

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA**

Annelise de Carvalho

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE  
CARDENOLÍDEOS EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carvalho, Annelise de

Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos em células tumorais [dissertação] / Annelise de Carvalho ; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões - Florianópolis, SC, 2012.

126 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Atividade biológica. 3. Produtos naturais. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Aos meus pais Jucan e Valéria  
pelo apoio, amor incondicional,  
e compreensão, e à Professora  
Cláudia pelo aprendizado  
ímpar e incentivo.



## AGRADECIMENTOS

Há uma hesitação paradoxal na escrita livre da gratidão, mas a certeza de que tantas pessoas foram tão importantes nesta jornada é, sem dúvida, o que me leva a alegremente compor estes agradecimentos.

Lembro com gratidão daqueles que, em meus primeiros meses no laboratório, tiveram a paciência de me ensinar com tanta disposição, principalmente Thiago e Jéssica. Agradeço também a todos os outros que pouco a pouco - ou intensamente - passaram a compartilhar conhecimento e experiência no dia-a-dia do laboratório, bem como tantas lições da vida. Sou grata àqueles que estavam desde o início, Fran, Ariadne, Carol, Naira, Jéssi, Iza, Thiago, Vanessinha, Marina, Mari Rangel, Mari Nascimento, e àqueles que vieram depois, Fabi, Gis, Carlos, Clarissa, Debora, Jadel, Ricardo e Lucas Marostica. Um grupo tão diverso, com tantas características distintas e que tanto acrescentou à minha jornada. Sou grata a vocês pela alegria contagiante e entusiasmo naqueles dias em que nada parece dar certo e pelo companheirismo e amizade nas celebrações. A calma e gentileza de alguns, assim como a ousadia e bronca de outros nas horas necessárias, como aquele abraço nos momentos em que palavras já não têm efeito, foram marcantes. A prontidão e o compromisso com o trabalho e com os relacionamentos de alguns me ensinaram bastante. Agradeço a sensibilidade, o companheirismo e a amizade de vocês. São marcas que não estarão impressas em qualquer tipo de artigo escrito, mas dentro de mim, esperando que possam ser estendidas a outros nas encruzilhadas da vida. Obrigada Thiago, Iza, Gis, Fabi, Carlos e Clari pelo compartilhar mais próximo e amizade especial de vocês. Agradeço à Professora Célia e especialmente à Professora Cláudia, pela oportunidade, orientação e amor pela pesquisa que me incentivaram a dar esses primeiros passos com entusiasmo e compromisso.

Agradeço também aos colegas de outros laboratórios, Elisa, Pati, Nina, Nana, Paula e Bibiana pela prontidão em ajudar sempre. Agradeço ao Prof. Rodrigo Bairy Leal e seus alunos Ana Paula, Mark e Débora e à Profa. Maria Cláudia Santos da Silva e sua aluna Lorena, pelo auxílio e disposição na execução de alguns ensaios. Também fica meu agradecimento especial ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia, pelo acolhimento, parceria e portas abertas.

Agradeço ao Prof. Fernão Castro Braga, ao Prof. Wolfgang Kreis e ao Dr. Rodrigo Maia de Pádua, pelo fornecimento dos compostos, permitindo a realização deste trabalho. Também ao

Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela concessão da bolsa de Mestrado por 24 meses, e ao CNPq pelo apoio financeiro através do Edital 555.037/2010-0.

A expressão de gratidão pelos amigos da graduação que continuam suas jornadas e acompanharam de perto tem um valor todo especial pela construção de uma amizade cheia de cumplicidades. Obrigada Gabi, Ana, Solomon, Carol e Cassi!

Aos amigos que moram em '*Far Far Away*' e que sempre estão perto do coração, encontrando mil maneiras de se comunicar e fazer parte, conferindo um significado especial à palavra *irmão*: Gabi, Lindsay, Rachel, Lu, Lê e Keka, fica minha gratidão pela amizade ímpar. Agradeço a Renata, Eric, Carol Julieta e Stéphanie, amigos tão próximos e presentes nesta jornada, os quais dividiram seu tempo, alegrias e frustrações de maneira tão única e sincera. Também àqueles que foram lembrança e expressões presentes de alegria, amor, verdade e esperança no decorrer do caminho, através dos cafés, conversas, aventuras, estudos, arte e pôres do sol. Obrigada Ana Carla, Giovanna e Miguel, Franz, Fran e Bê, Chico, Gui e Taís. E Obrigada ao pessoal da ABU por fazer parte.

Agradeço ainda a surpresa mais que agradável e tão especial durante o mestrado que foi o Pieter. Obrigada pelo apoio e tantos esforços durante este ano para encurtar a distância e mostrar uma face toda nova e cativante do amor, Piet.

Aos meus pais, Jucan e Valéria, agradeço por todo o suporte, carinho e ombros, broncas e incentivos, pelo ensinamento do servir com alegria e compromisso, e pelo equilíbrio entre o encarar a vida com suas dificuldades e maldades e não deixar de sonhar e lutar pelo que é bom e justo. Obrigada pelo compartilhar tão precioso da vida - o amor e amizade de vocês são tesouros inigualáveis. Sou grata à Dedéia, pela maneira como muitas vezes me ajudou a rir de mim mesma e a firmar convicções nas lições aprendidas. A tia Jacira, que é mais que uma tia; sua bondade e amor são tão profundos que refletem algo sobrenatural.

A gratidão tem este paradoxo implícito, porque ela é grande, forte e extensa, mas traz leveza e alegria. É desta maneira que reconheço a razão de toda esta graça concedida por Aquele que creio ser a fonte de vida abundante. A gratidão pela conclusão de uma etapa, pelas pessoas no caminho, pelas correções, pelo pôr-do-sol pós tempestade, pelas dádivas imerecidas e a esperança no fim do dia é a Ele. Obrigada, Deus.

Annelise de Carvalho

## RESUMO

Os cardenólídeos são metabólitos secundários encontrados na natureza e assim denominados em razão de sua ação inibitória na bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ) e decorrentes efeitos sobre o músculo cardíaco. Por esta razão, cardenólídeos, tais como digoxina, digitoxina e ouabaína, são clinicamente utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e algumas arritmias atriais. Nos últimos anos, vários estudos relataram a potencial atividade citotóxica, antitumoral e anticâncer de alguns cardenólídeos. Mundialmente, o câncer de pulmão é um dos principais responsáveis pela alta taxa de mortalidade atribuída ao câncer. O tratamento atual deste câncer depende do estágio do paciente e são utilizadas abordagens combinadas ou individuais, tais como excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A taxa de sobrevivência dos pacientes, no entanto, não é elevada, tornando a busca por novos agentes no combate a este câncer uma necessidade. Neste trabalho, foi realizada uma triagem citotóxica, em células tumorais humanas A549, com 64 cardenólídeos e um dos compostos mais citotóxicos ( $\text{CI}_{50} < 100 \text{ nM}$ ) foi selecionado para investigação do seu mecanismo de ação, através de vários ensaios. Este composto, que se apresentou mais tóxico e mais seletivo para células tumorais foi o glucoevatromonosídeo e para a avaliação de seu mecanismo de ação uma série de ensaios foi realizada. Inicialmente, ele provocou o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, o que foi atribuído à diminuição da expressão da proteína ciclina B1, necessária para a progressão do ciclo celular. A indução de morte celular, por ele causada, não ocorreu por apoptose ou necrose, sendo provavelmente por autofagia, processo observado com a marcação de partículas ácidas, características deste tipo de morte celular. O envolvimento deste composto em vias de sinalização de morte celular foi constatado por alterações na expressão de proteínas das vias AKT, MAPK e NF- $\kappa$ B. Por fim, a atividade anti-ATPásica detectada não mostrou correlação da inibição desta enzima com a atividade citotóxica apresentada pelos compostos selecionados na triagem. A citotoxicidade promissora do glucoevatromonosídeo foi investigada e confirmada sua indução de morte celular independente de apoptose em células A549.

**Palavras-chave:** cardenólídeos; atividade citotóxica; câncer de pulmão; mecanismo de ação citotóxico; autofagia.

## ABSTRACT

Cardenolides are secondary metabolites found in nature and named after their known inhibitory action on the sodium pump ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ), and effect on the heart muscle. For this reason cardenolides as digoxin, digitoxin and ouabain are used in the treatment of congestive heart failure and atrial arrhythmias. In the past years, many were the reports on the cytotoxic, antitumoral and anticancer activities of cardenolides. Lung cancer is one of the leading causes of death by cancer worldwide. Current treatment of lung cancer depends on the stage of the patient and both combined and individual approaches are used, such as surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, the observed survival rate is not high, which stimulates the search for new agents for the treatment of this cancer. In the present work a cytotoxic screening with 64 cardenolides was performed and the most cytotoxic compound selected ( $\text{CI}_{50} < 100 \text{ nM}$ ) to further investigate its mechanism of action. The most cytotoxic and selective compound for cancer cell lines was glucoevatromonoside and to evaluate its mechanism of action a series of assays was carried out. Initially, this compound was able to block phase G2/M of cell cycle, which was attributed to the decrease in the expression of cyclin B1 protein, essential to the cell cycle progression. The investigation of the cytotoxic effect of this compound showed that the induced cell death was not apoptosis or necrosis mediated, and so might be through autophagy, as observed with the acridine orange marked acidic particles, a characteristic event of this type of cell death. Involvement of this compound in signaling pathways was verified through its ability to trigger alterations in the expression of AKT, MAPK and NF- $\kappa$ B proteins. The detected anti ATPase activity did not show correlation of the enzyme inhibition with the cytotoxic activity presented by the compounds selected in the screening. Hereby, the promising cytotoxic activity of glucoevatromonoside was investigated and confirmed its apoptosis-independent cell death induction in A549 cells. It was suggested that cell death was caused by cell cycle arrest and autophagy induction with signaling pathways involved.

**Keywords:** cardenolides; cytotoxic activity; lung cancer; mechanism of action; autophagy

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Estruturas químicas de alguns dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer de pulmão.....                              | 23 |
| <b>Figura 2:</b> Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.....  | 29 |
| <b>Figura 3:</b> Proteínas envolvidas na sinalização da necroptose.....   | 30 |
| <b>Figura 4:</b> Processo celular da autofagia.....   | 32 |
| <b>Figura 5:</b> Estrutura química de um cardenolídeo.....  | 34 |
| <b>Figura 6:</b> Estruturas químicas dos cardenolídeos avaliados frente a linhagens celulares tumorais quanto a citotoxicidade.....           | 37 |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura química do composto 4 (glucoevatromonosídeo).....  | 71 |
| <b>Figura 8:</b> Histogramas da determinação do conteúdo de DNA da linhagem celular A549 do composto 4.....                                   | 73 |
| <b>Figura 9:</b> Resultado da determinação do conteúdo de DNA nas células A549 do composto 4.....   | 73 |
| <b>Figura 10:</b> Dotplot da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP) do composto 4.....                | 76 |
| <b>Figura 11:</b> Resultado da avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP) do composto 4..... | 77 |
| <b>Figura 12:</b> Avaliação da morte celular através da ativação da caspase 3 por clivagem do substrato específico pelo composto 4.....       | 79 |
| <b>Figura 13:</b> Marcação com laranja de acridina dos agregados acídicos de células A549 autofágicas tratadas com composto 4.....            | 82 |

**Figura 14:** Efeito do composto 4 na expressão da proteína ciclina B1 do ciclo celular.....83

**Figura 15:** Efeito do composto 4 na expressão de proteínas das vias AKT e ERK.....87

**Figura 16:** Efeito do composto 4 na expressão de proteínas das vias NF- $\kappa$ B e p38.....88

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Características das principais vias de morte celular e suas formas de detecção.....25
- Quadro 2:** Tipos de morte celular decorrentes dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos, em diferentes linhagens de células tumorais.....39
- Quadro 3:** Cardenolídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas.....45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Resultados da avaliação de uma série de cardenolídeos, com relação à potencial inibição do crescimento das células A549 e RD.....67

**Tabela 2:** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células VERO, dos cardenolídeos mais tóxicos para as células A549.....70

**Tabela 3:** Inibição da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  pelos cardenolídeos mais citotóxicos .....92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1: Fator ativador de protease apoptótica  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
ATG: Proteína autofagia gene-relacionada  
ATP: adenosina trifosfato  
BSA: proteína soroalbumina bovina  
CC: Controle celular  
CC<sub>50</sub>: Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular  
CDK: Proteína quinase dependente de ciclina  
CI<sub>50</sub>: Concentração que inibe 50% da proliferação celular  
CIP: Proteína de interação com CDK  
CPCNP: Câncer de pulmão de células não-pequenas  
DEVD-pNA: substrato específico de caspase-3  
DNA: Ácido desoxiribonucleico  
DO: Densidade ótica  
DR: Receptor de morte  
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético  
ERK: Proteína quinase regulada por sinal extracelular  
FasL: Fragmento ligante estimulador de apoptose  
FDA: *Food and Drug Administration*  
HSV-1: *Herpes Simplex Virus* tipo 1  
HSV-2: *Herpes Simplex Virus* tipo 2  
IARC: *International Agency for Research on cancer*  
ICC: Insuficiência cardíaca congestiva  
IKK: Proteína quinase IκB  
IL-8: Interleucina-8  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
INK: inibidor de CDK  
IP: Iodeto de propídeo  
JNK: Proteína quinase Jun N-terminal  
KIP: Inibidor de proteína quinase  
LC3: proteína de cadeia leve associada ao microtúbulo  
LVA: Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC  
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno  
MDC: Monodansilcadaverina  
MEM: *Minimal Essential Medium*, Meio Essencial Mínimo  
MM: Massa molecular  
MRC-5: Linhagem celular proveniente de fibroblastos de pulmão humano

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio, sal de tetrazólio  
NCCD: Comitê de Nomenclatura em Morte Celular  
NKATPase: Bomba de sódio e potássio ATPase  
NCI: *National Cancer Institute*  
NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B  
pNA: p-nitroanilina  
P&D: Pesquisa&Desenvolvimento  
PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Tampão fosfato  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
P.I.: Pós-infecção  
PI3K: Proteína quinase fosfatidil-inositol-3  
PKB: proteína quinase B  
PSA: Solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina  
PVDF: polifluoreto de vinilideno  
Rb: proteína do Retinoblastoma  
RD: Linhagem celular proveniente de rabdmiosarcoma de humanos  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro  
RT-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase  
SA- $\beta$ -gal: Galactosidase associada à senescência  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SFB: Soro fetal bovino  
TNF: Fator de necrose tumoral  
TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral  
UV: Ultravioleta  
V: Volts  
VERO: Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1 Câncer .....   | 19        |
| 2.2 Vias de morte celular e alvos terapêuticos.....  | 24        |
| 2.3 Cardenolídeos .....  | 33        |
| 2.3.1 Estrutura química e principal ação farmacológica .....   | 33        |
| 2.3.2 Outras atividades farmacológicas dos cardenolídeos.....  | 35        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>   | <b>43</b> |
| 3.1 Objetivo geral .....   | 43        |
| 3.2 Objetivos específicos .....  | 43        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1 Materiais de estudo .....  | 45        |
| 4.2 Culturas celulares.....  | 57        |
| 4.2.1 Células .....  | 57        |
| 4.2.2 Meios de cultura e reagentes.....  | 57        |
| 4.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais .....  | 58        |
| 4.5 Avaliação do mecanismo de ação citotóxica em células tumorais..  | 59        |
| 4.5.1 Avaliação do efeito do composto 4 na progressão do ciclo das células A549, por citometria de fluxo.....                        | 59        |
| 4.5.2 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pelo composto 4, nas células A549, por citometria de fluxo ..... | 60        |
| 4.5.3 Avaliação da capacidade do composto 4 de clivar substratos da caspase-3.....   | 61        |
| 4.6 Avaliação da indução de morte celular autofágica pelo composto 4, em células A549.....   | 61        |
| 4.7 Avaliação dos efeitos do composto 4 na expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, em células A549 .....         | 62        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.8 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica dos cardenolídeos mais citotóxicos .....  | 63         |
| 4.10 Delineamento experimental e análise estatística.....  | 64         |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>65</b>  |
| 5.1 Avaliação da citotoxicidade.....   | 65         |
| 5.2 Avaliação da seletividade em células VERO.....   | 69         |
| 5.3 Avaliação do mecanismo da ação citotóxica em células A549.....   | 71         |
| 5.3.1 Avaliação do efeito do composto 4 na progressão do ciclo das células A549, por citometria de fluxo.....                        | 71         |
| 5.3.2 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pelo composto 4, nas células A549, por citometria de fluxo ..... | 74         |
| 5.3.3 Avaliação da capacidade do composto 4 de clivar substratos da caspase-3.....   | 78         |
| 5.3.4 Avaliação da indução de morte celular autofágica pelo composto 4, em células A549 .....  | 80         |
| 5.3.5 Avaliação dos efeitos do composto 4 na expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, em células A549 .....       | 82         |
| 5.4 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica dos cardenolídeos mais citotóxicos .....  | 91         |
| 5.5 Considerações finais sobre o mecanismo de ação .....   | 94         |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>7 PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>8 OUTRAS ATIVIDADES.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>101</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>  | <b>121</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e é, portanto, uma preocupação mundial, podendo ser destacado o câncer de pulmão, já que esse é o responsável pelo maior número de óbitos, no Brasil (BRASIL/INCA, 2011). Assim sendo, intervenções preventivas e terapêuticas vêm sendo extensamente investigadas ao longo dos anos, sendo que a quimioterapia desempenha um papel importante no tratamento do câncer.

Os produtos naturais são fonte de uma série de metabólitos secundários que apresentam ampla diversidade estrutural e constituem fonte de compostos precursores para a pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de novos fármacos para o tratamento do câncer (BINDSEIL et al., 2001; FIRN; JONES, 2003; PAN; CHAI; KINGHORN, 2012). Dos fármacos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde, estima-se que 11% sejam provenientes estritamente de plantas, como por exemplo, digoxina, quinina, vincristina, atropina e morfina ( RATES, 2001). Uma estimativa feita em 1998 previa que 60% dos então atuais e dos futuros fármacos anticâncer e anti-infecciosos eram originários de produtos naturais. Posteriormente, um levantamento feito até o ano de 2006 nos mercados farmacêuticos da América do Norte, Europa e Japão mostrou que 48,6% do total de 155 fármacos anticâncer clinicamente aprovados provêm de produtos naturais (SHU, 1998; NEWMAN; CRAGG, 2012). Além disso, de vários candidatos com este potencial encontram-se em fase clínica (PAN; CHAI; KINGHORN, 2010; PAN; CHAI; KINGHORN, 2012).

Atualmente, vários são os fármacos de origem natural ou obtidos por síntese ou semissíntese utilizados no tratamento de alguns tipos de leucemias e tumores sólidos (PAN; CHAI; KINGHORN, 2010). Em razão do alto custo e longo período necessário para a P&D de novos agentes anticâncer, a descoberta de tal potencial para fármacos já conhecidos e utilizados clinicamente pode ser considerada um atalho relevante, que pode em muito contribuir nesta área do setor farmacêutico (HUNG; LIU, 2012). Os cardenolídeos se enquadram nesta situação, já que a jornada de investigação desses compostos como potenciais anticâncer iniciou-se a partir de evidências epidemiológicas e somente depois ocorreram as investigações *in vitro* (DUEÑAS-

## 18 Introdução

GONZALEZ et al., 2008). Um grande aumento no número de relatos sobre efeitos citotóxicos, antitumorais e anticâncer dos cardenólídeos foi observado nos últimos quinze anos e o interesse na P&D de cardenólídeos com tais efeitos vem se intensificando. Em uma triagem com mais de 9.000 compostos para alvos terapêuticos em genes do câncer de próstata, os cardenólídeos estavam entre os mais potentes (JOHNSON et al., 2002). Na busca de Lindholm e colaboradores (2002) por novos compostos citotóxicos a partir de 100 diferentes extratos de plantas, três delas, contendo cardenólídeos estavam entre as sete com maior potencial antitumoral. O grande interesse é decorrente não apenas dos potentes efeitos antiproliferativos, mas também por causa do efeito diferenciado em células saudáveis, em relação às células tumorais. Estas constatações justificam e incentivam a busca por novos e potentes cardenólídeos com potencial atividade anticâncer (MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012b). Apesar dos vários estudos realizados *in vitro* com esta classe de compostos, são poucas as investigações *in vivo* ou estudos clínicos em andamento.

O Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC vem, há vários anos, avaliando a citotoxicidade (frente a linhagens de células saudáveis e também linhagens celulares tumorais), a genotoxicidade e a potencial atividade antiviral de produtos naturais e de compostos sintéticos. a fim de complementar os estudos realizados e implementar diferentes e novas metodologias, ensaios *in vitro* que buscam detectar a morte celular e a elucidação do mecanismo de citotoxicidade envolvendo células tumorais vêm sendo estabelecidos nesse Laboratório, tendo em vista a importância de se definir o tipo e o perfil de morte envolvida na eliminação de tumores. Soma-se a isso a necessidade do detalhamento extensivo do mecanismo de ação, da melhora do índice terapêutico, dos estudos da relação estrutura-atividade, bem como dos dados provenientes dos ensaios clínicos em andamento, os quais deverão guiar a P&D dos cardenólídeos candidatos à fármacos anticâncer, em futuro próximo (MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012b). Diante do exposto acima, da disponibilidade de 64 cardenólídeos e da necessidade da P&D de novos fármacos para o combate ao câncer de pulmão, esta dissertação teve como objetivo realizar uma triagem citotóxica em duas linhagens de células tumorais humanas, bem como investigar o mecanismo da ação citotóxica, em células tumorais humanas de pulmão (A549) do cardenólídeo que apresentou a atividade mais promissora.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer

Esta palavra, câncer, deriva do termo grego para “caranguejo”, *karkinos*, e foi cunhada diante da observação feita por Hipócrates, por volta de 400 a.C., de uma massa (tumor) com vasos sanguíneos inchados à sua volta, lembrando um caranguejo (MUKHERJEE, 2012). Embora essa seja a descrição de alguns dos tumores superficiais conhecidos, atualmente o câncer se refere à neoplasias e é caracterizado pelo crescimento e proliferação de células transformadas, bem como pela capacidade de invasão de tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, fenômeno denominado de metástase e específico dos tumores malignos (DE ALMEIDA, 2005).

Quase 200 tipos de tumores originados dos vários sistemas de células do corpo são conhecidos e os fatores de risco relacionados ao aparecimento do câncer podem ser hereditários ou encontrados no meio ambiente, e é a esse último que é atribuída a maioria dos casos. Apesar de ser um processo complexo, acarretado por diversos fatores genéticos e ambientais, as alterações que desencadeiam em neoplasias ocorrem pela ativação, através de agentes carcinogênicos, de genes denominados proto-oncogenes, inativos nas células normais, ou pela inibição de genes supressores de tumores, que culmina em proliferação e crescimento celulares descontrolados, transformando as células saudáveis em tumorais. Para que o dano causado ao DNA seja transmitido às células filhas é necessário que ocorra também a replicação do DNA e a divisão celular, promovendo assim o efeito mutagênico (BENSON; LIAU, 2008; TAYLOR; LADANYI, 2011).

Diante da necessidade do suprimento de tal demanda energética destas células, a criação de vasos ao redor do tumor se faz necessária (angiogênese), bem como existe a possibilidade de desprendimento e migração deste tumor para outros tecidos. Os tumores malignos, ao contrário dos benignos, são capazes de desenvolver fatores de adesão e migração, adquirindo assim a característica de invasividade (YAMAGUCHI et al., 2005). As alterações observadas pelas mutações causadas nestes genes são diversas e conhecidas como marcadores clássicos do câncer (em inglês, *hallmarks*), sendo elas a autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais

## 20 Revisão Bibliográfica

inibitórios de crescimento, a evasão à morte celular programada (apoptose), o potencial ilimitado de replicação, a angiogênese sustentada, a invasão tecidual e metástase, e duas características ainda emergentes, que são a desregulação energética celular e a evasão da destruição imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Deve-se observar, no entanto, que várias destas características são também atribuídas a tumores benignos, sendo que os tumores malignos diferenciam-se pela capacidade de invadir outros tecidos e formar novos tumores (LAZEBNIK, 2010).

A carcinogênese, ou seja, a formação do câncer, é um processo multifatorial, em que cada evento resulta de alterações genéticas, as quais conduzem à transformação progressiva de células saudáveis em células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Os eventos diversos e interdependentes ocorrem em estágios, conhecidos como iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, um agente promotor de carcinogênese (agente carcinógeno) age no DNA celular e nesse estágio a susceptibilidade genética pode contribuir. A promoção da carcinogênese é um processo que ocorre de maneira lenta, em que a exposição ao agente carcinógeno deve ser constante para que ocorra a progressão. Nesse estágio, a dieta e o estilo de vida podem promover efeitos benéficos e, até mesmo, prevenir o desenvolvimento do câncer. Já o terceiro estágio, refere-se à progressão e expansão do câncer, sendo um processo irreversível, que evolui até o aparecimento das manifestações clínicas (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003; DE ALMEIDA et al., 2005).

Atualmente, o tratamento do câncer pode ser feito por meio de diferentes abordagens, dependendo do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento, e incluem a remoção dos tumores por excisão cirúrgica, no caso de tumores localizados, radioterapia e quimioterapia. Estas abordagens, juntamente com algumas técnicas adjuvantes emergentes, como a fototerapia dinâmica e a imunoterapia, podem ser utilizadas separadamente ou em conjunto. (DE ALMEIDA et al., 2005; BORGHAEI; SMITH; CAMPBELL, 2009). Na incapacidade das medidas locais, através de cirurgia ou radioterapia, em conter o câncer em razão do desenvolvimento de metástase, há necessidade do tratamento sistêmico por quimioterapia, a qual emprega medicamentos administrados via intravenosa (em sua maioria) ou via oral. A quimioterapia visa à exterminação das células tumorais, sem causar a morte da população de células saudáveis dos tecidos, o que muitas

vezes não ocorre, acarretando danos principalmente às células de rápido crescimento, o que explica parte dos efeitos colaterais observados na quimioterapia. No entanto, os benefícios em relação à toxicidade devem ser considerados, a fim de se obter um índice terapêutico favorável (DE ALMEIDA et al., 2005).

Os agentes antineoplásicos mais estudados e utilizados atualmente no tratamento do câncer são classificados de acordo com o mecanismo de ação, sendo que a maior parte deles interfere na divisão celular. Assim sendo, são conhecidos como fármacos ciclo-celular específicos, dentre os quais se encontram, por exemplo, agentes antimetabólitos, alcaloides e hormônios. Já os fármacos ciclo-celular não específicos, como os antibióticos, complexos de platina e agentes alquilantes apresentam a capacidade de eliminar as células tumorais, apesar de estarem atravessando o ciclo celular (DE ALMEIDA et al., 2005).

A compreensão das características clássicas do câncer, apontadas por Hanahan e Weinberg (2011), é fundamental na definição de alvos terapêuticos, uma vez que compostos que afetam diretamente alguma ou várias destas características essenciais ao crescimento e progressão do tumor, são potenciais candidatos a fármacos. Além disso, Cao e colaboradores (2011) previram, para os próximos anos, que o tratamento do câncer irá envolver estratégias que não somente identifiquem a importância de um determinado gene no aparecimento do câncer, mas que também considerem o contexto biológico. Deve-se considerar, ainda, se a extinção deste gene poderá promover a regressão de um determinado tumor e de que maneira isto se relacionará com as características clássicas do câncer, pois a resposta duradoura e efetiva vai depender da ação múltipla de um ou mais agentes em alvos distintos.

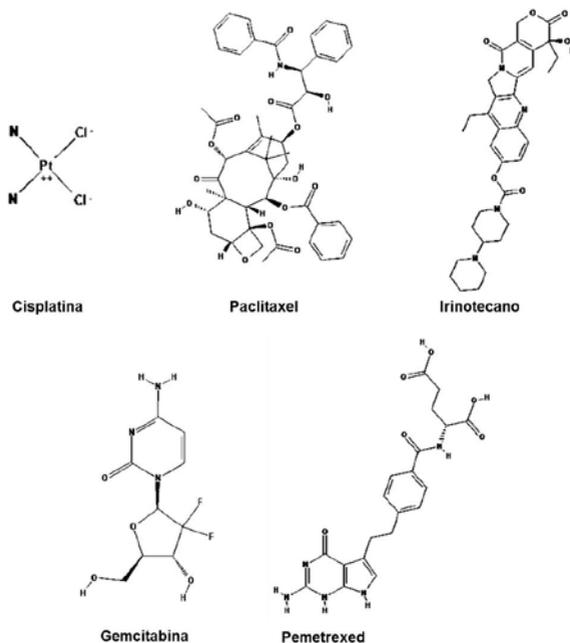
O câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo e foi responsável por cerca de 13 % do total de mortes registradas em 2008, com estimativas crescentes para os próximos anos. No Brasil, mais de 500.000 novos casos de câncer foram estimados para o ano de 2012 sendo os de maior incidência, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e colo do útero, no sexo feminino. A incidência estimada para a região sul do Brasil, neste mesmo período, é de mais de 90.000 casos e no Estado de Santa Catarina pouco mais de 19.000 casos (BRASIL/INCA, 2011).

## 22 Revisão Bibliográfica

O câncer de pulmão se apresenta como a causa mais importante de morte por câncer no mundo, com incidência de 1,6 milhões (12,7% de todos os novos casos de câncer) na última estimativa mundial, realizada em 2008 (FRANÇA/IARC, 2008). A incidência no Brasil, estimada para o ano de 2012, é de quase 30.000 casos, sendo também o segundo câncer mais prevalente no sexo masculino, sem considerar os tumores de pele não melanoma, na região sul do Brasil (BRASIL/INCA, 2011). Um estudo sobre morbidade e mortalidade da população idosa de Florianópolis mostrou que o câncer de pulmão, depois das doenças do aparelho circulatório, é a maior causa de mortalidade de idosos do sexo masculino no município (VIRTUOSO et al., 2010).

A maioria dos casos de câncer de pulmão está relacionada à exposição ao tabaco (cerca de 80%) e por ser um câncer geralmente detectado em fases avançadas, é uma doença bastante letal, com razão mortalidade/incidência de, aproximadamente, 86% (BRASIL/INCA, 2011).

Aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão se apresentam como câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) (KOH et al., 2012) e, na maioria dos casos, é necessária intervenção cirúrgica seguida de quimioterapia, podendo ainda combiná-las à radioterapia. Nos casos mais avançados, a quimioterapia e a administração de inibidores de marcadores específicos deste câncer são utilizados para o controle dos sintomas. Os fármacos mais comumente utilizados na quimioterapia do CPCNP apresentam mecanismos de ação distintos e incluem os derivados da platina (cisplatina e carboplatina), paclitaxel, irinotecano, gemcitabina, vinorelbina e pemetrexed (estruturas químicas de alguns exemplificadas na figura 1).



**Figura 1:** Estruturas químicas de alguns dos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer de pulmão.

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

No entanto, a taxa de sobrevivência e o prognóstico observados para estes pacientes, quaisquer que sejam as abordagens, são ruins. (KOH et al., 2012). As células de carcinoma de pulmão possuem características que conferem resistência à morte celular, tanto apoptótica como não apoptótica, e o tratamento com fármacos quimioterápicos para este tipo de câncer é bastante limitado, devido ao restrito efeito terapêutico, o que explica o expressivo número de óbitos ocasionados por este câncer. A terapia personalizada, ou seja, o reconhecimento e a consequente abordagem de cada tipo de tumor e as vias de sinalização com uma terapia única e não generalizada constitui uma importante ferramenta terapêutica no combate ao câncer (CAO et al, 2011).

A potencial ação anticâncer de uma amostra qualquer *in vitro* é

## 24 Revisão Bibliográfica

avaliada através de ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares tumorais. Os termos citotóxico, antiproliferativo, antitumoral e anticâncer são definidos de maneira distinta, segundo proposto pelo *National Cancer Institute* (NCI-EUA). O termo citotóxico se refere a agentes tóxicos para células tumorais *in vitro*, os quais causam morte celular por diferentes mecanismos. A atividade antitumoral é determinada para ensaios *in vivo* em modelos animais, enquanto que o termo anticâncer é utilizado para agentes que apresentam atividade em humanos. Desde 1955, este Instituto é responsável pela realização do mais importante programa de triagem de compostos com atividade citotóxica. Nesse programa, os compostos são testados quanto às suas potenciais atividades citotóxica e antiproliferativa, através de um painel de 60 diferentes linhagens celulares, originadas de sete diferentes tipos de tumores (cerebral, cólon, leucemia, pulmão, melanoma, ovário e renal) e incluindo também linhagens resistentes a fármacos (SUGGITT; BIBBY, 2005).

Os produtos naturais como fonte de novos agentes se destacam no desenvolvimento de novos fármacos para os mais variados tipos de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2007). A utilização com sucesso de fármacos derivados de produtos naturais na terapia do câncer, como por exemplo, a podofilotoxina, o paclitaxel, a camptotecina e os alcalóides da vinca, intensificaram a P&D de novas moléculas provenientes de produtos naturais como potenciais agentes quimioterápicos (HARVEY, 2008). Apesar de, nos últimos anos, a indústria farmacêutica ter buscado estratégias de menor custo e tempo, o que ocasionou uma importante queda no investimento nas investigações com produtos naturais, este quadro vem sendo revertido pela implementação de novas tecnologias, demonstrando a importância da P&D a partir desta diversa e rica fonte de novas moléculas (PAN et al., 2012).

### **2.2 Vias de morte celular e alvos terapêuticos**

Segundo recomendações do Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD), a categorização de morte celular deve ser feita através das características morfológicas e enzimáticas, aspectos funcionais ou características imunológicas (KROEMER et al., 2009). Para caracterizar a morte celular devem ser realizados ensaios que identifiquem os eventos bioquímicos e as alterações morfológicas decorrentes. Os principais tipos de morte celular, bem como as

características morfológicas e bioquímicas estão resumidos no Quadro 1.

**Quadro 1:** Características das principais vias de morte celular e as formas de detecção.

| Via de morte | Características morfológicas   | Características bioquímicas  | Métodos de detecção  |
|--------------|--|--|--|
| Apoptose     | Condensação de cromatina; fragmentação nuclear; prolongamentos membranários; formação de corpos apoptóticos; arredondamento celular; retração de pseudópodos | Dependente da ação de caspases; fragmentação nuclear; exposição da fosfatidilserina  | Dupla coloração com Anexina V/Iodeto de Propídeo; atividade de caspases, citometria de fluxo   |
| Autofagia    | Formação de vesículas autofágicas; não há fragmentação nuclear ou condensação de cromatina   | Independente da ação de caspases e do gene p53; elevada atividade lisossomal; dissociação de Beclina-1 de BcL-2/X <sub>L</sub> ; Dependência de produtos do genes atg; conversão de LC3-I a LC3-II | Coloração com MDC (Monodansilcadaverina); ensaios de degradação protéica; estudos de imunoprecipitação; estudos genéticos, microscopia de imunofluorescência |

**Quadro 1:** Características das principais vias de morte celular e as formas de detecção. (continuação)

| Via de morte        | Características morfológicas   | Características bioquímicas   | Métodos de detecção   |
|---------------------|--|---|---|
| Mitose catastrófica | Células gigantes; múltiplos micronúcleos; cromossomos não condensados  | Independente da ação de caspases e do gene p53; ativação anormal do complexo CDK1/ciclina B1                        | Marcadores mitóticos; microscopia para a detecção de micronúcleos e células multinucleadas  |
| Necrose             | Degradação do DNA; formato nuclear atípico com vacuolização; inchaço de organelas citoplasmática; rompimento de membrana celular | Ativação de calpaínas e catepsinas; ruptura da membrana plasmática  | Ensaio baseado em substratos colorimétricos de lisados celulares; permeabilidade a corantes (azul de tripan e iodeto de propídeo); citometria de fluxo, determinação de enzimas citosólicas |
| Senescência         | Tamanho celular aumentado; telômeros curtos  | Superexpressão da $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal); dependente da ação do gene p53 | Coloração para SA- $\beta$ -gal   |

Fonte: adaptado de OKADA; MAK (2004); KROEMER et al (2009).

Apesar do recente debate sobre os diferentes tipos de morte celular e suas características, do ponto de vista terapêutico, faz-se necessário abordar a questão de maneira prática, buscando avaliar se o objetivo final é alcançado, ou seja, a morte das células tumorais (KREUZALER; WATSON, 2012).

Ainda que a apoptose seja o principal mecanismo de morte celular investigado em resposta às terapias citotóxicas, outros tipos de morte celular devem ser considerados, com o mesmo propósito de induzir a morte de células tumorais e prevenir a proliferação e possível invasão de outros tecidos. Vários são os fatores determinantes do tipo de morte celular induzida por um determinado agente. Estes fatores incluem o tipo celular, o genótipo da célula, o microambiente em que ela se encontra, o tipo de dano induzido pelo agente, bem como a dose utilizada (TAN; WHITE, 2008). No decorrer da última década, com o aprofundamento dos estudos sobre apoptose foram identificados diversos eventos de evasão à apoptose, o que acarretou na descoberta de outras vias de morte celular, independentes da apoptose (KREUZALER; WATSON, 2012). Desta maneira, e tendo em vista que a evasão à morte celular é uma das características clássicas do câncer (HANNAH; WEINBERG, 2011), a compreensão de outros tipos de morte celular se faz necessária na busca por novas abordagens que superem, principalmente, a resistência à apoptose, induzida por determinados fármacos (TAN; WHITE, 2008).

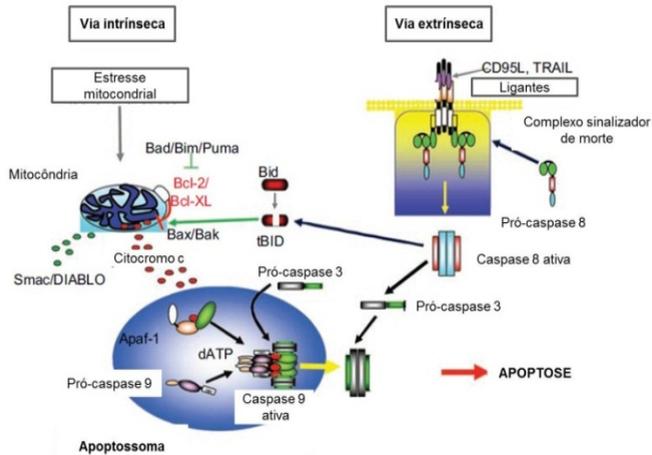
A apoptose é o processo de morte celular necessário ao organismo, que ocorre a fim de manter o equilíbrio entre morte e sobrevivência celular sem causar danos inflamatórios. Tanto a ausência, como a taxa elevada de morte celular pode ocasionar doenças de caráter autoimune, câncer e doenças degenerativas. Estes eventos são finamente regulados e envolvem diversas proteínas celulares, as quais podem iniciar a cascata sinalizadora através de duas vias alternativas: a via extrínseca, mediada por receptores de morte na superfície celular, e a via intrínseca, que sinaliza por meio de proteínas que regulam a função mitocondrial. Ambas as vias desencadearão uma resposta celular característica, efetivada pela ação de proteases cisteína-aspartil específicas, denominadas caspases (TAN; WHITE, 2008) e estão esquematizadas na figura 2.

Na via extrínseca, a sinalização para morte celular inicia pela

## 28 Revisão Bibliográfica

ação de um ligante aos receptores de morte na superfície celular, os quais são um subgrupo da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). Pela interação com proteínas adaptadoras, eles formam um complexo sinalizador de indução de morte, o qual ativa a caspase-8, que provoca a clivagem da caspase-3 efetora de morte celular por apoptose. Em razão da expressão dos receptores de morte em células tumorais, agentes que tenham como alvo os receptores de morte, podem desencadear morte celular apoptótica (ZIEGLER; KUNG, 2008).

Já na via intrínseca, uma família de proteínas anti-apoptóticas, a Bcl-2, atua na inibição da apoptose, enquanto as outras duas famílias, BAX e BH3, são pró-apoptóticas. Diferentes estímulos intracelulares de dano e estresse podem dar início à sinalização para morte celular pela via mitocondrial, tais como dano ao DNA, ausência ou deficiência de fatores de sobrevivência, hipóxia, alta concentração de cálcio intracelular, crescimento acelerado, entre outros. Desta maneira, a membrana externa da mitocôndria é permeabilizada, liberando citocromo c, bem como outras proteínas pró-apoptóticas, e promove a formação do apoptosoma, um complexo protéico que contém, além do citocromo c, o fator ativador de protease apoptótica (APAF1) e a caspase-9, que ao ser clivada, ativa a caspase-3 efetora, resultando na destruição das estruturas subcelulares, organelas e genoma (TAN; WHITE, 2008; TAN et al, 2009). A inibição de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, bem como a indução das proteínas pró-apoptóticas das famílias BAX e BH3 são importantes alvos terapêuticos na indução de morte celular por apoptose (ZIEGLER; KUNG, 2008).



**Figura 2:** Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

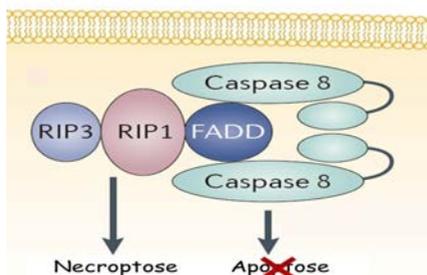
Fonte: Adaptado de MACFARLANE (2009).

A necrose é um tipo de morte celular desencadeada em resposta a um grande dano ou estresse físico, e é um processo não regulado de destruição celular traumática, caracterizada pela inflamação e ruptura celular e consequente liberação de dos componentes intracelulares. A necrose é um evento geralmente decorrente de infecções, inflamações ou isquemia, e o trauma acarretado causa alterações no transporte de íons, na produção energética e no equilíbrio do pH, os quais são essenciais na manutenção da homeostase celular (OKADA; MAK, 2004). A resposta inflamatória resultante provoca ativação da defesa imunológica, e como a inflamação crônica está envolvida na promoção da formação do tumor, a indução de necrose pode ser uma alternativa nas células tumorais não-responsivas à apoptose (TAN; WHITE, 2008).

