias M.R., Rocha F.A.C., Ribeiro-do-Valle R.M. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. *Life Sciences*, 73(17):2185-2197, 2003.
- Peters R.R. Avaliação de possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade de produtos derivados de *Wilbrandia ebracteata* COGN. e *Luffa operculata* (L.). Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 87p, 2003.
- Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal*, 308(3): 697-711, 1995.
- Pines J. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 1: E73-E79, 1999.
- Porter P.L., Malone K.E., Heagerty P.J., et al. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Medicine*, 3:222-225, 1997.
- Porto, M.L. Cucurbitaceae - In Schultz, A.R - Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 31(31): 1-64, 1974.
- Rak J., Filmus J., Finkenzeller G., Grugel S., Marme D., Kerbel R.S. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer metastasis Reviews*. 14:263-277, 1995.
- Rao V.S.N., Almeida F.R.C, Moraes A.P., Silva J.V., Nascimento S.C., Moraes M.O. Evaluation of the Purified Fraction of *Wilbrandia* (c.f.) *verticillata* for Antitumour Activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86(2): 43-45, 1991.
- Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1):1-13, 2003.
- Ríos J.L., Giner R.M., Jiménez M.J. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. *Fitoterapia*, 61, 275 – 278, 1990.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671–674, 1997.
- Rocha A.B, Lopes R.M., Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1(4):364-369, 2001.
- Rodriguez-Ayerbe C., Smith-Zubiaga I. Effect of serum withdrawal on the proliferation of B16F10 melanoma cells. *Cell Biology International*, 24(5):279-283, 2000.

- Ruiter M.C., De Poelmann E., Mentink M.M.T., Vaniperen L., Gittenberger-de-Groot A.C. The Early Formation of the Vascular System in Quail Embryos. In: Development of the Vascular System in the Embryo. Ruiter MC (ed.) A concept of the origin of systemic-pulmonary collateral arteries. Cap. 5. Koninklijk.e, Leiden. p. 99 – 186, 1992.
- Santos R.I., Santos M.A., Schenkel E.P. Analysis of the plants drug *Wilbrandia ebracteata* Cogn. International Journal Pharmacognosy. 34(4) 300-302, 1996.
- Schenkel E.P., Farias M.R., Mayer R., Breitmaier E., Rücker G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. Phytochemistry, 31:1329-1333, 1992.
- Shao J., Sheng H., Inoue H., Morrow J.D., DuBois R.N. et al. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. Journal of Biological Chemistry, 275: 33951–33956, 2000.
- Simões C.M.O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre- RS, Editora da UFSC e UFRGS. 3a. ed., 2003.
- Siqueira J.M.Jr, Peters R.R., Gazola A.C., Krepsky P.B., Farias M.R., Era G.A., de Brum-Fernandes A.J., Ribeiro-do-Valle, R.M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. Life Sciences, 80(15): 1382-1387, 2007.
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. et al. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. Annual Reviews of Biochemistry, 69: 145–182, 2000.
- Smits V.A. e Medema R.H. Checking out the G(2)/M transition. Biochimica et Biophysica Acta, 1519(1-2):1-12, 2001
- Solimene A.C.C., Boscardin S.B., Ferraz M.G.C., Chammas R. Angiogenesis in solid tumors. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 1: 9 – 20, 1999.
- Strohmaier H., Spruck C.H., Kaiser P., et al. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. Nature, 413:268-269, 2001.
- Subbaramaiah K., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. Trends in Pharmacological Sciences, 24(2):96-102, 2003.
- Subbaramaiah K., Norton L., Gerald W., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3 Journal of Biological Chemistry, 277: 18649–18657, 2002.
- Subbaramaiah K., Telang N., Ramonetti J.T., Araki R., DeVito B., Weksler B.B., Dannenberg A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. Cancer Research, 56: 4424–4429, 1996.
- Sun J., Blaskovich M.A., Jove R., Livingston S.K., Coppola D., Sebti S.M., et al. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. Oncogene, 24:3236–3245, 2005.

- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncology*, 5:27-36, 2004.
- Sweeney L.J. Hematopoietic System. In: *Basic Concepts in Embryology*. McGraw-Hill, New York. p. 397 – 411, 1998.
- Teixeira L.G.M., Cunha G.M.A., Matos M.E.O., Silva J.C.R., Rao V.S.N. Efeito da Fração purificada da *Wilbrandia (cf) verticilata* na lesão granulomatosa induzida pelo óleo de cróton em ratos. IX Reunião anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 24-27 agosto, Caxambú, p. 193, 1994.
- Tetsu O. e McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398:422-426, 1999.
- Thornberry N.A. e Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 281:1312-1316, 1998.
- Tiano H.F., et al. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Research*, 62: 3395–3401, 2002.
- Tobelem G. Endothelial cell growth: Biology and Pharmacology in relation to angiogenesis. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 1: 703 – 705 1990.
- Tomozawa S. et al. Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522. *British Journal of Cancer* 81: 1274–1279, 1999.
- Tsuji M., Kawano S., Dubois R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of Natural Academy Sciences USA*, 94: 3336–3340, 1997.
- Tsuji M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., Dubois R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93: 705–716, 1998.
- Turner C.E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology*, 2: E231–E236, 2000.
- Ubersax J. et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425:859–864, 2003.
- Valente L.M.M. Cucurbitacins and their main structural characteristics. *Quimica Nova*, 27(6): 944-948, 2004.
- van Nimwegen M.J., van de Water B. Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 73(5):597-609, 2007.
- Vlachos P., Kanitsakis N.N., Kokonas N. Fatal cardiac and renal failure due to *Ecbalium elaterium* (squirting cucumber) *Clinical Toxicology*, 32(6): 737-738, 1994.

- Wang D. e DuBois R.N. Prostaglandins and Cancer. *Gut*, 55(1):115-122, 2006.
- Webb D.J., Donais K., Whitmore L.A., Thomas S.M., Turner C.E., Parsons J.T., Horwitz A.F. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biology*, 6(2):154-161, 2004.
- Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81-323-330, 1995.
- WHO. World Health Organization. Fact sheet no. 297, Fevereiro 2006.
- Williams C.S. et al. Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Research*, 60: 6045–6051, 2000.
- Wilson S., Greer B., Hooper J., Zijlstra A., Walker B., Quigley J., et al. The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochemical Journal*, 388:967–72, 2005.
- Wodarz A. Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biology*, 4(2):E39-44, 2002.
- Yamashiro S., Yamakita Y., Ishikawa R., Matsumura F. Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature*, 344(6267):675-678, 1990.
- Yamashiro S., Yamakita Y., Hosoya H., Matsumura F. Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis. *Nature*, 349: 169–172, 1991.
- Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J. Vascular - specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242 – 247, 2000.
- Yesilada E., Tanaka S., Sezik E., Tabata M. Isolation of an anti-inflammatory principle from the juice of *Ecballium elaterium*. *Journal of Natural Products*, 51(3): 504 – 508, 1988.
- Zhang F., Subbaramaiah K., Altorki N., Dannenberg A.J. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 2424–2428, 1998.
- Zhang Y., Wang Z., Liu D.X., Pagano M., Ravid K. Ubiquitin dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 1387– 1392, 1998.