Com a investigação crescente dos eventos relacionados à necrose e sua iniciação, outra via alternativa de morte celular emergiu, a necroptose. Este termo, necroptose, foi cunhado pela primeira vez em 2005, e refere-se à ocorrência de necrose como um evento programado e não somente passivo. Esta via vem sendo caracterizada nos últimos anos e já se sabe que está envolvida na patogênese de diversas doenças, tais como injúria isquêmica, neurodegeneração e infecção viral. A ativação da necroptose se dá por meio de receptores de morte comuns à

### 30 Revisão Bibliográfica

apoptose, como TNFR1, e é desencadeada pela atividade das quinases RIP1 e RIP3, sendo regulada pela caspase-8 e por inibidores de apoptose (Figura 3). O resultado celular envolve desintegração das membranas mitocondrial, lisossomal e plasmática e, portanto, pode ser considerada como um potencial alvo terapêutico alternativo a ser explorado (VANDENABEELE, 2010; KREUZALER; WATSON, 2012).



**Figura 3:** Proteínas envolvidas na sinalização da necroptose.

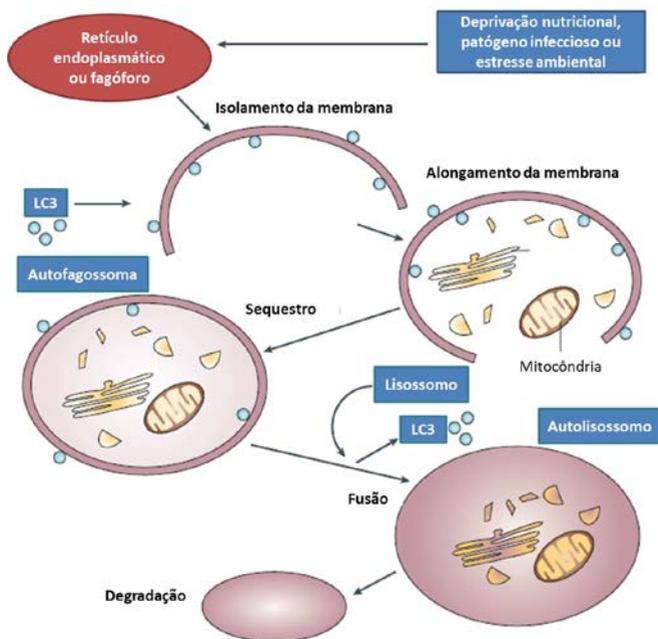
Fonte: Adaptado de KREUZALER; WATSON (2012).

A autofagia, também denominada macroautofagia, é a via de degradação lisossomal, na qual as organelas e proteínas intracelulares são digeridas. Apesar da autofagia ser fisiologicamente um mecanismo homeostático de reciclagem intracelular e de regulação metabólica, essencial à atividade normal das células, e de sobrevivência em condições adversas de nutrição escassa, ela também responde à estímulos de estresse, nos quais é necessário que as proteínas e organelas danificadas sejam removidas (TAN; WHITE, 2008; WHITE, 2012). Recentemente, a autofagia tem sido um alvo molecular abordado no câncer e as vias de sinalização vêm sendo mais amplamente estudadas. Por ser um processo celular fundamental, é importante conhecer a influência na tumorigênese e na resposta ao tratamento com determinados agentes (WHITE; DIPOLA, 2009). Sabe-se que, tanto a inibição quanto a ativação, podem ser benéficas, dependendo do tipo de tecido e estágio do tumor, além de outras características ainda não bem estabelecidas. A autofagia pode, portanto, ser promotora de tumor, por exercer função de reciclagem celular, provendo substratos para o metabolismo e a manutenção mitocondrial, como também ser supressora tumoral, através da eliminação de substratos de proteínas oncogênicas, organelas danificadas e proteínas tóxicas. Por tais razões,

é necessário que se defina o papel específico da autofagia em cada contexto para que se possa ponderar a intervenção terapêutica adequada (WHITE; DIPAOLO, 2009; KREUZALER; WATSON, 2012; WHITE, 2012). No caso de promoção da sobrevivência por autofagia, inibidores de autofagia podem ser úteis, todavia, se este mecanismo for eficaz em provocar eliminação das células, a ativação da autofagia pode ser vantajosa terapêuticamente (TAN; WHITE, 2008).

A ativação fora dos níveis basais desta via pode se dar em resposta à deprivação nutricional ou em casos de alta demanda energética, bem como em resposta aos estímulos de estresse, em que as células necessitam retirar proteínas ou organelas danificadas ou mesmo patógenos intracelulares (AMARAVADI et al., 2011). As células que sofrem autofagia excessiva são induzidas a morrer, de um modo independente da apoptose, o que acaba por caracterizar uma morfologia diferenciada daquelas que morrem por necrose ou apoptose. A indução de autofagia ocasionará eventos celulares ordenados, em que vesículas autofágicas, também denominadas autofagossomas, são formadas pelo agrupamento e alongamento de estruturas originárias do retículo endoplasmático ou do fagóforo, e proteínas de cadeia leve associadas ao microtúbulo (LC3) são também recrutadas nesta etapa. O autofagossoma, então, encapsula o material citosólico e organelas, é acidificado, se funde com lisossomos ou outros vacúolos, formando o autolisossomo e provoca a degradação do conteúdo presente no autofagossoma (OKADA; MAK, 2004; KONDO et al., 2005), conforme se observa na Figura 4.

## 32 Revisão Bibliográfica



**Figura 4:** Processo celular da autofagia.  
Fonte: Adaptado de KONDO et al. (2005).

Os eventos moleculares de sinalização decorrentes da ativação desta via diferem de acordo com o tipo do estímulo, sendo diferente quando induzidas por desnutrição ou outro tipo de estresse. De modo geral, tais eventos iniciam nos receptores da tirosina quinase, que inibem a via PI3K e sua quinase abaixo da via, AKT, provocando inibição ou diminuição da atividade da quinase mTOR, a qual por meio de outros complexos sinalizadores, promove autofagia. A via da quinase mTOR é chave na regulação da autofagia e, quando ativada, inibe a autofagia por causar redução da interação de proteínas autofagia-gene relacionadas (ATGs) e quinases ULK, bem como por controlar a fosforilação de efetores da autofagia, tal como o complexo Vps34-Beclina1. Estimulada por condições fisiológicas ou farmacológicas específicas, a inibição de AKT/mTOR reverte esta fosforilação, promovendo ativação de Beclina 1 e consequente autofagia e, portanto, constitui um alvo terapêutico importante (AMARAVADI et al, 2011; KREUZALER; WATSON, 2012).

Diante da diversidade de vias envolvidas nos distintos tipos de morte celular, uma ampla variedade de alvos terapêuticos pode ser investigada. Estes alvos podem, ainda, não serem restritos a um tipo de morte celular específico, uma vez que existem conexões entre os circuitos regulatórios da autofagia, apoptose e necroptose, e as vias das quinases PI3K, AKT e mTOR são exemplo disto (AMARAVADI et al, 2011; HANNAH; WEINBERG, 2011; KREUZALER; WATSON, 2012).

## 2.3 Cardenólídeos

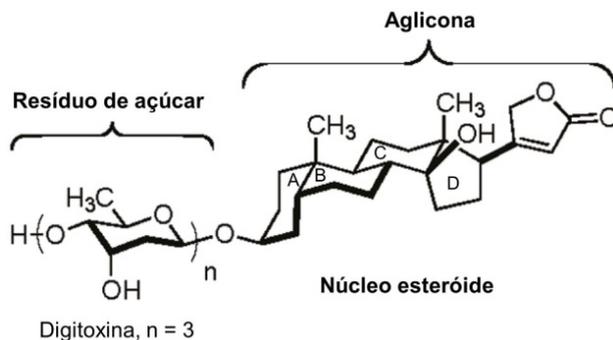
Os cardenólídeos estão distribuídos em algumas famílias vegetais, tais como Apocynaceae e Plantaginaceae (RATES; BRIDI, 2007; TASKOVA; GOTFREDSEN; JENSEN, 2005), e em animais (hipotálamo bovino) (TYMIAK et al., 1993). Alguns trabalhos mostraram que o colesterol e a progesterona são substratos para a biossíntese de cardenólídeos endógenos e esta produção é controlada por outros hormônios, como a renina-angiotensina, endotelina e adrenalina (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; QAZZAZ et al., 2004). A produção endógena de substâncias semelhantes à ouabaína (HAMLIN et al., 1991) e à digoxina (GOTO et al., 1990) por seres humanos também está descrita na literatura.

### 2.3.1 Estrutura química e principal ação farmacológica

Cardenólídeos (Figura 2) são compostos constituídos por um núcleo esteroidal, uma porção lactona (conjuntamente denominados de porção aglicona ou genina) e uma porção osídica ligada ao núcleo fundamental. Estes compostos são formados a partir da ciclização do esqualeno, que origina o núcleo esteroidal, o ciclopentanoperidrofenantreno. O anel pentagonal lactônico é insaturado na posição  $\alpha,\beta$  insaturada do C17 $\beta$ . A porção açúcar é geralmente ligada ao carbono 3 $\beta$  do núcleo esteroidal. Nos cardenólídeos, os anéis A/B e C/D se apresentam na conformação cis, enquanto os anéis B/C encontram-se fusionados na conformação trans. Os cardenólídeos mais conhecidos de ocorrência natural são digoxina, digitoxina, ouabaína e oleandrina (RATES; BRIDI, 2007). No que se refere aos açúcares, que são mais comumente ligados ao C3 da aglicona, os mais encontrados são digitoxose, oleandrose, diginose,

## 34 Revisão Bibliográfica

fucose, tevetose, digitalose (todos esses 2-desoxioses), ramnose e glicose (RATES; BRIDI, 2007). A presença dos açúcares confere maior solubilidade, o que afeta a absorção e distribuição dessas moléculas no organismo, ainda que as agliconas sejam absorvidas mais rapidamente e menos metabolizadas do que os heterosídeos. Apesar de não serem responsáveis pela atividade cardiotônica dos cardenolídeos, estes açúcares afetam a farmacodinâmica e farmacocinética, e as configurações influenciam na afinidade de ligação ao sítio ligante da proteína receptora (RATES; BRIDI, 2007; PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).



**Figura 5:** Estrutura química de um cardenolídeo.

Fonte: adaptado de WANG et al (2011).

O uso medicinal de cardenolídeos é relatado há muito tempo. Em 1775, William Withering, descreveu em seu livro “*An account of the foxglove and some of its medical uses*”, o efeito da *Digitalis purpurea* (dedaleira) sobre o coração e sua utilização no tratamento da hidropisia. No entanto, foi somente em 1874, que a digitoxina foi isolada desta planta pelo químico alemão Oswald Schmiedeberg (LESNEY, 2002).

Apesar do emprego terapêutico datar de alguns séculos, os cardenolídeos ainda são utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), em razão de da ação inotrópica positiva sobre o músculo cardíaco, aumentando a força de contração. O principal cardenolídeo utilizado terapeuticamente é a digoxina, que juntamente com o deslanosídeo (é um cardenolídeo de *Digitalis lanata*, também conhecido como deacetilanatosídeo c), são os cardenolídeos disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro (BRASIL, 2008). Além da

indicação terapêutica na ICC, o uso é recomendado em situações patológicas específicas, como na profilaxia e tratamento de algumas arritmias, tais como fibrilação atrial e taquicardia atrial paroxística e, ainda, no tratamento do choque cardiogênico (RATES; BRIDI, 2007).

O mecanismo da ação cardiotônica se dá pela inibição da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, a qual está envolvida no mecanismo da bomba dependente destes íons. Em situação fisiológica normal, esta bomba transporta íons  $\text{K}^+$  para o interior da célula, e íons  $\text{Na}^+$  para o exterior (HORISBERGER, 2004). A inibição desta enzima resulta na elevação da concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  no interior dos miócitos, com conseqüente diminuição dos íons  $\text{K}^+$  fora das células, o que acarreta menor extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo carreador de membrana  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e, portanto, maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , seja por influxo ou pela mobilização dos reservatórios sarcoplasmáticos. O  $\text{Ca}^{2+}$  disponível provoca aumento da força contrátil cardíaca, uma vez que se liga às proteínas contráteis do músculo cardíaco (RAHIMTOOLA; TAK, 1996). Na condição de relaxamento deste músculo, a tropomiosina mascara o sítio de ligação da miosina, por meio de bloqueio estérico. No entanto, a ligação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  à troponina causa alteração conformacional da tropomiosina, desmascarando o sítio de ligação da miosina, permitindo a formação do complexo actina-miosina e, desta maneira, promovendo a contração do músculo. A maior disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada pela inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase pelos cardenólídeos resulta, portanto, em um aumento do tônus muscular e do volume sanguíneo circulante por minuto, reduzindo a frequência e o volume cardíaco (RATES; BRIDI, 2007).

### **2.3.2 Outras atividades farmacológicas dos cardenólídeos**

Apesar da ampla utilização dos heterosídeos cardioativos como agentes inotrópicos positivos no tratamento da ICC, a investigação da atividade destes compostos em outras situações patológicas se intensificou na última década, apresentando novas possibilidades terapêuticas para esta classe de compostos (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Uma das investigações diz respeito à potencial ação antiviral de alguns destes compostos. Recentemente, o efeito inibitório do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) foi observado para a digoxina

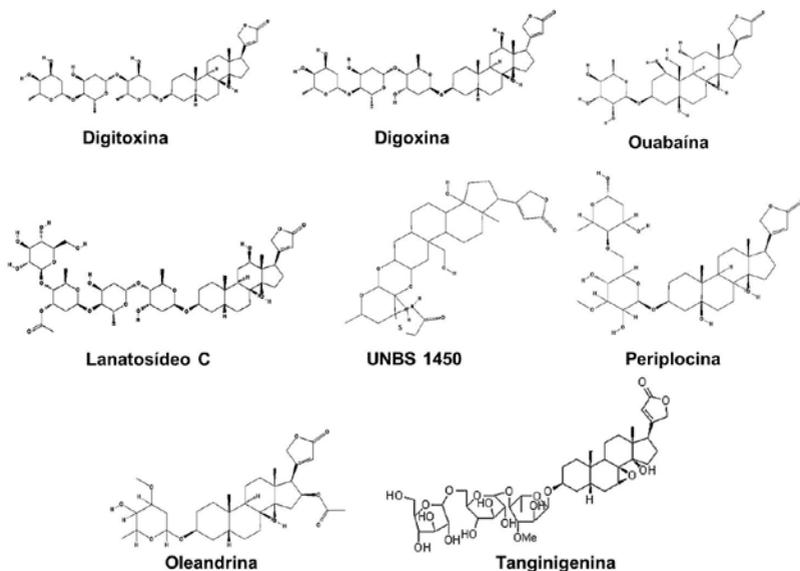
## 36 Revisão Bibliográfica

(HARTLEY et al., 2006), ouabaína (DODSON et al., 2007) e digitoxina (SU et al., 2008). A atividade antiviral da digoxina foi, ainda, relatada por Hartley (2006) para outros vírus DNA (HSV-2, vírus da varicela zoster, citomegalovírus e adenovírus), e por Hoffmann e colaboradores (2008) para vírus RNA (vírus influenza, vírus da doença de New Castle e vírus da estomatite vesicular). Mais recentemente ainda, o mecanismo de ação do cardenólídeo glucoevatromonosídeo, isolado de uma cultivar brasileira da *Digitalis lanata*, na inibição da replicação do HSV-1 foi proposto por Bertol e colaboradores (2011), fruto de uma Dissertação realizada no nosso Laboratório, orientada pela mesma professora desta Dissertação, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC.

Outra investigação crescente com os cardenólídeos se refere ao potencial antitumoral. A primeira evidência de inibição da proliferação de células tumorais por glicosídeos cardíacos foi relatada no final da década de 60; porém, após esse período, estudos a este respeito, bem como a utilização, ficaram restritos à ação cardiotônica (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Passadas algumas décadas, a investigação destes compostos como antitumorais voltou a chamar a atenção dos pesquisadores, principalmente, pelos estudos epidemiológicos retrospectivos conduzidos por Stenkvist (2001), nos quais pacientes com câncer de mama, tratadas concomitantemente com heterosídeos cardioativos para os problemas cardíacos, apresentaram taxa de mortalidade por esse câncer bastante inferior à das pacientes que não utilizaram tais medicamentos. No mesmo ano, Haux (2001) publicou um estudo com 9.271 pacientes, que utilizavam digitoxina, e estabeleceu uma correlação positiva entre altas concentrações plasmáticas desse fármaco e risco reduzido de leucemia e cânceres do trato urinário. Estes dados podem ser considerados como um marco para os estudos que se seguiram sobre o potencial citotóxico, antitumoral e anticâncer dos cardenólídeos.

Vários são os relatos da atividade antiproliferativa, bem como dos efeitos apoptóticos provocados por estes compostos, em linhagens celulares de cânceres de mama, próstata, pâncreas, pulmão, rins, além de leucemias, neuroblastomas e melanomas. O mecanismo pelo qual estes compostos exercem tais efeitos ainda não foi completamente elucidado, mas vários estudos vêm sendo realizados com este objetivo (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Os cardenolídeos oleandrina (RAGHAVENDRA et al., 2007a), digitoxina (HAUX, 1999), digoxina (WINNICKA et al., 2010), ouabaína (XU et al., 2011), UNBS1450 (JUNCKER et al., 2011), lanatosídeo C e os cardenolídeos extraídos de *Cerbera manghas* L. (FENG et al., 2010; WANG et al., 2010) e *Periploca graeca* L. (LU et al., 2010) induziram apoptose, nas diferentes linhagens celulares testadas. As estruturas químicas desses cardenolídeos estão representadas na figura 6.



**Figura 6:** Estruturas químicas dos cardenolídeos avaliados frente a linhagens celulares tumorais quanto a citotoxicidade.

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

A via apoptótica intrínseca mostrou ser induzida pela liberação do citocromo c e perda do potencial de membrana (RAMIREZ-ORTEGA et al., 2006), bem como pela ativação dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (BAK/BAX) (JUNCKER et al., 2011). Outros estudos, por sua vez, demonstraram a capacidade destes compostos em afetar a via extrínseca da apoptose, através da estimulação (em inglês, *upregulation*) de receptores de morte (DR)

## 38 Revisão Bibliográfica

(FRASE et al., 2006) ou de seus ligantes, tal como o FasL (fragmento ligante estimulador de apoptose) (RAGHAVENDRA et al., 2007a).

Além da variedade de estudos *in vitro* com diversas linhagens celulares apontando para morte celular por apoptose, outros trabalhos relataram a indução de outro tipo de morte celular provocada por estes compostos, que é a autofagia. A primeira observação desse tipo de morte celular foi detectada em células de pulmão (CPCNP) (MIJATOVIC et al., 2006a) e, posteriormente, em outras linhagens celulares, conforme mostrado no Quadro 2. Recentemente, uma triagem para a detecção da formação de autolisossomos e da degradação lisossomal, realizada com 1.120 compostos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*), confirmou os cardenolídeos como agentes potenciadores de autofagia (HUNDESHAGEN et al., 2011).

Esta característica de induzir diferentes tipos de morte celular pode ser uma alternativa interessante para os tumores resistentes à quimioterapia com os agentes indutores de apoptose atualmente utilizados, como por exemplo, para os glioblastomas, contra os quais o cardenolídeo UNBS1450 foi avaliado (LEFRANC; KISS, 2008; LEFRANC et al., 2008).

Os efeitos controversos mostrados por estes compostos, sugerem que o potencial de indução de morte celular por apoptose é dependente e específico do tipo celular envolvido (FRESE et al, 2006). Por exemplo, a oleandrina (um cardenolídeo pleiotrópico) exerce diferentes mecanismos de ação citotóxica, dependendo da linhagem celular tumoral testada (NEWMAN et al., 2008). A ausência de uma via única ou alvo, que explique a indução destes dois tipos de morte celular (apoptose e autofagia), sugere que, de fato, a resposta de cada tipo celular seja determinante (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2012).

**Quadro 2:** Tipos de morte celular decorrentes dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos, em diferentes linhagens de células tumorais.

| <b>Linhagens de células tumorais</b> | <b>Cardenolídeos testados</b>   | <b>Tipo de morte celular</b> | <b>Referências</b>   |
|--------------------------------------|---|------------------------------|--|
| <b>Pulmão</b>                        | Digitoxina, digoxina, ouabaína, lanatosídeo C, UNBS 1450, cardenolídeo isolados de <i>Periploca graeca</i> L. (periplocina) | Apoptose e autofagia         | FRESE et al., 2006; MIJATOVIC et al., 2006a, b; LU et al., 2010  |
| <b>Leucemia</b>                      | Oleandrina, cardenolídeo isolado de <i>Cerbera manghas</i> L.(tanginigenina), UNBS1450                                      | Apoptose                     | MANNA et al., 2000; SREENIVASAN; SARKAR; MANNA, 2003; RAGHAVENDRA et al., 2007b; WANG et al., 2010; JUNCKER et al., 2011 |
| <b>Mama</b>                          | <b>Ouabaína, digitoxina, digoxina</b>   | <b>Apoptose e autofagia</b>  | <b>KOMETIANI et al, 2005; LOPEZ-LAZARO et al., 2005; BIELAWSKI et al., 2006; HUNDESHAGEN et al., 2011</b>                |

**Quadro 2:** Tipos de morte celular decorrentes dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos, em diferentes linhagens de células tumorais (continuação).

|                       |  |                             |   |
|-----------------------|--|-----------------------------|---|
| <b>Próstata</b>       | <b>Oleandrina, ouabaína, digoxina, UNBS1450, cardenólídeo isolados de <i>Periploca graeca</i> L. (periplocina)</b> | <b>Apoptose e autofagia</b> | <b>MCCONKEY et al., 2000; HUANG et al., 2004; MIJATOVIC et al., 2008; BLOISE et al., 2009</b> |
| <b>Melanoma</b>       | UNBS1450   | Apoptose                    | MATHIEU et al., 2009  |
| <b>Neuroblastoma</b>  | Oleandrina   | Apoptose                    | KULIKOV et al., 2007  |
| <b>Renal</b>          | Digitoxina, digoxina   | Apoptose                    | LÓPEZ-LÁZARO et al., 2005   |
| <b>Retinoblastoma</b> | Ouabaína   | Apoptose                    | ANTCZAK et al., 2009  |
| <b>Pancreático</b>    | Oleandrina   | Autofagia                   | NEWMAN et al., 2007   |
| <b>Hepatoma</b>       | Cardenólídeo isolado de <i>Cerbera manghas</i> L. (tanginigenina), ouabaína  | Apoptose                    | FENG et al., 2010; XU et al., 2011;   |
| <b>Glioblastoma</b>   | UNBS1450   | Autofagia                   | LEFRANC et al., 2008.   |

A proliferação celular descontrolada e sustentada é uma das características clássicas do câncer e os cardenólídeos, além dos efeitos citotóxicos, têm também mostrado atuar na inibição do crescimento celular. Alguns dos mecanismos citostáticos incluem: aumento da expressão do inibidor de quinase dependente de ciclina 1A p21<sup>Cip</sup> (KOMETIANI et al., 2005; XU et al., 2011) e diminuição de p53

(KOMETIANI et al., 2005); modificação do metabolismo celular em razão da perturbação da produção intracelular de ATP e alteração do fluxo glicolítico, sendo que ambos os mecanismos podem ser consequência indireta da inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase por estes compostos (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2012). Durante o processo de divisão celular, perturbações na organização do citoesqueleto geralmente provocam alterações na progressão do ciclo celular (RIEDER; MAIATO, 2004) e alguns cardenolídeos também mostraram prejudicar a organização do citoesqueleto (LEFRANC; KISS, 2008; ARK et al., 2010), além da frequente observação de que eles são capazes de causar bloqueio do ciclo celular, principalmente, na fase G2/M. (NEWMAN et al., 2007; BLOISE et al., 2009; FENG et al., 2010; RASHAN et al., 2011).

A permanente ativação de mediadores pró-inflamatórios no microambiente tumoral constitui uma característica essencial para a ativação das vias que promovem a manutenção da carcinogênese. Vários relatos demonstraram a intervenção dos cardenolídeos na via NF- $\kappa$ B, além de prejudicarem a produção de efetores abaixo da via, como a IL-8, um importante modulador de metástase (MIJATOVIC et al., 2006b; LOPEZ-LAZARO, 2007; JUNCKER et al., 2011).

Outros estudos realizados com os cardenolídeos já mencionados, bem como alguns de seus derivados e outros novos isolados de algumas plantas demonstraram atividade antiproliferativa frente a diversas linhagens celulares tumorais (JIANG et al., 2008; FELTH et al., 2009; PIACENTE et al., 2009; IYER et al., 2010; PAN et al., 2010; WANG et al., 2011; ZHAO et al., 2011; LEVRIER et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2012).

Apesar da variedade de estudos realizados *in vitro*, nos últimos anos, com estes compostos, poucos são os relatos dos efeitos em modelos animais (MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012a). Os ensaios *in vivo* com os cardenolídeos são realizados em modelos xenográficos de tumores humanos, uma vez que as células de roedores mostraram não responder a estes compostos *in vitro*. A administração oral crônica do cardenolídeo UNBS1450 foi capaz de produzir efeitos terapêuticos benéficos nas células A549 implantadas em camundongos (MIJATOVIC et al., 2006a). Um trabalho realizado com a digoxina em neuroblastoma humano mostrou a redução do crescimento desse tumor em camundongos (SVENSSON et al., 2005).

## 42 Revisão Bibliográfica

No que se refere aos ensaios clínicos com estes compostos um número ainda mais limitado foi realizado ou está em andamento, conforme revisado por Mijatovic e colaboradores (2012b). Os cardenólídeos digitoxina, digoxina, Anvirzel™ e UNBS1450 estão sendo avaliados para o tratamento de tumores sólidos em geral ou especificamente para sarcoma de tecido mole, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de mama, e câncer de próstata. Alguns desses cardenólídeos estão sendo avaliados em associação com outros fármacos já utilizados na quimioterapia, ou com anticorpos monoclonais. Estes estudos deverão fornecer informações clínicas importantes, bem como auxiliar no desenvolvimento desta classe de compostos como agentes anticâncer.

Diante de tais evidências, esta dissertação objetivou realizar, inicialmente, uma triagem com uma série de cardenólídeos de origem vegetal e semissintética, obtidos tanto por síntese química quanto por transformação microbiana (biotransformação fúngica), com relação ao potencial de inibição do crescimento de células tumorais humanas (A549 e RD), seguida da avaliação do mecanismo da ação citotóxica do composto que mostrou a atividade mais promissora.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a ação citotóxica de uma série de cardenolídeos de origem vegetal, e semissintética frente a duas linhagens celulares tumorais humanas, e selecionar o composto mais citotóxico para avaliação de seu mecanismo de ação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar a triagem citotóxica de uma série de cardenolídeos, em células tumorais humanas A549 e RD, através do ensaio colorimétrico do MTT, e selecionar os compostos mais promissores;
- Avaliar a seletividade dos cardenolídeos selecionados, através da determinação da sua citotoxicidade, em células VERO, pelo ensaio colorimétrico do MTT;
- Avaliar o efeito do composto mais citotóxico em diferentes concentrações, na progressão do ciclo celular das células A549, através da marcação com Iodeto de Propídeo;
- Investigar a indução de morte celular apoptótica ou necrótica pelo composto mais citotóxico, nas células A549, através do ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo;
- Avaliar a capacidade do composto mais citotóxico de clivar substratos da caspase-3 efetora de morte celular apoptótica;
- Avaliar a indução de morte celular autofágica pelo composto mais citotóxico, em células A549, através da detecção de compartimentos acídicos marcados com o corante laranja de acridina;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, em células A549, tratadas com o composto mais citotóxico;
- Avaliar a potencial ação anti-ATPásica dos cardenolídeos mais citotóxicos e avaliar a correlação das duas atividades.



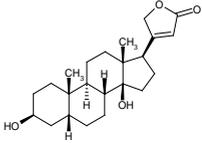
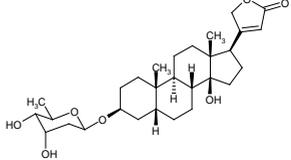
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais de estudo

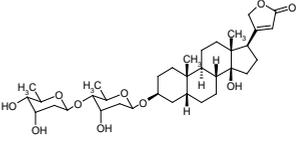
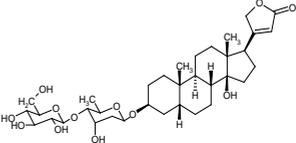
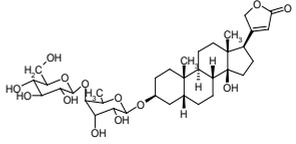
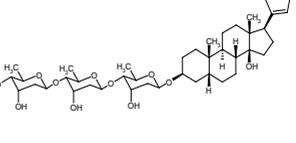
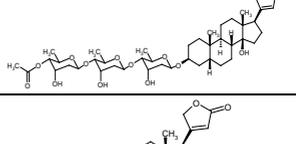
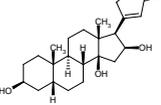
Na triagem, foram testados 64 cardenolídeos (Quadro 3), de origem vegetal, sintética ou microbiana, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Fernão Castro Braga, da Faculdade de Farmácia da UFMG e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität, da Alemanha, a quem agradecemos.

As soluções-estoques foram preparadas a partir das massas disponíveis de cada amostra, em concentrações variadas, através da solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Para a realização dos ensaios, as soluções-estoques preparadas foram diluídas em meio de cultura ou em água ultra-pura, nas concentrações desejadas, não ultrapassando 1% de DMSO, que é a concentração já testada no Laboratório e que não se mostrou citotóxica (dados não mostrados).

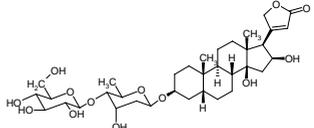
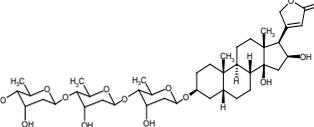
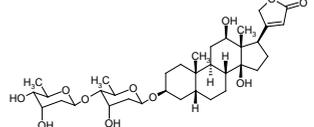
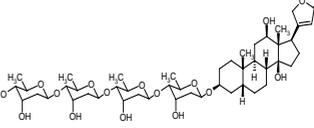
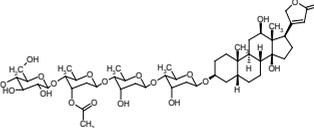
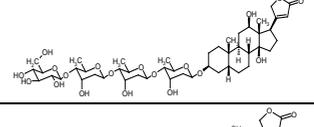
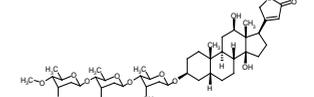
**Quadro 3:** Cardenolídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas.

| Código (Origem) | Composto                           | MM (g/mol) | Estrutura Química  |
|-----------------|------------------------------------|------------|--|
| 1 (V)           | Digitoxigenina                     | 374        |   |
| 2 (V)           | Digitoxigenina - monodigitoxosídeo | 504        |  |

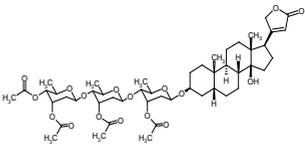
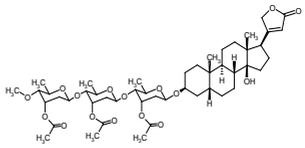
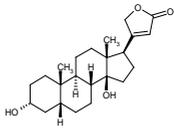
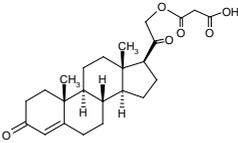
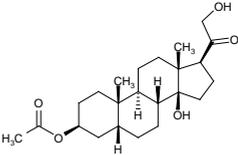
**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto                          | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|-----------------------------------|------------|---|
| 3 (V)           | Digitoxigenina – bisdigitoxosídeo | 634        |    |
| 4 (V)           | Glucoevatromonosídeo              | 666        |    |
| 5 (V)           | Glicodigifucosídeo                | 682        |    |
| 6 (V)           | Digitoxina                        | 764        |  |
| 7 (V)           | $\beta$ -acetildigitoxina         | 806        |  |
| 9 (V)           | Gitoxigenina                      | 390        |  |

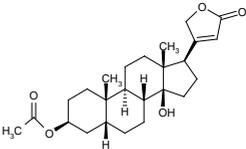
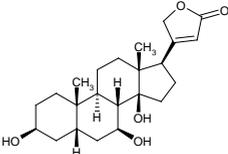
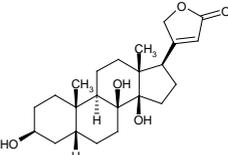
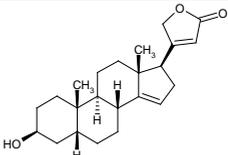
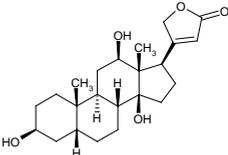
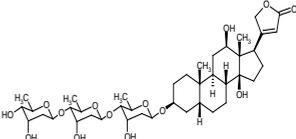
**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto                          | MM (g/mol) | Estrutura  |
|-----------------|-----------------------------------|------------|--|
| 10 (V)          | Glicogitorosídeo                  | 682        |    |
| 11 (V)          | Gitoxina                          | 780        |    |
| 12 (V)          | Digoxigenina – bisdigitoxosídeo   | 650        |    |
| 13 (V)          | Digoxigenina – tetradigitoxosídeo | 911        |    |
| 14 (V)          | Lanatosídeo C                     | 985        |  |
| 15 (V)          | Desacetil – lanatosídeo C         | 943        |  |
| 16 (SS)         | $\beta$ -metildigoxina            | 796        |  |

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

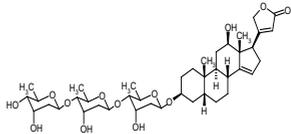
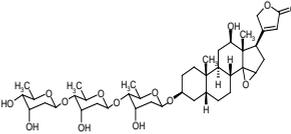
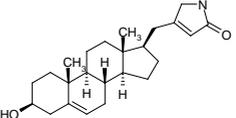
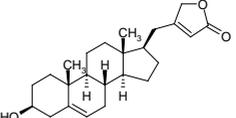
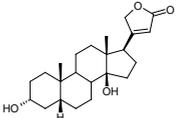
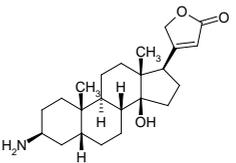
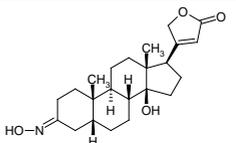
| Código<br>(Origem) | Composto   | MM<br>(g/mol) | Estrutura   |
|--------------------|--|---------------|---|
| 18<br>(SS)         | Digitoxina peracetilada                            | 915           |    |
| 19<br>(SS)         | $\beta$ -metildigitoxina peracetilada              | 899           |    |
| 20<br>(SS)         | <i>Epi</i> -digitoxigenina 3 $\alpha$ -OH          | 764           |    |
| 22<br>(SS)         | 21- <i>O</i> -malonil-desoxicorticosterona         | 373           |   |
| 23<br>(SS)         | 20,21 – Cetol da 3 $\beta$ -O-acetildigitoxigenina | 400           |  |

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto                          | MM (g/mol) | Estrutura  |
|-----------------|-----------------------------------|------------|--|
| 24 (SS)         | 3 $\beta$ -O-acetildigitoxigenina | 402        |     |
| 25 (BF)         | 7 $\beta$ -hidroxidigitoxigenina  | 390        |     |
| 26 (BF)         | 8 $\beta$ -hidroxidigitoxigenina  | 390        |     |
| 27 (SS)         | $\Delta^{14-15}$ digitoxigenina   | 356        |    |
| 28 (V)          | Digoxigenina                      | 390        |   |
| 29 (V)          | Digoxina                          | 781        |  |

## 50 Materiais e Métodos

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|----------|------------|---|
| 30 (SS)         | -----    | 763        |    |
| 31 (SS)         | -----    | 779        |    |
| 32 (SS)         | -----    | 369        |    |
| 33 (SS)         | -----    | 370        |    |
| 34 (SS)         | -----    | 374        |   |
| 35 (SS)         | -----    | 373        |  |
| 36 (SS)         | -----    | 387        |  |

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

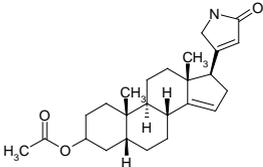
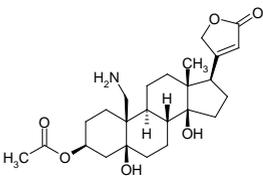
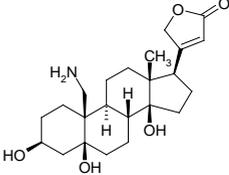
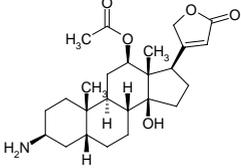
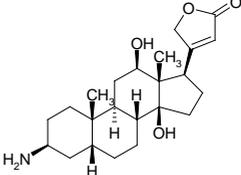
| Código (Origem) | Composto          | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|-------------------|------------|---|
| 37 (SS)         | -----             | 552        | <p>The structure shows a steroid nucleus with a butyrolactone ring at C-14, a methyl group at C-13, and a hydroxyl group at C-3. It is linked via a nitrogen atom to a bicyclic tropane-like system.</p>  |
| 38 (V)          | K-Estrofantosídeo | 873        | <p>The structure features a steroid nucleus with a butyrolactone ring at C-14, a methyl group at C-13, and a hydroxyl group at C-3. It is linked via a nitrogen atom to a complex glycoside chain consisting of multiple sugar units, including a methylated sugar.</p> |
| 39 (SS)         | -----             | 553        | <p>The structure shows a steroid nucleus with a butyrolactone ring at C-14, a methyl group at C-13, and a hydroxyl group at C-3. It is linked via an oxygen atom to a bicyclic tropane-like system.</p>   |
| 40 (SS)         | -----             | 623        | <p>The structure shows a steroid nucleus with a butyrolactone ring at C-14, a methyl group at C-13, and a hydroxyl group at C-3. It is linked via a nitrogen atom to a bicyclic tropane-like system, with an additional methyl group on the tropane ring.</p>           |
| 41 (SS)         | -----             | 581        | <p>The structure shows a steroid nucleus with a butyrolactone ring at C-14, a methyl group at C-13, and a hydroxyl group at C-3. It is linked via a nitrogen atom to a bicyclic tropane-like system, with a hydrogen atom explicitly shown on the tropane ring.</p>     |

## 52 Materiais e Métodos

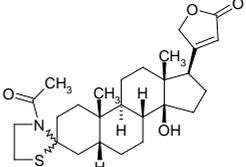
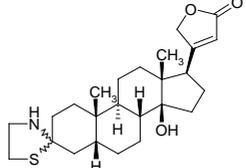
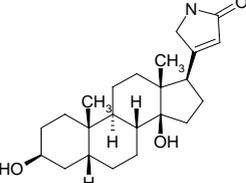
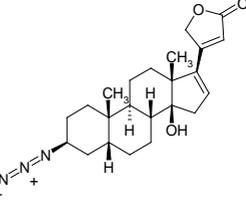
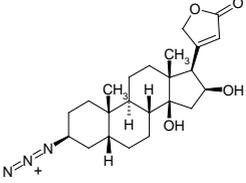
**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto | MM (g/mol) | Estrutura |
|-----------------|----------|------------|-----------|
| 42 (SS)         | -----    | 500        |           |
| 43 (SS)         | -----    | 398        |           |
| 44 (SS)         | -----    | 431        |           |
| 45 (SS)         | -----    | 398        |           |
| 46 (SS)         | -----    | 414        |           |

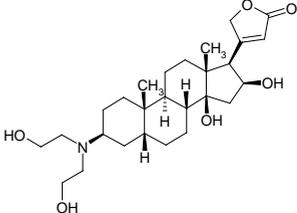
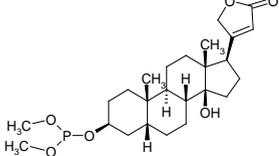
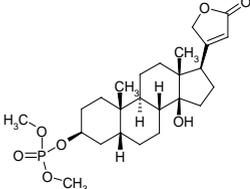
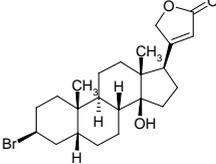
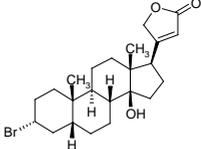
**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|----------|------------|---|
| 47 (SS)         | -----    | 397        |   |
| 48 (SS)         | -----    | 447        |   |
| 49 (SS)         | -----    | 405        |    |
| 50 (SS)         | -----    | 431        |   |
| 51 (SS)         | -----    | 389        |  |

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

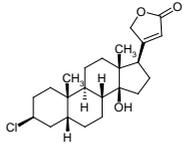
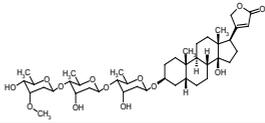
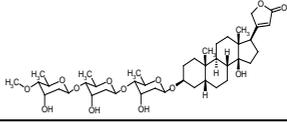
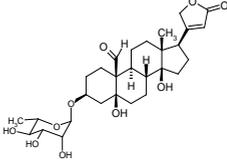
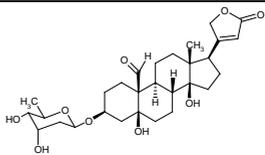
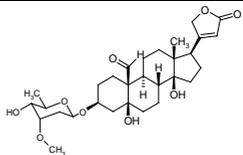
| Código (Origem) | Composto | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|----------|------------|---|
| 52 (SS)         | -----    | 473        |    |
| 53 (SS)         | -----    | 431        |    |
| 55 (SS)         | -----    | 373        |    |
| 56 (SS)         | -----    | 399        |   |
| 57 (SS)         | -----    | 417        |  |

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|----------|------------|---|
| 58 (SS)         | -----    | 477        |   |
| 59 (SS)         | -----    | 466        |   |
| 60 (SS)         | -----    | 482        |    |
| 61 (SS)         | -----    | 437        |  |
| 62 (SS)         | -----    | 437        |  |

56 Materiais e Métodos

**Quadro 3:** Cardenólídeos utilizados para a triagem da inibição do crescimento de células tumorais humanas. (continuação)

| Código (Origem) | Composto                   | MM (g/mol) | Estrutura   |
|-----------------|----------------------------|------------|---|
| 63 (SS)         | -----                      | 393        |    |
| 64 (SS)         | $\alpha$ -metil-digitoxina | 779        |    |
| 65 (SS)         | $\beta$ -metil-digitoxina  | 779        |    |
| 66 (V)          | Convalatoxina              | 550        |   |
| 67 (V)          | Helveticosídeo             | 534        |  |
| 68 (V)          | Cimarina                   | 549        |  |

Origem: V = vegetal; SS = semissintética; BF = biotransformação fúngica.

## 4.2 Culturas celulares

### 4.2.1 Células

As linhagens celulares utilizadas para a triagem e seletividade dos compostos foram, respectivamente, A549 (carcinoma de pulmão) cedidas pela Universidade de Barcelona, *European Collection of Cell Cultures* (ECCACC); RD (rabdomyosarcoma), adquiridas do Instituto Adolfo Lutz/SP e VERO (fibroblastos de macaco verde da África - *Cercopithecus aethiops*) provenientes do ATCC:CCL 81, sendo as duas primeiras linhagens celulares tumorais humanas. Para elucidação do mecanismo de ação citotóxica do composto mais citotóxico, foram usadas células A549 adquiridas do ATCC: CCL-185, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Monica de Oliveira (UFMG), a quem agradecemos. Todas as células foram cultivadas a 37 °C, em atmosfera umedecida, e 5% de CO<sub>2</sub>.

Antes e durante a realização deste trabalho, todas as linhagens celulares foram submetidas a testes para garantia da ausência de bactérias, leveduras e micoplasmas.

### 4.2.2 Meios de cultura e reagentes

Para manutenção e crescimento celular, foram utilizados os meios MEM (Minimal Essential Medium - Cultilab) nas linhagens celulares tumorais e DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium - Cultilab) na linhagem celular VERO. A estes meios foi adicionado 0,22% de bicarbonato de sódio (Sigma) para manutenção do pH entre 7,2 - 7,4 e realizada suplementação com soro fetal bovino (SFB - Gibco), na proporção de 10% para promoção do crescimento e 5% para manutenção das linhagens celulares. O agente de dissociação utilizado para as subcultura e a realização dos experimentos, foi a tripsina (enzima proteolítica obtida de pâncreas suíno, Sigma), preparada em uma solução de EDTA (Sigma) 1:250 a 0,25%.

### 4.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

Para avaliação da citotoxicidade em células tumorais, o método utilizado foi o ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), proposto por Mosmann (1983).

Para a realização do ensaio, suspensões de células A549 ou RD, com densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/cavidade/0,1 mL, obtidas após dissociação química por tripsina, foram distribuídas em placas de 96 cavidades (TPP) (100 $\mu$ L/cavidade). As placas foram incubadas por 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e substituído por 200  $\mu$ L das amostras diluídas (razão 1:2), em diferentes concentrações (a partir de 1  $\mu$ M), em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200  $\mu$ L de meio MEM/cavidade). Decorridas as 48 h de incubação com as amostras, o meio de cada cavidade foi substituído por 50  $\mu$ L de uma solução de MTT<sup>1</sup> a 1 mg/mL (em meio MEM). As placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Em seguida, o meio contendo MTT foi retirado e se adicionou 100  $\mu$ L de DMSO (Nuclear)/cavidade para dissolução dos cristais de formazana. A placa foi agitada por 5 min à temperatura ambiente para que toda a formazana fosse dissolvida e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA) a 540 nm.

Os valores de absorbância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X %), em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis, através da seguinte fórmula, em que DO= Densidade Óptica:

$$X \% = \frac{DO_{\text{material-teste}} \times 100}{DO_{\text{controle celular}}}$$

Os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras foram inseridos em gráficos, e através de análise de regressão logarítmica, calculou-se a CI<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu a proliferação celular em 50%, quando

---

<sup>1</sup> **Preparo da solução-estoque de MTT:** foram utilizados 5 mg de MTT (Sigma) para cada mL de PBS (p/v). Para uso, foi feita a diluição em meio MEM (1mg/mL).

comparada ao controle celular não tratado. Como controle positivo foi utilizado o paclitaxel (Glenmark, Brazil). Os valores de  $CI_{50}$  calculados representam a média de dois a seis experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.4 Avaliação da seletividade em células VERO**

Para avaliação da viabilidade celular em células saudáveis foi utilizado o mesmo método que na avaliação da citotoxicidade, descrito acima, variando apenas o número de células VERO semeadas ( $2,5 \times 10^4$  células/cavidade/0,1 mL) e o tempo de incubação (72h).

#### **4.5 Avaliação do mecanismo de ação citotóxica em células tumorais**

A partir do resultado da triagem da inibição do crescimento de células tumorais, foi selecionado o composto 4, o qual apresentou os resultados mais promissores, para investigação do potencial citotóxico somente na linhagem celular A549.

##### **4.5.1 Avaliação do efeito do composto 4 na progressão do ciclo das células A549, por citometria de fluxo**

Esta avaliação se baseou na metodologia proposta por Riccardi e Nicoletti (2006), com as devidas adaptações abaixo descritas. A partir de uma suspensão das células A549, foram semeadas  $5,0 \times 10^5$  células/cavidade em placas de seis cavidades (TPP) e incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. O composto 4 diluído em meio de cultura, em diferentes concentrações, foi então adicionado e incubado durante 24 h. Em seguida, as células foram retiradas das cavidades por meio de dissociação química (300  $\mu$ L/cavidade de tripsina 0,25%), coletadas e lavadas 2X com solução tampão salina (PBS), centrifugadas a 500 Xg por 5 min e fixadas com etanol 70%, a 4°C. Após fixação, uma solução contendo 50  $\mu$ g/ml de RNase e 100  $\mu$ g/ml de iodeto de propídeo foi adicionada às células, e as mesmas foram incubadas ao abrigo de luz por 30 min, à temperatura ambiente. Após este período, as células foram analisadas em citômetro de fluxo

## 60 Materiais e Métodos

FACS CAnto II (Becton Dickinson, USA), com registro de 30.000 eventos para cada amostra. A partir dos dados obtidos, a população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o software *WinMDI*®. Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes.

### **4.5.2 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pelo composto 4, nas células A549, por citometria de fluxo**

A determinação da externalização de fosfatidilserina, um fosfolípido interno de membrana celular em células apoptóticas, foi realizada pela dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo, utilizando um kit de detecção FITC Annexin V (BD, USA). Para isso, células A549 foram semeadas com densidade de  $5,0 \times 10^5$  células/cavidade, em placas de seis cavidades e incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. Após tratamento com o composto 4, por 12 h, as células aderidas foram cuidadosamente coletadas das cavidades, através de dissociação química com tripsina 0,25%, lavadas com (PBS) e incubadas com tampão de ligação e Anexina V-FITC, por 10 min, à temperatura ambiente e, posteriormente, com iodeto de propídeo, conforme instruções do fabricante. As células apoptóticas e necróticas marcadas foram, então, analisadas em citômetro de fluxo FACS CAnto II (Becton Dickinson, USA), registrando-se 30.000 eventos para cada amostra. Foram utilizados controles positivos de marcação, sendo eles o tratamento com o fármaco camptotecina (Sigma) e os ciclos de congelamento e descongelamento celular (-80 °C/ e 56 °C) para indução de apoptose e necrose, respectivamente. Os dados obtidos foram analisados em software *WinMDI*® e a porcentagens de células agrupadas em cada quadrante foram calculadas, onde Q1= células mortas por necrose (Anexina V-, IP+); Q2 = células em apoptose tardia (Anexina V+, IP+); Q3 = células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 = células em estágio iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-). Foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes.

#### **4.5.3 Avaliação da capacidade do composto 4 de clivar substratos da caspase-3**

Para a avaliação da atividade da caspase 3 foi utilizado um kit da Millipore®, com o substrato específico desta enzima (DEVD-pNA) ligado a um cromóforo, a p-nitroanilina (pNA). A caspase ativa cliva o substrato e o cromóforo liberado produz uma coloração, que é quantificada por espectrofotometria, e as absorbâncias medidas são diretamente proporcionais à atividade da enzima. Para realização do ensaio, as células A549 foram semeadas em placas de cultura celular de seis cavidades, com densidade de  $5,0 \times 10^5$  células/cavidade e incubadas por 24 h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> até confluência. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e tratadas com o composto 4, em diferentes concentrações, por 12 h. Em seguida, as células foram retiradas das cavidades por meio de dissociação química (300 µL/cavidade de tripsina 0,25%), coletadas e transferidas para tubos de 1,7 mL, aos quais foram adicionados 150 µL de tampão de lise. Seguiu-se incubação por 10 min em banho de gelo e o lisado celular foi centrifugado por 5 min a 10.000 Xg. Após, o conteúdo citosólico (sobrenadante) foi transferido para novos tubos, em banho de gelo, a fim de se realizar a quantificação protéica das amostras pelo método de Bradford (1976). Após a quantificação, a mistura reacional foi preparada em placas de 96 cavidades e, conforme instruções do fabricante, as amostras foram incubadas por 2 h, a 37 °C. Após o período de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 405 nm e o aumento da atividade da caspase 3 foi determinado comparando as absorbâncias dos controles não tratados com as absorbâncias das populações celulares tratadas com as diferentes concentrações do composto 4.

#### **4.6 Avaliação da indução de morte celular autofágica pelo composto 4, em células A549**

Para avaliação da indução de morte autofágica foi utilizada a marcação das células A549 com o corante laranja de acridina, já que ele se acumula nos compartimentos acídicos e forma agregados que fluorescem em vermelho-alaranjado (PAGLIN et al, 2001). Para tal, foram semeadas células com densidade de  $5,0 \times 10^4$  células/cavidade

## 62 Materiais e Métodos

em placas com câmaras de oito cavidades (Lab Tek®, NUNC), incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. Após este período, foi realizado o tratamento com o composto 4, em diferentes concentrações, por 24 h e as células foram lavadas 2X com PBS, a 4°C. Em seguida, a parte destacável das placas foi removida e a solução de laranja de acridina a 10 µg/mL preparada em solução tampão fosfato (PBS) foi adicionada e as oito cavidades foram recobertas com laminulas. Após 10 min de incubação, à temperatura ambiente, as células foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX41.

### **4.7 Avaliação dos efeitos do composto 4 na expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, em células A549**

Foram semeadas células A549, na densidade de  $5,0 \times 10^5$  células/cavidade em placas de seis cavidades, na presença do meio MEM e 5% de SFB por 24 h, até confluência. Após este período, as células foram lavadas 2X com 1 mL de PBS, e no volume final de 2 mL de meio, o composto 4 foi adicionado, nas diferentes concentrações, bem como os controles (não tratado ou com o veículo DMSO). As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, durante 24 ou 48 h. Em seguida, o meio foi aspirado e as células lavadas 2X com 2 mL de PBS, seguindo-se da adição de 150 µL de tampão de lise [137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 10% glicerol; 1,5% inibidor de proteases; 1% TritonX 100; 0,5% deoxicolato de sódio; e 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS)]. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 10.000 Xg, por 10 min, a 4°C, e os sobrenadantes das amostras foram transferidos novamente para microtubos e fervidos durante 5 min a 99°C. As amostras foram armazenadas a -20°C e seu conteúdo protéico foi determinado imediatamente (BRADFORD, 1976).

As amostras foram adicionadas ao tampão [100% 2-mercaptoetanol; 100% glicerol; 10% dodecil sulfato de sódio; 2% azul de bromofenol e 0,5% Tris-HCl pH 6,8] e as proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 12,5% (SDS-PAGE). Após, foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) em tampão de transferência [25 mM de Tris Base e 192 mM de glicina, dissolvidos em 100 mL de uma

solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 400 mA. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de soroalbumina bovina (BSA-Fluka, USA) em tampão de bloqueio [1 M de Tris Base; 18% NaCl e 0,5 % Tween 20, dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura, com pH ajustado para 7,6 e armazenado a 4°C até o uso], e lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com este tampão. As membranas foram, então, incubadas durante a noite, a 4°C, separadamente e sob agitação, com os seguintes anticorpos primários diluídos neste mesmo tampão, contendo 5% de BSA e 0,2% de azida sódica: anti-ciclina B1, anti-AKT, anti-ERK 1/2, anti-P-p38, anti-NF-κB-p65, anti-IκB e β-actina (diluição 1:500, Cell Signalling Technology, Boston, MA, USA); Após este período, as membranas foram lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com tampão de bloqueio e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, segundo a origem do anticorpo primário, IgG anticoelho (Chemicon, Millipore), todos diluídos 1:5.000 em tampão de bloqueio. Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com o tampão de bloqueio e a detecção foi feita com o kit de quimioluminescência Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific, Waltham, MA), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500 µL de cada reagente (reagentes 1 e 2), e permanecendo em contato com a membrana por 4 min. Após este período, a membrana foi adequadamente acomodada no cassete e a revelação foi realizada com filme radiográfico (IBF-Medix, Duque de Caxias, RJ, Brasil) no processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

#### **4.8 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica dos cardenólídeos mais citotóxicos**

A metodologia deste ensaio foi realizada conforme descrito por Hu e colaboradores (2009), com pequenas adaptações, descritas a seguir. Para a avaliação da capacidade de inibição da enzima  $N^+/K^+$ ATPase pelos compostos mais citotóxicos (2, 3, 4, 41, 66 e 67) foi utilizado o kit Quantichrom ATPase/GTPase (Bioassay, Hayward, CA, USA), segundo as especificações do fabricante. Os compostos foram, então, adicionados em diferentes concentrações em placas de 96 cavidades, com volumes iguais da enzima ATPase (Sigma-Aldrich, St

## 64 Materiais e Métodos

Louis, MO) durante 15 min, à temperatura ambiente, seguindo-se da adição do ATP às placas e incubação por 30 min. Após este período, o reagente (corante verde de malaquita) foi adicionado e as placas foram novamente incubadas por 30 min e a leitura das absorbâncias foi realizada a 620 nm (ELISA Reader Biotek, Modelo EL800). Os dados obtidos permitiram a determinação da atividade anti-ATPásica, através da comparação das porcentagens das absorbâncias dos controles positivos e negativos, em relação às absorbâncias das amostras. Foram utilizados controles positivos com cardenólídeos reconhecidamente inibidores desta enzima (digitoxina e digoxina) e controles negativos (sem os inibidores).

### 4.10 Delineamento experimental e análise estatística

Para a avaliação da citotoxicidade, foi realizado o delineamento de blocos completos casualizados (BCC) e arranjo fatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), em que cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das diferentes amostras testadas. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, e as repetições foram realizadas em placas diferentes, uma vez que os ensaios foram feitos em dias subsequentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

Para calcular os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$ , realizou-se uma análise de regressão logarítmica, a partir de curvas de concentração *versus* efeito, e os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata, sendo os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio-padrão. As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles, foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) e para separação de médias foi empregado o teste de Dunnett ou Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism®. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. A correlação foi avaliada por *Pearson*, com  $r^2$  maior que 1 indicando correlação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade

Diante dos relatos na literatura sobre a atividade citotóxica e/ou de inibição do crescimento de células tumorais provocadas por cardenolídeos, foi realizada uma triagem citotóxica com os cardenolídeos disponíveis, em duas linhagens celulares tumorais humanas (A549 e RD), através do ensaio colorimétrico do MTT. O período de incubação de 48 h e a concentração inicial máxima de 1  $\mu\text{M}$  foi estabelecida para a triagem. Esta concentração foi definida com base na recomendação de um valor de concentração que inibiu em 50% o crescimento das células ( $\text{CI}_{50}$ ) de até 1  $\mu\text{M}$  em triagens de compostos com potencial citotóxico em linhagens celulares tumorais para posterior estudo do mecanismo de ação (BUGELSKI, et al., 2000). Foram selecionados aqueles com valores de  $\text{CI}_{50}$  mais promissores para o estudo subsequente do mecanismo de ação citotóxica destes compostos em células A549. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  dos compostos em células A549 e RD, encontram-se compilados na Tabela 1.

Pode-se observar que 24 cardenolídeos apresentaram valores de  $\text{CI}_{50} < 1\mu\text{M}$  frente às células A549, e 23 deles frente às células RD, sendo que seis apresentaram valores inferiores a 100 nM. Os compostos mais citotóxicos frente às duas linhagens tumorais foram os de números 2, 3, 4, 41, 66 e 67, todos com valores inferiores a 100 nM, sendo o composto 4 o mais citotóxico para as células A549, com uma  $\text{CI}_{50}$  de 19nM e o composto 66 (convalotoxina) o mais citotóxico para as células RD, com uma  $\text{CI}_{50}$  de 9 nM. O composto 4 foi cerca de 14 vezes mais citotóxico do que o controle positivo, o paclitaxel, nas células A549. Não houve diferença entre os seis compostos mais citotóxicos ( $p > 0,05$ ; ANOVA, seguido do teste de Tukey).

No atual conhecimento, até o momento, o composto 4, denominado glucoevatromonosídeo, foi aqui investigado, pela primeira vez, quanto à potencial atividade citotóxica frente a células tumorais. É importante ressaltar que o mecanismo de ação dos cardenolídeos em células tumorais depende não só do composto em si, como também da concentração utilizada, do tipo de célula testada e do alvo terapêutico (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2012).

## 66 Resultados e Discussão

O efeito antiproliferativo evidenciado para as células RD também é relatado aqui, pela primeira vez, para os cardenolídeos testados. É interessante observar na Tabela 1, que os valores de  $CI_{50}$  são, em sua maioria, menores que os referentes aos das células A549, o que pode indicar uma sensibilidade maior das células RD a estes compostos.

Conforme apontado por Stenkvist (2001), em um estudo retrospectivo de vinte anos, aquelas pacientes com câncer de mama e que utilizavam concomitantemente a quimioterapia e cardenolídeos para o tratamento de problemas cardíacos, apresentaram taxa de mortalidade por este câncer de apenas 6%, índice esse bastante diferente daquelas que não receberam a mesma medicação (34%). Ele também verificou, em um estudo retrospectivo de cinco anos, que o índice de recorrência deste mesmo câncer nas pacientes, que não ingeriram cardenolídeos foi cerca de 10X maior do que o daquelas que os ingeriam, bem como o tamanho do tumor nas pacientes que utilizavam os cardenolídeos era a metade daquele observado para aquelas que não usaram o medicamento para problemas cardíacos. Estes estudos confirmaram a importância da investigação dos cardenolídeos como potenciais agentes antitumorais e desencadearam uma série de avaliações *in vitro* e *in vivo* sobre o possível mecanismo de ação citotóxica, em células tumorais. O grande interesse destas investigações também se baseia na ampla utilização clínica destes fármacos digitálicos e seus conhecidos efeitos farmacocinéticos, adversos e tóxicos. Assim sendo, estes conhecimentos se tornam vantagens, quando as diferentes fases da P&D de novos fármacos podem ser suplantadas. Diante disto e da disponibilidade de uma série de 64 cardenolídeos, a investigação do potencial citotóxico foi iniciada através desta triagem e os resultados obtidos permitiram selecionar o composto 4 para realizar a investigação subsequente do mecanismo de ação citotóxica.

**Tabela 1:** Resultados da avaliação de uma série de cardenólídeos, com relação à potencial inibição do crescimento das células A549 e RD.

| COMPOSTO | A549<br>CI <sub>50</sub> (μM) | RD<br>CI <sub>50</sub> (μM) |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1        | 0,627±0,052                   | 0,233±0,007                 |
| 2        | 0,033±0,002                   | 0,024±0,005                 |
| 3        | 0,059±0,004                   | 0,021±0,001                 |
| 4        | 0,019±0,004                   | 0,036±0,000                 |
| 5        | 0,631±0,014                   | 0,416±0,002                 |
| 6        | 0,369±0,021                   | 0,141±0,011                 |
| 7        | 0,220±0,004                   | 0,157±0,002                 |
| 9        | >1                            | >1                          |
| 10       | 0,610±0,028                   | 0,324±0,084                 |
| 11       | >1                            | >1                          |
| 12       | 0,154±0,021                   | 0,024±0,006                 |
| 13       | 0,241±0,009                   | 0,174±0,026                 |
| 14       | 0,265±0,019                   | 0,180±0,020                 |
| 15       | 0,134±0,005                   | 0,160±0,017                 |
| 16       | 0,208±0,003                   | 0,246±0,016                 |
| 18       | >1                            | >1                          |
| 19       | >1                            | >1                          |
| 20       | >1                            | >1                          |
| 22       | >1                            | >1                          |
| 23       | >1                            | >1                          |
| 24       | >1                            | >1                          |
| 25       | >1                            | >1                          |
| 26       | >1                            | >1                          |
| 27       | >1                            | >1                          |

68 Resultados e Discussão

**Tabela 1:** Resultados da avaliação de uma série de cardenólídeos, com relação à potencial inibição do crescimento das células A549 e RD. (continuação)

| COMPOSTO | A549<br>CI <sub>50</sub> (µM) | RD<br>CI <sub>50</sub> (µM) |
|----------|-------------------------------|-----------------------------|
| 28       | >1                            | >1                          |
| 29       | 0,134±0,007                   | 0,066±0,014                 |
| 30       | >1                            | >1                          |
| 31       | >1                            | >1                          |
| 32       | >1                            | >1                          |
| 33       | >1                            | >1                          |
| 34       | >1                            | >1                          |
| 35       | >1                            | >1                          |
| 36       | >1                            | >1                          |
| 37       | >1                            | >1                          |
| 38       | 0,607±0,001                   | 0,132±0,012                 |
| 39       | >1                            | >1                          |
| 40       | >1                            | >1                          |
| 41       | 0,088±0,005                   | 0,130±0,023                 |
| 42       | 0,236±0,084                   | >1                          |
| 43       | >1                            | >1                          |
| 44       | >1                            | >1                          |
| 45       | >1                            | >1                          |
| 46       | >1                            | >1                          |
| 47       | >1                            | >1                          |
| 48       | >1                            | >1                          |
| 49       | >1                            | >1                          |
| 50       | >1                            | >1                          |
| 51       | >1                            | >1                          |
| 52       | >1                            | >1                          |

**Tabela 1:** Resultados da avaliação de uma série de cardenolídeos, com relação à potencial inibição do crescimento das células A549 e RD. (continuação)

| COMPOSTO   | A549<br>CI <sub>50</sub> (μM) | RD<br>CI <sub>50</sub> (μM) |
|------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <b>53</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>55</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>56</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>57</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>58</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>59</b>  | 0,796±0,014                   | 0,181±0,025                 |
| <b>60</b>  | 0,276±0,031                   | 0,108±0,024                 |
| <b>61</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>62</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>63</b>  | >1                            | >1                          |
| <b>64</b>  | 0,289±0,003                   | 0,068±0,001                 |
| <b>65</b>  | 0,186±0,000                   | 0,118±0,024                 |
| <b>66</b>  | 0,032±0,001                   | 0,009±0,001                 |
| <b>67</b>  | 0,046±0,003                   | 0,051±0,001                 |
| <b>68</b>  | 0,124±0,004                   | 0,059±0,000                 |
| <b>PTX</b> | 0,26±0,070                    | 0,046±0,050                 |

Valores representam a média de dois experimentos independentes ± desvio padrão.

<sup>a</sup> CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu em 50% o crescimento das células A549 ou RD.

## 5.2 Avaliação da seletividade em células VERO

Os seis compostos mais ativos foram avaliados frente às células VERO, que são fibroblastos de rins de macaco, a fim de investigar a citotoxicidade em células saudáveis, já que a especificidade por células tumorais é uma característica desejável de um potencial quimioterápico. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que os valores de CC<sub>50</sub> em células não tumorais foi, no mínimo, 173X maiores do que os valores de CI<sub>50</sub> em células tumorais, sugerindo que estes compostos possuem seletividade pelas células tumorais avaliadas. Por exemplo, o

## 70 Resultados e Discussão

composto 4 mostrou-se 14.400X mais seletivo para as células A549 do que para as células VERO. No entanto, não foi observada correlação direta entre os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  ( $r^2=0,3439$ ).

Seria importante realizar esta avaliação da seletividade em células humanas saudáveis de pulmão, tais como os fibroblastos MRC-5. No entanto, essas células somente foram adquiridas recentemente pelo Laboratório e não houve tempo hábil para realizar os ensaios a fim de incorporar os resultados nesta dissertação.

**Tabela 2:** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células VERO, dos cardenólídeos mais tóxicos para as células A549.

| <b>Composto</b> | <b>Células VERO<br/><math>CC_{50}^a</math> (<math>\mu</math>M)</b> | <b>Células A549<br/><math>CI_{50}^b</math> (<math>\mu</math>M)</b> |
|-----------------|--|--|
| <b>2</b>        | 6,60 $\pm$ 0,28  | 0,033 $\pm$ 0,002  |
| <b>3</b>        | 10,05 $\pm$ 2,33   | 0,059 $\pm$ 0,004  |
| <b>4</b>        | 273,95 $\pm$ 46,46   | 0,019 $\pm$ 0,004  |
| <b>41</b>       | 27,60 $\pm$ 7,92   | 0,088 $\pm$ 0,005  |
| <b>66</b>       | 201,90 $\pm$ 11,46   | 0,032 $\pm$ 0,001  |
| <b>67</b>       | >250,00  | 0,045 $\pm$ 0,003  |

Valores representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

<sup>a</sup> $CC_{50}$  = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células VERO.

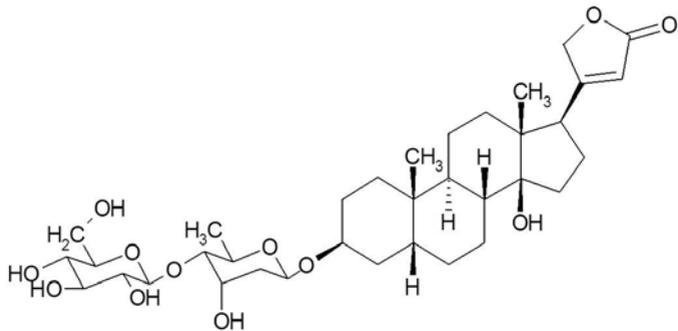
<sup>b</sup> $CI_{50}$  = concentração que inibiu em 50% o crescimento das células A549.

Esta seletividade já foi observada em outros estudos com cardenólídeos e diferentes hipóteses foram propostas, incluindo o alto requerimento energético das células tumorais, diferenças na expressão da subunidade ativa da  $Na^+/K^+$ ATPase e diferentes vias de sinalização induzidas por estes compostos nas linhagens celulares saudáveis e tumorais (FRASE et al., 2006; MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012b).

### 5.3 Avaliação do mecanismo da ação citotóxica em células A549

Tendo em vista que: **(a)** os seis compostos selecionados apresentaram efeitos citotóxicos preliminares semelhantes (dados obtidos por citometria de fluxo - não mostrados); **(b)** um deles (composto 4 = glucoevatromonosídeo, Figura 7) estava disponível em maior quantidade, suficiente para a realização dos ensaios propostos, decidiu-se que a elucidação completa do mecanismo da ação citotóxica seria realizado apenas com ele.

A seguir, são apresentados os resultados referentes ao tratamento das células A549 com este composto. Também contou para a escolha do glucoevatromonosídeo, o fato dele ter sido obtido de um cultivar brasileiro de *Digitalis lanata* e ser inédito (BRAGA et al., 2007).



**Figura 7:** Estrutura química do glucoevatromonosídeo.

#### 5.3.1 Avaliação do efeito do composto 4 na progressão do ciclo das células A549, por citometria de fluxo

Para garantia e manutenção da sobrevivência, as células necessitam passar pelo processo de divisão, gerando células-filhas. A divisão de uma célula é caracterizada pela replicação do DNA e segregação dos cromossomos para as duas células geradas. Esta divisão se dá em duas fases, a mitose e a interfase, sendo a primeira o processo de divisão nuclear e a segunda, a fase intermediária entre duas mitoses. Esta última, a interfase, é ainda dividida em "gaps" G0, G1, G2 e fase S.

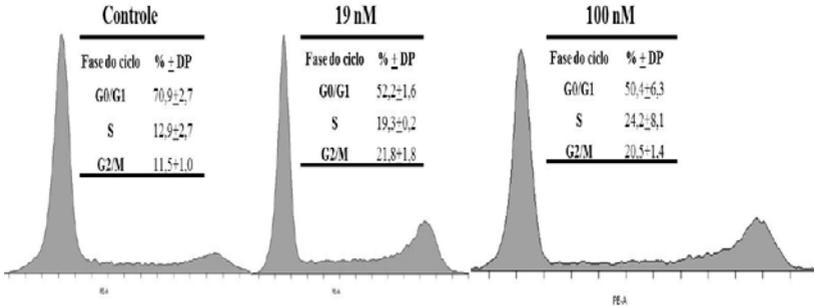
## 72 Resultados e Discussão

Na fase G<sub>0</sub>, as células se encontram em repouso, sem eventos que as preparem para a divisão. Já na fase G<sub>1</sub>, a síntese de proteínas estruturais, enzimas e RNA é elevada, para garantia do crescimento celular e precede a fase (S), na qual ocorre duplicação do material genético. A fase seguinte, G<sub>2</sub>, é caracterizada pela síntese de moléculas e organelas relacionadas ao processo de divisão da célula e é preparatória para a entrada no processo de mitose (divisão celular) (SMITH; MARTIN, 1973).

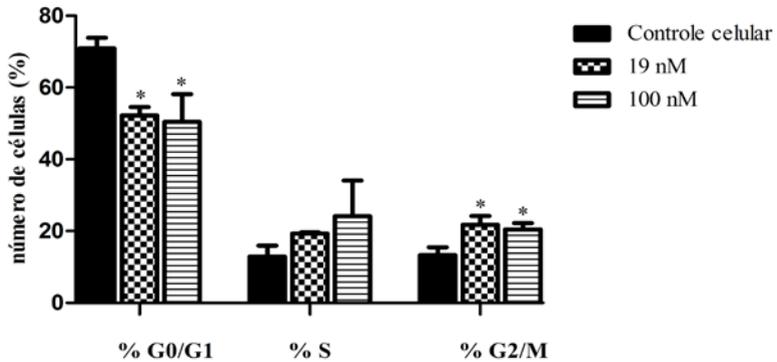
Diante do efeito citotóxico apresentado pelos cardenolídeos testados, investigou-se os efeitos do composto 4 na progressão do ciclo das células A549. Após o período de tratamento de 24 h, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (IP), já que este fluoróforo intercala nos pares de bases da dupla fita de DNA e resulta em uma intensidade de fluorescência diretamente proporcional ao conteúdo de DNA celular. A análise foi realizada em citômetro de fluxo e gerou histogramas, nos quais o conteúdo de DNA está representado no eixo X e o número de eventos adquiridos no eixo Y. Em um histograma típico, o primeiro pico representa a quantidade de células na fase G<sub>1</sub> (conteúdo de DNA 2N) e o segundo nas fases G<sub>2</sub>/M (conteúdo de DNA 4N), enquanto que a depressão entre os dois picos representa a fase de síntese (S) celular (NUNEZ, 2001). Esta representação típica pode ser observada no histograma referente ao controle celular (Figura 3).

As concentrações testadas do composto 4 foram a CI<sub>50</sub> (19nM) e 100 nM para também investigar o potencial caráter de indução de morte celular em concentrações mais elevadas, o que já foi relatado na literatura para alguns cardenolídeos (JUNCKER et al., 2009).

Nos histogramas referentes aos tratamentos, com 19 nM e 100nM do composto 4, observou-se alterações dos perfis dos histogramas, em relação ao do controle não tratado, com aumento da população de células na fase G<sub>2</sub>/M e redução do número de células na fase G<sub>1</sub> (Figura 3). A avaliação do efeito do composto 4 na progressão do ciclo celular mostrou que o tratamento, nas concentrações utilizadas, promoveu o bloqueio do ciclo celular em G<sub>2</sub>/M, de maneira significativa (Figura 4). No entanto, não se observou uma população em sub G<sub>1</sub>, tipicamente associada à apoptose.



**Figura 8:** Histogramas da determinação do conteúdo de DNA da linhagem celular A549, por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 24 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 19 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Cada histograma é representativo de três experimentos.



**Figura 9:** Determinação do conteúdo de DNA nas células A549, por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 24 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 19 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média±DP de três experimentos independentes. \* indica diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,005$ ; ANOVA, seguido do teste de Dunnett).

O relato do bloqueio do ciclo celular, principalmente na fase G2/M por cardenólídeos tem sido frequente (NEWMAN et al., 2007; BLOISE et al., 2009; FENG et al., 2010; RASHAN et al., 2011). Embora a maioria dos compostos apresente este efeito, seguido pela indução de morte celular por apoptose, o trabalho de Newman e colaboradores (2007) mostrou que a oleandrina desencadeou morte celular por autofagia, acompanhada pelo bloqueio da fase G2/M do ciclo celular em células tumorais de pâncreas.

Uma das características clássicas do câncer é a ativação da capacidade replicativa, ou a proliferação celular descontrolada (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A capacidade das células tumorais em continuamente permanecerem no ciclo e, assim, evitar a maturação e diferenciação terminal, pode ser decorrente dos danos causados nos genes reguladores do ciclo celular (SHERR, 1996). Desta maneira, a capacidade de inibir esta progressão contínua de tais células (efeito citostático) é uma característica desejável para um potencial fármaco anticâncer. Por esta razão, realizou-se também a avaliação da expressão da ciclina B1, importante marcador da regulação do ciclo celular, cujos resultados são apresentados no item 5.3.5.

### **5.3.2 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pelo composto 4, nas células A549, por citometria de fluxo**

No momento em que o estímulo apoptótico é desencadeado nas células, várias alterações morfológicas e eventos bioquímicos são iniciados. As características frequentemente observadas nas células em processo apoptótico são redução de volume, arredondamento, retração dos pseudópodos, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e divisão em corpos apoptóticos sem muitas modificações nas organelas celulares. Para que os corpos apoptóticos, uma das alterações observadas na apoptose, sejam fagocitados e removidos pelos macrófagos é necessário que eles sejam marcados para sofrerem fagocitose. A sinalização para marcação destas células constitui um evento caracterizado pela translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana plasmática, o que evita a

ocorrência de processos inflamatórios dos tecidos vizinhos, diferentemente do que ocorre na necrose. (SCHLEGEL; WILLIAMSON, 2001; HAIL et al., 2006). A necrose é caracterizada morfológicamente por vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana plasmática e indução de inflamação nas células ao seu redor, causada pela liberação de moléculas pró-inflamatórias (EDINGER; THOMPSON, 2004).

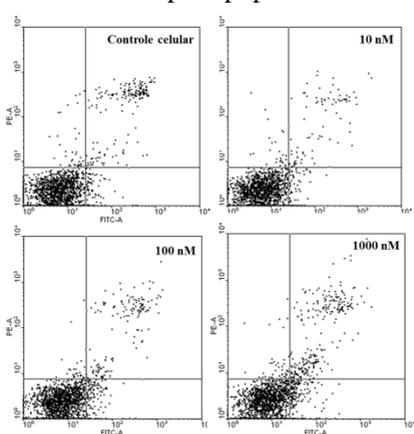
Assim sendo, os primeiros eventos investigados neste trabalho foram a sinalização das células A549 tratadas com o composto 4, através da externalização da fosfatidilserina, indicando apoptose, bem como a perda de integridade da membrana, caracterizando morte celular necrótica. Além da avaliação do potencial de indução de apoptose por um agente ser classicamente realizada em razão das conhecidas características benéficas deste tipo de morte celular (CALL; ECKHARDT; CAMIDGE, 2008), os cardenólídeos induziram morte celular apoptótica, conforme demonstrado em diversos relatos da literatura (HAUX, 1999; HUANG et al., 2004; KULIKOV et al., 2007; RAGHAVENDRA et al., 2007a; FENG et al., 2010; LU et al., 2010; WANG et al., 2010; JUNCKER et al., 2011; XU et al., 2011).

Considerando a possibilidade do efeito tóxico de um composto resultar em morte celular necrótica ou apoptótica, foi realizado o ensaio de dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo, conforme preconizado e recomendado para a caracterização desses dois tipos de morte celular (TUSCHL; SCHWAB, 2005; KROEMER, et al., 2009). O ensaio realizado tem como princípio a ligação da anexina (fluoróforo) à fosfatidilserina, externalizada na membrana quando da indução da sinalização para morte celular por apoptose por um determinado agente, constituindo, portanto, um método *in vitro* já bem estabelecido neste tipo de investigação (TUSCHL; SCHWAB, 2005). Neste mesmo ensaio, as células são submetidas à marcação com iodeto de propídeo, outro fluoróforo que se intercala nos ácidos nucleicos, quando há perda ou diminuição da integridade da membrana nuclear, o que não ocorre em células viáveis ou em apoptose precoce, evidenciando, portanto, fenômenos típicos da morte celular por necrose. As células que, por sua vez, são marcadas com ambos os fluoróforos representam a população celular nos estágios finais de apoptose, que coincidem com a necrose.

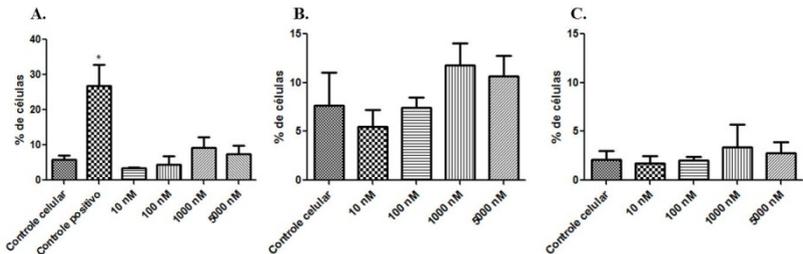
## 76 Resultados e Discussão

A fim de investigar o provável caráter indutório de morte celular por diferentes mecanismos, dependendo das concentrações usadas (nanomolar e micromolar), que é uma característica já relatada na literatura para alguns cardenolídeos (JUNCKER et al., 2009), realizou-se este ensaio com as concentrações de 10, 100 e 1000 nM. Por ser um ensaio preliminar na investigação de morte celular por apoptose ou necrose, realizou-se o tratamento também com a concentração de 5.000nM, a fim de evidenciar qualquer possível efeito de indução de apoptose ou necrose, ainda que numa concentração bastante elevada.

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que as células tratadas com o composto 4, em todas as concentrações testadas, no período de 12 h, apresentaram perfis de marcação semelhantes ao do controle. Na Figura 6, pode-se observar que não houve diferenças estatísticas significantes em nenhum dos tratamentos, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados indicaram que não houve indução de morte celular por apoptose ou necrose.



**Figura 10:** Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 12 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 10, 100 e 1.000 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com os fluoróforos Anexina V-FITC e IP e analisadas por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 - células mortas (Anexina V-, IP+); Q2 - células em estágio de apoptose tardia (Anexina V+, IP+); Q3 - células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 - células em estágios iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-).



**Figura 11:** Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 12 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com camptotecina (controle positivo) e com o composto 4, nas concentrações de 10, 100, 1.000 e 5.000 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com os fluoróforos Anexina V-FITC e IP e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam em (A) as porcentagens de células apoptóticas, determinadas pelos quadrantes Q4; (B) porcentagens de células em apoptose tardia, determinadas pelo quadrante Q2; e (C) porcentagens de células necróticas, determinadas pelo quadrante Q1. As barras representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes ( $p > 0,005$ ). Controle positivo \*  $p < 0,0001$ .

O controle positivo indutor de apoptose, neste caso a camptotecina, mostrou a eficiência do método, já que foi possível observar a ligação da anexina à fosfatidilserina externalizada, conforme esperado, uma vez que a camptotecina induz apoptose em células tumorais de pulmão (SÁNCHEZ-ALCÁZAR et al., 2003). Da mesma maneira, o controle positivo para a necrose (ciclos de congelamento e descongelamento brusco da população de células) mostrou a eficiência do método pela ligação do iodeto de propídeo ao DNA fragmentado das células necróticas (dados não mostrados).

O efeito do composto 4, em diferentes tempos de tratamento, também foi investigado (dados não mostrados), a fim de verificar se este evento era mais intenso precocemente (6 h) ou se continuava sem resposta ainda que tardio (24 h). Assim como no período de incubação de 12 h, nestes dois outros períodos também não se observou alterações nos perfis de marcação após tratamento com o cardenólídeo. Diante dos resultados obtidos, procurou-se avaliar ainda outras características da

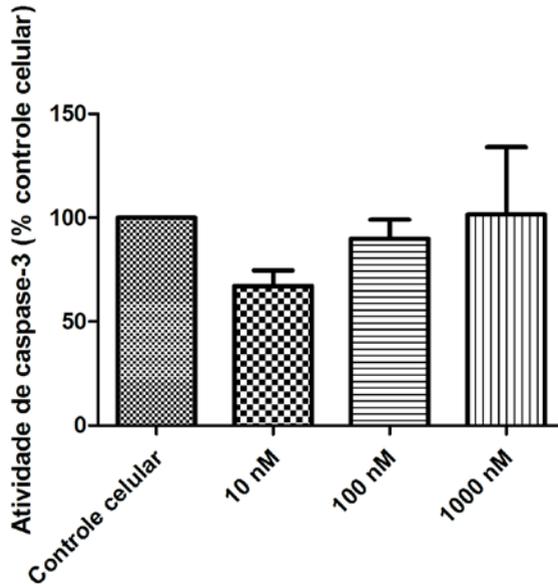
indução de morte por apoptose, tais como determinadas alterações morfológicas (dados não mostrados) e a clivagem da caspase-3 efetora de morte celular apoptótica, a fim de confirmar se os efeitos citotóxicos observados na presença do composto 4 não eram, de fato, devido à indução de morte celular por apoptose.

### **5.3.3 Avaliação da capacidade do composto 4 de clivar substratos da caspase-3**

As caspases são enzimas aspartato-específicas, mediadoras da morte celular por apoptose, que se encontram na forma de zimogênios inativos, sendo ativadas na ocorrência de morte celular apoptótica. A caspase 3, uma importante caspase efetora de morte por apoptose, é frequentemente ativada após sinalização das caspases iniciadoras, catalisando a clivagem de substratos celulares específicos, sendo essencial no processo de formação de corpos apoptóticos e de outras características morfológicas típicas associadas à morte celular apoptótica (PORTER; JANICKE, 1999).

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar se os efeitos citotóxicos induzidos pelo composto 4 eram capazes de provocar a clivagem de substratos da caspase 3, evento que distingue a morte celular apoptótica associada às caspases (MACFARLANE, 2009). A clivagem do substrato específico associado ao cromóforo (DEVD-pNA) pela caspase 3 ocasiona a liberação do cromóforo, produzindo coloração passível de quantificação por espectrofotometria, uma vez que as absorbância medidas são diretamente proporcionais à atividade enzimática.

Conforme representado na Figura 7, o tratamento das células A549 por um período de 12 h com o composto 4 não foi capaz de ativar a caspase 3, em nenhuma das concentrações avaliadas (10, 100 e 1.000nM), já que não houve diferenças estatísticas significativas entre o controle celular e os tratamentos ( $p > 0,005$ ).



**Figura 12:** Avaliação da morte celular através da ativação da caspase 3 por clivagem do substrato específico (DEVD-pNA). As células foram incubadas por 12 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 10, 100 e 1.000 nM. A análise espectrofotométrica foi realizada a 405 nm. As barras representam a média±DP de dois experimentos independentes ( $p>0,005$ ).

Diante dos resultados obtidos, confirmou-se que não houve indução de morte das células A549 por apoptose ou necrose, nem mesmo em concentrações mais elevadas. Por esta razão, avaliou-se a indução de morte celular por autofagia, bem como os efeitos em outros marcadores de vias de morte celular, cujos resultados são apresentados a seguir.

### **5.3.4 Avaliação da indução de morte celular autofágica pelo composto 4, em células A549**

Durante muitos anos, a morte celular por apoptose correspondia ao mecanismo de ação da maioria dos fármacos usados na quimioterapia do câncer. Contudo, mais recentemente, passou-se a investigar também outras vias de morte celular, tais como a autofagia e a necroptose, como forma de explicar os mecanismos de resistência encontrados pelas células tumorais aos fármacos que atuam por outras vias de sinalização de morte (KREUZALER; WATSON, 2012).

Somado a isto, um fato relevante a ser considerado na investigação dos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos é a sinalização celular distinta, induzida por um mesmo composto em tipos celulares diferentes, como no exemplo relatado por Newman e colaboradores (2007), em que o cardenolídeo oleandrina mostrou induzir morte celular por autofagia em células de câncer de pâncreas, sendo que previamente outros trabalhos já haviam mostrado que este composto induzia morte celular por apoptose, em outras linhagens celulares (MCCONKEY et al., 2000; SREENIVASAN; SARKAR; MANNA, 2003; KULIKOV et al., 2007).

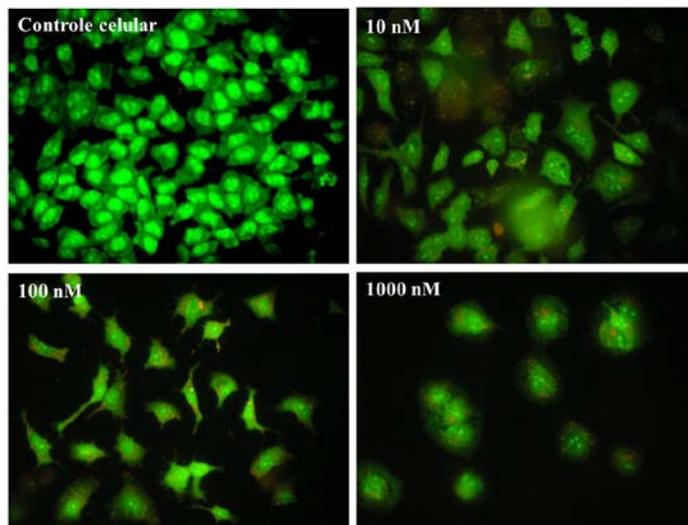
O cardenolídeo UNBS1450 também induziu diferentes tipos de morte celular em linhagens celulares distintas, observando-se morte celular por autofagia em linhagens celulares tumorais de pulmão, próstata e glia (MIJATOVIC et al., 2006b; MIJATOVIC et al., 2008; LEFRANC et al., 2008) e, posteriormente, verificou-se indução de morte celular apoptótica em células de melanoma e leucêmicas (MATHIEU et al., 2009; JUNCKER et al., 2011). Assim sendo, e diante dos resultados negativos encontrados na avaliação de morte celular por apoptose, foi realizada a investigação preliminar do potencial de indução de morte celular autofágica pelo composto 4.

No decorrer do processo de morte celular autofágica, as vesículas autofágicas (autofagossomas) são acidificadas durante a maturação e encapsulam as proteínas citosólicas, fundindo-se com os lisossomos, formando organelas vesiculares ácidas (OVA) e causando degradação do conteúdo presente nas vesículas (KONDO et al, 2005).

Para a detecção dos compartimentos acídicos, foi utilizado o corante laranja de acridina, um agente lisossomotrópico, que na forma protonada se acumula nos compartimentos acídicos, formando agregados que fluorescem em vermelho-alaranjado, enquanto o citoplasma e o núcleo apresentam cor verde (PAGLIN et al, 2001). A coloração com laranja de acridina tem sido aceita como um marcador para indicação de autofagia (ARTHUR et al., 2007; FAN et al., 2008). No entanto, com o avanço nas pesquisas sobre os eventos moleculares da autofagia, a investigação da presença deste tipo de morte celular deve ser realizada utilizando-se também outros marcadores já estabelecidos na literatura, tais como a dissociação da beclina-1 de BcL-x, a conversão de LC3-I em LC3-II, a expressão de proteínas reguladas por mTOR, como S6,

Na Figura 8 se pode visualizar as vesículas acídicas, decorrentes do tratamento com o composto 4, em comparação com a ausência da formação das mesmas no controle celular, sugerindo indução de morte celular por autofagia. Outras características morfológicas da indução de autofagia por um composto, como a formação de vacúolos característicos do autofagossoma devem ser identificadas através de microscopia eletrônica (KLIONSKY et al., 2008; KROEMER et al., 2009; AMARAVADI et al., 2011).

## 82 Resultados e Discussão

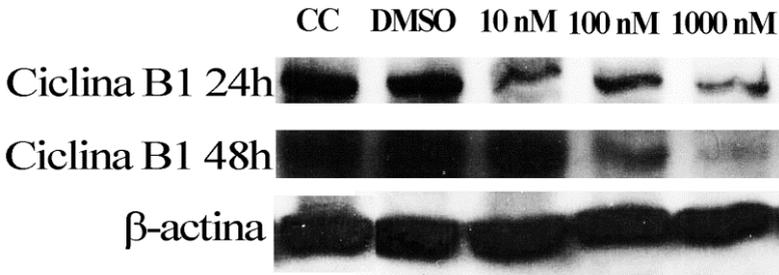


**Figura 13:** Marcação com laranja de acridina dos agregados ácido de células autofágicas. Após o tratamento com o composto 4, as células A549 foram marcadas com laranja de acridina e observadas por microscopia de fluorescência. As imagens foram capturadas com o auxílio de objetiva com aumento de 40x.

### 5.3.5 Avaliação dos efeitos do composto 4 na expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular, em células A549

Diante dos efeitos citotóxicos causados pelo composto 4 em células A549, avaliou-se também a expressão de proteínas envolvidas em vias de morte celular.

Primeiramente, em razão da verificação do bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, foi avaliada a expressão da proteína que participa da progressão do ciclo celular, a ciclina B1, nas células A549 tratadas com o composto 4 por 24 ou 48 h. Na Figura 9 pode-se observar a diminuição da expressão da ciclina B1, causada pelo tratamento com o composto 4, nas concentrações de 10 e 100 nM e, principalmente, na concentração de 1.000 nM em relação ao controle não tratado e ao veículo (DMSO). A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno das amostras.



**Figura 14:** Efeito do composto 4 na expressão da proteína ciclina B1 do ciclo celular. As células foram incubadas ou não por 24 e 48 h com o composto 4 nas concentrações de 10, 100 e 1.000 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e lisadas para análise por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

A progressão do ciclo celular é regulada por diversas ciclinas e quinases (CDK), e sinais extracelulares como a disponibilidade nutricional e fatores de crescimento desencadeiam ativação das ciclinas, para que exerçam atividade. Os complexos ciclina-CDK são reguladores positivos da progressão do ciclo celular, enquanto que as proteínas da família INK, KIP e CIP são reguladoras negativas do ciclo, uma vez que inibem as CDK. Na passagem do estado quiescente (G0) para a entrada no ciclo celular, as CDK4 e CDK6 formam complexos ativos com as ciclinas do tipo D e iniciam a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), inativando a ação repressora de transcrição. O outro complexo ativo, ciclina E-CDK2 irá reforçar a fosforilação da Rb (proteína central no controle da proliferação celular) ao final da fase G1, permitindo assim que a expressão gênica da fase de síntese do ciclo celular se inicie. Este é um dos chamados pontos de restrição, que são muito importantes no câncer, uma vez que alterações nos reguladores da progressão do ciclo celular podem acarretar em proliferação independente da célula tumoral. A manutenção da fosforilação da Rb para que o ciclo celular continue em progressão é dependente da atividade dos complexos ciclina A-CDK1 e A-CDK2 e ciclina B-CDK1 (LAPENNA; GIORDANO, 2009). Portanto, o bloqueio observado no ciclo celular em G2/M causado pelo composto 4 pode ter sido causado pela diminuição da expressão da ciclina B1, impedindo a fosforilação subsequente de Rb e a consequente progressão do ciclo celular.

Posteriormente, foi avaliada a expressão de proteínas das vias AKT, MAPK e NF- $\kappa$ B frente ao tratamento com o composto 4, nas concentrações de 10 e 100 nM, em células A549, sendo essas estimuladas ou não com TNF $\alpha$ , controle positivo indutor das vias investigadas<sup>2</sup>.

A proteína AKT, também conhecida como proteína quinase B (PKB), é uma intermediária sinalizadora ativada por tirosina quinases e pela quinase fosfatidil-inositol-3 (PI3K). A via PI3K tem sinalização comumente alterada na ocorrência do câncer e a ativação pode se dar por mutações nos genes supressores de tumores (como PTEN), por mutações no próprio complexo PI3K ou pela sinalização irregular do receptor de tirosina quinase. As quinases AKT são as proteínas efetoras mais estudadas da via PI3K e regulam diversos processos celulares, tais como a proliferação e a sobrevivência celulares, tamanho e resposta à disponibilidade de nutrientes, invasão tecidual e angiogênese, e se encontram hiperativadas em tumores sólidos humanos, bem como nos cânceres hematológicos (BELLACOSA et al., 2005). Além de outros mecanismos por ela intermediados para a garantia do crescimento e da sobrevivência celulares, colaborando com os efeitos oncogênicos desta via (CAIRNS et al, 2011), a AKT1 estimula a sinalização da quinase mTOR, por fosforilar seu regulador negativo. Esta proteína é constitutivamente ativa durante a tumorigênese, já que mTOR é um ponto chave de integração metabólica, pois em resposta à disponibilidade de condições nutricionais e energéticas apropriadas, estimula a biossíntese de proteínas e lipídeos e o crescimento celular (PLAS; THOMPSON, 2005; GUERTIN; SABATINI, 2007; ROBEY; HAY, 2009). A proteína quinase AKT é um fator de sobrevivência bem estabelecido, exercendo atividade antiapoptótica, por prevenir a liberação do citocromo c das mitocôndrias e inativar os fatores pró-apoptóticos e, desta maneira, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do câncer (TESTA; BELLACOSA, 2001; ALTOMARE; TESTA, 2005). Além disso, ela inativa fatores essenciais de transcrição para que ocorra apoptose, como o gene ligante de Fas e, ainda, ativa a

---

<sup>2</sup> Estes ensaios foram realizados por Izabella Thaís da Silva, durante seu estágio sanduíche no Instituto de Virologia Molecular, Westphalian Wilhelms-Universidade de Münster, Alemanha, sob a orientação do Prof. Dr. Stephan Ludwig, seguindo a mesma metodologia aqui descrita (item 4.7).

quinase I $\kappa$ B (IKK), um regulador positivo de NF- $\kappa$ B, que resultará na transcrição de genes antiapoptóticos (POMMIER et al., 2004). Outras ações indiretas da AKT são antagonizar os pontos de checagem do ciclo celular mediados por p53, bem como aumentar a meia-vida e a tradução (via AKT/mTOR) da ciclina D1, permitindo a progressão do ciclo celular (LIANG; SLINGERLAND, 2003). A sinalização mediada pela AKT ainda coopera em outros processos celulares característicos do câncer, como por exemplo, migração da célula tumoral, invasão e metástase do tumor, sendo a elevada ativação significativa em vários aspectos da tumorigênese (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). Em razão da sinalização alterada, observada em vários tipos de câncer, ela constitui um alvo molecular a ser considerado para a prevenção e a terapia daqueles cânceres que detêm elevada expressão desta proteína. As estratégias para intervenção nesta via como potencial alvo terapêutico incluem a inibição seletiva de receptores tirosina quinase, bem como as quinases PI3K, AKT e mTOR (LUO et al., 2003; KUMAR; MADISON, 2005).

Ainda que o maior pressuposto para a inibição desta via, envolvida na sobrevivência, proliferação e invasão celulares, seja a indução da apoptose, o envolvimento da via da AKT na morte celular por autofagia vem sendo abordado e considerado também como alvo na terapia do câncer. Sabe-se, ainda, que genes supressores de tumores que agem na via de sinalização mTOR, não somente estimulam como também regulam a autofagia (AOKI et al., 2007).

Outra via importante no controle de processos fisiológicos fundamentais, tais como crescimento, proliferação, diferenciação e migração celulares e apoptose, é a das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Para serem ativadas, por um estímulo específico, há necessidade de fosforilação por outras duas quinases acima da via, MAPKK e MAPKKK. Entre os grupos caracterizados de MAPKs, destacam-se: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase Jun N-terminal (JNK) e p38. As quinases ERK1/2 estão envolvidas no processo de regulação da meiose e mitose, sobrevivência, migração, angiogênese e podem ser ativadas por diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, citocinas, infecção viral e ação de carcinógenos (JOHNSON; LAPADAT, 2002). De particular interesse no câncer, pode-se citar alguns estímulos, tais como a superexpressão de receptores tirosina quinase, a ativação de mutações nestes receptores e as mutações no proto-oncogene Ras (DHILLON et al., 2007). As JNKs

## 86 Resultados e Discussão

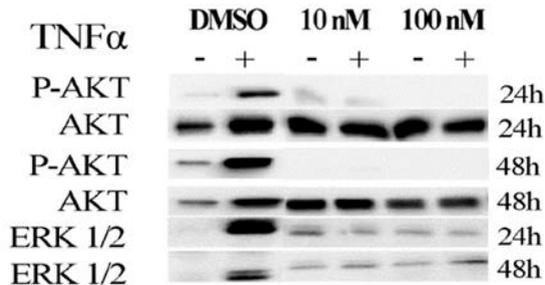
e a p38 são ativadas, principalmente, por citocinas inflamatórias ou por estímulos externos de estresse. As JNK são responsáveis pela fosforilação da proteína de ligação ao DNA, conhecida como c-Jun, e parecem estar relacionadas à indução da tumorigênese provocada por Ras, bem como à repressão do gene p53. A terceira família, que engloba as diferentes isoformas da quinase p38, é importante na resposta inflamatória, já que sua presença é necessária para a expressão do TNF $\alpha$  e da interleucina-1. Além do papel na inflamação, a via da p38 também influencia a regulação da apoptose (ativação de p53), a progressão do ciclo celular (regulador negativo), e o crescimento e a diferenciação celulares (JOHNSON; LAPADAT, 2002; DHILLON et al., 2007). A via MAPK também está envolvida na regulação da autofagia. O estudo de Corcelle e colaboradores (2007) mostrou que a p38 pode limitar a autofagia, por reduzir a maturação de autofagossomas, enquanto que o ERK, diante de um estímulo autofágico, é ativado transitoriamente, podendo impedir este bloqueio e estimular a maturação de autofagossomas.

Para a avaliação dos efeitos do composto 4 nestas vias de sinalização, as células A549 foram tratadas, nas concentrações de 10 e 100 nM, por 24 e 48h. Conforme demonstrado na Figura 10, após 24 h de tratamento, houve importante inibição da fosforilação de AKT, na menor concentração utilizada, e após 48h, ambas as concentrações avaliadas provocaram inibição completa desta via. Da mesma forma que o composto 4, a oleandrina, outro glicosídeo cardiotônico, mostrou ser um potente inibidor da fosforilação de AKT, em concentrações nanomolares, em células de carcinoma de pâncreas, além de promover o bloqueio do ciclo celular em G2/M, sem observação de uma subpopulação em G1, como é tipicamente associado à morte celular por apoptose. Neste mesmo estudo, também foi relatado que a oleandrina induziu a morte celular por autofagia (NEWMAN et al., 2007).

Em indivíduos com alto risco ou com câncer de pulmão, a via AKT é um alvo especialmente importante, já que a ativação nestes casos parece ser um evento precoce e está relacionada à grande capacidade de invasão, sendo que a avaliação de sua expressão pode ser importante no prognóstico deste câncer (BALSARA et al., 2004; DAVID et al., 2004). Em células de carcinoma de pulmão, a porcentagem de ativação de AKT é alta, podendo variar de 30 a 75%

(ALDOMARE; TESTA, 2005) e no estudo realizado por Lu e colaboradores (2010), a avaliação do efeito do cardenolídeo periplocina, em células A549, mostrou que o bloqueio da fosforilação de AKT e ERK, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contribuiu para a atividade antitumoral observada.

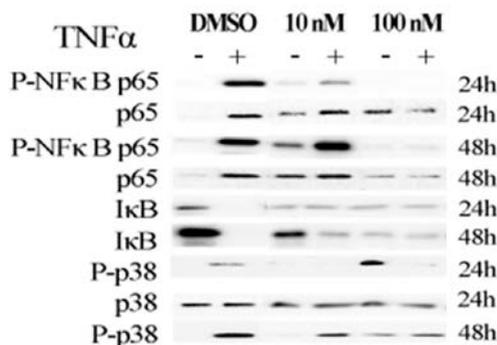
Na avaliação da via ERK, observou-se que o composto 4 causou diminuição da expressão de ERK, nas concentrações testadas, tanto em 24 quanto em 48 h (Figura 10). É interessante observar que mesmo diante da ativação desta via pelo TNF $\alpha$ , após o tratamento, o composto não permitiu a maior expressão desta proteína. A diminuição da expressão de ERK 1/2 pelo composto 4 implica em um menor estímulo de sobrevivência das células tumorais, estando por isso envolvida na morte celular induzida por este composto. Contrariamente, o envolvimento da via ERK na morte celular autofágica induzida por cardenolídeos foi demonstrado por Newman e colaboradores (2007), pois a oleandrina provocou o aumento da expressão de ERK em células pancreáticas, sendo que a ativação desta via parece regular positivamente a autofagia (OGIER-DENIS et al., 2000). Ainda na via das MAPKs, foi investigado o efeito do composto 4 na expressão de p38, na concentração de 100 nM, por 24 h, e constatou-se que ele induziu fosforilação de p38, sendo que em 48 h esta indução foi observada nas duas concentrações avaliadas (Figura 11).



**Figura 15:** Efeito do composto 4 na expressão de proteínas das vias AKT e ERK. As células foram incubadas por 24 ou 48 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram estimuladas com TNF $\alpha$  15 min antes de serem lisadas para estimular as células a expressarem as proteínas correspondentes a cada via e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

## 88 Resultados e Discussão

Neste período mais longo de tratamento (48 h), o composto 4 também foi capaz de induzir fosforilação, após o estímulo com TNF $\alpha$  (Figura 11). Pelo envolvimento de p38 na regulação negativa do ciclo celular e na supressão de tumor, pode-se supor que a fosforilação causada pelo tratamento com o composto 4 também colaborou para a indução de morte celular.



**Figura 16:** Efeito do composto 4 na expressão de proteínas das vias NF- $\kappa$ B e p38. As células foram incubadas por 24 ou 48 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o composto 4, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram estimuladas com TNF $\alpha$  15 min antes de serem lisadas para estimular as células a expressarem as proteínas correspondentes a cada via e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

Outra via investigada foi a NF- $\kappa$ B, já que seus alvos genéticos exercem diversas funções que se relacionam intimamente com o câncer (KARIN et al., 2002). A ativação, associada à inflamação, na promoção do tumor, progressão e formação de metástase está bem estabelecida, tendo sido demonstrada em vários modelos *in vivo* (LUO et al., 2004; PIKARSKY et al., 2004).

A família NF- $\kappa$ B é composta por cinco membros, dentre eles, a RelA, também conhecida como p65. As proteínas desta família intervêm na ligação ao DNA, dimerização e interação com fatores

inibitórios específicos, os I $\kappa$ B, os quais mantêm os dímeros de NF- $\kappa$ B no citoplasma. A ativação de NF- $\kappa$ B pode ser estimulada de diversas maneiras, incluindo exposição à citocinas pró-inflamatórias e resposta a infecções virais e microbianas, sendo importante na regulação, tanto de morte quanto de sobrevivência celular. Tais estímulos ativam NF- $\kappa$ B, através da fosforilação da quinase dependente de I $\kappa$ B (IKK-dependente), e causam subsequente degradação das proteínas I $\kappa$ B. Os dímeros de NF- $\kappa$ B liberados entram no núcleo das células, onde regulam a transcrição de diversos genes codificadores de fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e proteínas pró- e anti-apoptóticas (GHOSH; KARIN, 2002; KARIN; LIN, 2002;).

O complexo IKK, por sua vez, é composto por duas subunidades homólogas de quinase, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , e uma subunidade reguladora, IKK $\gamma$  (KARIN; DELHASE, 2000). Inibidores de I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B podem ser efetivos mesmo quando usados como adjuvantes ao tratamento anticâncer convencional, uma vez que várias vias são ativadas ou inativadas simultaneamente, em uma determinada população de células tumorais, necessitando abranger diversas vias de sinalização para que ele seja ainda mais efetivo. Exemplo disso é o fármaco trióxido de arsênio, utilizado no tratamento da leucemia promielocítica (ROUSSELOT et al., 2004). A inibição desta via apresenta, ainda, a vantagem de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, em células inflamatórias infiltrantes, as quais representam uma fonte importante de crescimento tumoral e fatores de sobrevivência. A ativação constitutiva desta via em várias linhagens celulares, incluindo as células de carcinoma de pulmão (MIJATOVIC et al., 2006a), acarreta em resistência à morte celular induzida em tumores, tanto de forma natural como por meio de fármacos, uma vez que estas células se tornam capazes de escapar da morte celular por apoptose, necrose, autofagia, senescência, catástrofe mitótica e paraptose (JUNCKER et al., 2009). Portanto, inibidores desta via são importantes na P&D de fármacos para o combate ao câncer (MIJATOVIC et al., 2006a; JUNCKER et al., 2009).

Na Figura 11, observa-se diminuição da fosforilação de NF- $\kappa$ B-p65, bem como degradação de I $\kappa$ B, especialmente no tratamento com 100 nM do composto 4, no período de 24 h. A fosforilação de NF- $\kappa$ B-p65 foi reduzida, após o tratamento das células com o composto 4, na concentração de 100 nM, por 24 h, culminando com a redução da degradação de I $\kappa$ B. Este efeito inibitório induzido pelo composto 4 em células A549 nesta via, acarretou na morte celular observada, uma vez

## 90 Resultados e Discussão

que esta via, quando ativada, está relacionada à progressão do crescimento das células tumorais e sua sobrevivência. Inclusive, já existem relatos da inibição desta via pelos cardenolídeos. Manna e colaboradores (2000) relataram que a oleandrina inibiu a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e provocou morte celular por apoptose, da mesma maneira que Yang e colaboradores (2005) também demonstraram que a digitoxina é um potente inibidor desta via. Além disso, Juncker e colaboradores (2011) mostraram que o composto UNBS1450 foi capaz de provocar a desativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF $\alpha$ , em células leucêmicas, através da redução da translocação do dímero p50/p65 para o núcleo, tendo em vista a diminuição da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$ .

A inibição da ativação de NF- $\kappa$ B pode ser uma das razões pelas quais os cardenolídeos são capazes de inibir a tumorigênese (MANNA et al., 2000). A investigação do efeito do cardenolídeo UNBS 1450, em células A549, sobre esta via, mostrou que o composto desativou a atividade de NF- $\kappa$ B *in vitro*, em vários níveis, incluindo a inibição da porção estimulatória p65, inibindo a degradação de I $\kappa$ B. Na avaliação prévia do mecanismo de morte celular *in vitro*, foi comprovada morte celular independente de caspases, envolvendo permeabilização da membrana lisossomal (MIJATOVIC et al., 2006a). Apesar dos diversos relatos na literatura sobre a inibição desta via induzida por cardenolídeos, Takada e colaboradores (2009) sugeriram que a ativação de NF- $\kappa$ B pode ser específica de certos tipos celulares, já que eles não observaram a indução dessa via, em células A549, pela ouabaína. Contudo, os resultados aqui apresentado com o composto 4 mostraram que esta indução ocorre nesta linhagem celular.

As vias AKT e NF- $\kappa$ B podem agir conjuntamente, já que a quinase AKT é uma das quinases IKK, e a ativação de NF- $\kappa$ B constitui um dos mecanismos pelo qual AKT promove aumento de sobrevivência celular e, por essa razão, estas vias agem convergindo para uma mesma finalidade (POMMIER et al., 2004). Desta maneira, a inibição das vias AKT e NF- $\kappa$ B induzida pelo composto 4 acarretou na morte celular observada. O bloqueio do ciclo celular em G2/M e a diminuição da expressão de ciclina B1, observados para este composto, também podem estar relacionados com a inibição da via AKT, uma vez que a ativação desta via inibe a iniciação do ponto de checagem do ciclo

celular em G2/M, permitindo a progressão do ciclo (LIANG; SLINGERLAND, 2003; KUO; LING; CHO, 2006). Portanto, a inibição de AKT pode ter influenciado o bloqueio do ciclo celular provocado pelo composto 4, nas células A549. O bloqueio nesta fase do ciclo, bem como inibição de AKT, também foi observado no estudo de Newman e colaboradores (2007), no qual a oleandrina induziu morte celular por autofagia em células tumorais de pâncreas.

#### **5.4 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica dos cardenolídeos mais citotóxicos**

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase é uma proteína de membrana integral, constituída por subunidades catalíticas  $\alpha$  e regulatórias  $\beta$ , as quais formam um heterodímero. A subunidade  $\alpha$  possui um domínio transmembranário e três domínios citosólicos. As moléculas de ATP, sódio, potássio, bem como os cardenolídeos se ligam na região transmembrana desta proteína (BLANCO; MERCER, 1998).

Ela é uma proteína expressa de maneira ubíqua em diferentes tecidos de mamíferos (HORISBERGER, 2004), e a distribuição das quatro isoformas  $\alpha$  e três isoformas  $\beta$ , caracterizadas até o momento, difere nos tecidos em condições fisiológicas normais ou alteradas (MOBASHERI et al., 2000). Várias funções enzimáticas e de transporte, essenciais para a viabilidade celular, são atribuídas à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, também chamada bomba de sódio, uma vez que o gradiente de íons sódio/potássio está envolvido em diversos processos celulares, tais como regulação do volume celular, prevenção de lise, controle do potencial de membrana, na homeostase do pH, entre outros (FALER, 2008). Os cardenolídeos exercem ação através da ligação aos domínios extracelulares das subunidades  $\alpha$  catalíticas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, encontrando-se fortemente fixados à enzima, acarretando em sua inativação (ERDMANN; SCHONER, 1973).

Por estas razões, foi investigada a potencial atividade anti-ATPásica dos compostos que apresentaram os valores de  $\text{CI}_{50}$  mais promissores na triagem realizada inicialmente em células A549. Além desses cardenolídeos, a digitoxina e a digoxina (compostos 6 e 29, respectivamente) foram incluídos como controles positivos, em razão de sua reconhecida inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (PULLEN; BROOKS; EDWARDS, 2004). Cinco concentrações foram testadas para cada

## 92 Resultados e Discussão

composto, partindo-se da concentração de 100  $\mu\text{M}$  e realizando-se diluição 1:10. A concentração de cada amostra, que inibiu 50% da atividade enzimáticas, foi calculada a partir das curvas dos percentuais de inibição e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Inibição da atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  pelos cardenolídeos mais citotóxicos testados neste trabalho.

| Composto   | $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )<br>$\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ | $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )<br>Células A549 |
|------------|---|--|
| 2          | 0,060 (0,009 - 0,306)   | 0,033 $\pm$ 0,002                                  |
| 3          | 0,550 (0,214 - 1,414)   | 0,058 $\pm$ 0,004                                  |
| 4          | 3,170 (1,624 - 6,194)   | 0,019 $\pm$ 0,004                                  |
| 41         | 0,004 (0,001 - 0,013)   | 0,088 $\pm$ 0,005                                  |
| 66         | 0,060 (0,025 - 0,129)   | 0,032 $\pm$ 0,001                                  |
| 67         | 0,190 (0,095 - 0,382)   | 0,045 $\pm$ 0,003                                  |
| Digitoxina | 1,600 (0,528 - 4,836)   | 0,368 $\pm$ 0,021                                  |
| Digoxina   | 2,720 (0,834 - 8,858)   | 0,133 $\pm$ 0,007                                  |

Os resultados obtidos mostram que não houve correlação direta de inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  com a elevada citotoxicidade apresentada pelos compostos testados ( $r^2=0,0558$ ). O composto que apresentou a maior atividade anti-ATPásica foi o composto 41, seguido pelos compostos 2 e 66, no entanto não foi observada diferença entre os seis compostos avaliados ( $p > 0,05$ ; ANOVA, seguido do teste de Tukey). Esses resultados sugerem que o efeito citotóxico dos cardenolídeos avaliados em células A549 não está diretamente relacionado com a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . Conforme relatado na literatura, a cascata de sinalização, provocada pela interação dos cardenolídeos com a bomba de sódio, pode ser independente de alterações das concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (XIE; ASKARI, 2002; WANG et al., 2004), o que foi demonstrado com o cardenolídeo UNBS1450, pois apesar do efeito citotóxico promissor, em células tumorais, ele não possui atividade cardiotônica, nas mesmas concentrações, além de ser melhor tolerado *in vivo* do que os cardenolídeos ouabaína e digitoxina (VAN QUAQUEBEKE et al, 2005).

Apesar da função de transporte da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase já ter sido bastante investigada, grande parte da pesquisa, realizada na última década, com esta proteína resultou na observação de sua atividade sinalizadora (XIE, 2003; LIANG et al., 2007) e foi proposta a existência de dois conjuntos de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  na membrana plasmática, um agindo como transdutor de energia (bomba de íons) e outro como sendo transdutor de sinalização da enzima (XIE; ASKARI, 2002).

Através do estudo da ligação dos cardenolídeos à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, observou-se a ativação de várias vias sinalizadoras intracelulares, além do clássico mecanismo de elevação da concentração citosólica de sódio. Por acarretar uma sinalização intracelular complexa, a interação dos cardenolídeos com a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase pode influenciar na proliferação, diferenciação e morte celulares (JUNCKER et al., 2009; WENNER, 2009).

Vários estudos relataram que a expressão da subunidade catalítica  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase em células tumorais é mais elevada do que em células saudáveis e relacionaram esta expressão com o efeito citotóxico e seletivo dos cardenolídeos em células tumorais (MIJATOVIC et al., 2007; LEFRANC; KISS, 2008; LEFRANC et al., 2008; MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012b). Inclusive, Mijatovic e colaboradores (2007) mostraram que a expressão da subunidade catalítica  $\alpha 1$  desta enzima é elevada em células A549 e atribuíram este efeito à alta citotoxicidade do cardenolídeo UNBS1450 nessas células.

A enzima utilizada (origem porcina) no ensaio realizado neste trabalho possui as três isoformas da subunidade,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , podendo ser esta mais uma razão para a não correlação entre a atividade anti-ATPásica e a citotoxicidade dos cardenolídeos, observada com os cardenolídeos testados. Por esta razão, não se exclui a possibilidade dos efeitos citotóxicos induzidos pelos cardenolídeos estarem relacionados à maior expressão da subunidade  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, em células A549, o que necessita ser comprovado através de outros ensaios celulares.

Em estudo recente, Mijatovic e colaboradores (2012a) reuniram, pela primeira vez, as principais características estruturais de cardenolídeos, com base nos relatos da literatura para o efeito citotóxico que estes compostos exercem em células tumorais. Os requisitos estruturais descritos, relacionados com a elevada inibição do crescimento de células tumorais foram: a presença de um grupamento aldeído no C10; a presença de uma hidroxila no C14; a configuração *cis*

## 94 Resultados e Discussão

entre os anéis C e D; e a presença da porção lactona no C17. Algo que deve ser ressaltado, é que a natureza cíclica desta última não é essencial para a atividade citotóxica, mas sim para a ligação à enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ , o que demonstra a possível independência da citotoxicidade com relação à inibição da bomba.

Destaca-se que todas as características estruturais descritas acima foram detectadas nos compostos 66 e 67; para os outros quatro compostos estudados (2, 3, 4 e 41), somente a presença de um grupo aldeído em C10 não foi observada.

### **5.5 Considerações finais sobre o mecanismo de ação**

As investigações realizadas com o composto 4 mostraram que o promissor efeito antiproliferativo observado na triagem se deu em razão do bloqueio da fase G2/M do ciclo celular, diante da diminuição da expressão de ciclina B1 causada por esse cardenolídeo. Além disso, o efeito citotóxico não se dá por vias apoptóticas ou necróticas, conforme constatado nos ensaios de marcação com anexina e iodeto de propídeo, bem como pela ausência da ativação da caspase-3. Sugere-se que o mecanismo de indução de morte celular pelo composto 4 ocorre por autofagia, através da observação microscópica dos compartimentos acídicos marcados com laranja de acridina. A avaliação da interferência de vias de sinalização, como AKT, MAPK e  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , comprovou o envolvimento dessas vias no processo de morte celular.

## 6 CONCLUSÕES

- Na triagem citotóxica realizada com as células tumorais A549 e RD, 24 dos 64 cardenolídeos testados apresentaram valores de  $CI_{50}$  inferiores a  $1\mu\text{M}$ , frente às células A549, e 23 deles frente às células RD, sendo que seis cardenolídeos apresentaram valores de  $CI_{50}$  inferiores a 100 nM, sendo o mais citotóxico desses compostos, o glucoevatromonosídeo (composto 4), com uma  $CI_{50}$  de 19 nM, em células A549, e que foi, portanto, selecionado para a elucidação do seu mecanismo de ação nessas células;
- A citotoxicidade dos seis compostos mais tóxicos, em células A549, foi, no mínimo, 173X maiores do que os valores de  $CI_{50}$  em células tumorais, sugerindo que estes compostos possuem seletividade pelas células tumorais avaliadas. O composto 4 mostrou-se 14.400X mais seletivo para as células A549 do que para as células VERO.
- O composto 4 não induziu morte celular por apoptose ou necrose, em células A549, nas concentrações testadas;
- O composto 4 não ativou a caspase 3, em células A549, nas concentrações testadas;
- A visualização microscópica dos compartimentos ácidos marcados com laranja de acridina, em células A549, sugeriu a indução de morte celular autofágica pelo composto 4, nas concentrações testadas;
- O composto 4 interferiu na expressão da ciclina B1, envolvida na progressão do ciclo celular, e em várias proteínas envolvidas em vias de morte celular. A diminuição da expressão de ciclina B1 causou bloqueio do ciclo celular em G2/M, e está relacionada as alterações observadas nos padrões de expressão das proteínas das vias AKT, MAPK e NF- $\kappa$ B, em células A549, nas concentrações testadas;
- Não foi observada correlação da atividade anti-ATPásica dos seis compostos selecionados com a elevada citotoxicidade por eles apresentada em células A549.



## 7 PERSPECTIVAS

- Dar continuidade a investigação do mecanismo de ação citotóxico dos compostos mais promissores na triagem realizada em células A549;
- Dar continuidade à investigação do mecanismo de ação citotóxico dos outros cardenolídeos promissores, detectados na triagem realizada em células A549;
- Investigar *in vitro* as outras vias moleculares envolvidas na atividade citotóxica do composto 4 e/ou dos outros compostos, tais como p53 e mTOR, em células A549, utilizando o ensaio de Western Blotting;
- Avaliar marcadores específicos da provável autofagia induzida pelo composto 4 e/ou pelos outros compostos em células A549, tais como beclina-1, pelo ensaio de imunoprecipitação, e conversão de LC3-I a LC3-II, por microscopia de fluorescência;
- Avaliar o efeito do composto 4 e/ou dos outros compostos nas características morfológicas celulares, tais como aumento de volume e da presença dos compartimentos acídicos, por microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo, respectivamente;
- Avaliar o efeito do composto 4 e/ou dos outros compostos na expressão de outros marcadores da progressão do ciclo celular, em células A549;
- Verificar o possível sinergismo do composto 4 e/ou dos outros compostos com o paclitaxel e/ou com outros fármacos utilizados na quimioterapia do câncer de pulmão, em células A549;
- 
- Avaliar a atividade anti-ATPásica do composto 4 e/ou dos outros compostos relacionada à expressão da isoforma  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase em células tumorais e não-tumorais, através de PCR;

## 98 Perspectivas

- Avaliar a seletividade *in vitro* do composto 4 e/ou dos outros compostos em células não-tumorais de pulmão;
- Avaliar o mecanismo de ação citotóxico do composto 4 e/ou dos outros compostos frente à outras linhagens celulares tumorais, uma vez que o mecanismo pode ser distinto, utilizando ensaios de citometria de fluxo, de preferência frente a células representativas de cânceres relevantes do ponto de vista epidemiológico, como as de câncer de próstata e /ou de mama;
- Avaliar o potencial antitumoral do composto 4 e/ou dos outros compostos, em modelo xenográfico de câncer de pulmão em camundongos.

## 8 OUTRAS ATIVIDADES

- Confirmação de atividade anti-herpética de alguns cardenolídeos e avaliação de sinergismo do aciclovir com cardenolídeos;
- Avaliação da atividade anti-herpética de cultivares de morangos (artigo em apêndice) e extratos de mirtilos;
- Avaliação do mecanismo de ação citotóxica de algumas cucurbitacinas, em conjunto com a doutoranda Izabella Thaís da Silva (artigo em elaboração);
- Determinação da concentração citotóxica de complexos metálicos adicionados a um agente de transfecção, fruto de uma parceria com o doutorando Bernardo de Souza, orientado pelo Prof. Dr. Ademir Neves (PPG-Química da UFSC) (artigo em elaboração);
- Participação em duas edições do Congresso Brasileiro de Virologia, com apresentação de resumos:
  - CARVALHO, A.; BERTOL, J. W.; PÁDUA, R. M.; KRIES, W.; BRAGA, F. C.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antitherpes screening of cardenolides derivatives. 2010. In: XXI Encontro Nacional de Virologia, 2010, Gramado. XXI Encontro Nacional de Virologia.
  - CARVALHO, A.; BLUM-SILVA, C. H.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H.; SIMOES, C. M. O. Analysis of anthocyanins and flavonoids contents and antitherpes activity of five strawberry cultivars. 2011. In: XXII Encontro Nacional de Virologia, 2011, Atibaia. XXII Encontro Nacional de Virologia.



**REFERÊNCIAS**

ALTOMARE, D. A.; TESTA, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, v. 24, p. 7455-7464, 2005.

AMARAVADI, R. K. et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. **Clinical Cancer Research**, v.17, n. 4, p. 654-666, 2011.

ANTCZAK, C. et al. Revisiting Old Drugs as Novel Agents for Retinoblastoma: In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Cardenolides. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 7, p. 3065-3073, 2009.

AOKI, H. et al. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. **Molecular Pharmacology**, v. 72, p. 29-39, 2007.

ARK, M.; OZDEMIR, A.; POLAT, B. Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of rock-2. **Apoptosis**, v. 15, p. 1494–1506, 2010.

ARTHUR, C. R. et al. Autophagic cell death, polyploidy and senescence induced in breast tumor cells by the substituted pyrrole JG-03-14, a novel microtubule poison. **Biochemical Pharmacology**, v.74, p. 981– 991, 2007.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.

BALSARA, B. R. et al. Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. **Carcinogenesis**, v. 25, n.11, p. 2053-2059, 2004 .

## 102 Referências

BELLACOSA et al. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. **Advances in Cancer Research**, v. 94, p. 29-86, 2005.

BENSON, J.R.; LIAU, S.S. Cancer genetics: a primer for surgeons. **Surgical Clinics of North America**, v. 88, p. 681 - 704, 2008.

BERTOL, J. W. et al. Antitherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v. 92, p. 73-80, 2011.

BINDSEIL, K. U. et al. Pure compound libraries: a new perspective for natural product based drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 6, p. 840-847, 2001.

BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1493-1497, 2006.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na-KATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. F633-F650, 1998.

BLOISE, E. et al. Pro-apoptotic and cytostatic activity of naturally occurring cardenolides. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 64, p. 793-802, 2009.

BORGHAEI, H.; SMITH, M.R.; CAMPBELL, K.S. Immunotherapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p.41-54, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, F. C. et al. Avaliação quantitativa de cardenólídeos no cultivar experimental de *digitalis lanata* do maciço do itatiaia e perspectivas de seu emprego industrial. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 481-485, 1997.

BRASIL. *Bulário Eletrônico*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2008. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico>. Acesso em: 13 de julho de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acesso em 12 julho de 2012.

BUGELSKI, P. J. et al. A Strategy for Primary High Throughput Cytotoxicity Screening in Pharmaceutical Toxicology. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 10, 2000.

CAIRNS, R.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature**, v. 11, p. 85-95, 2011.

CALL, J. A.; ECKHARDT, S. G.; CAMIDGE, D. R. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. **Lancet-Oncology**, v. 9, p. 1002-1011, 2008.

CAO, Y; DePinho, R. A.; Ernst, M.; Vousden, K. Cancer research: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 749-754, 2011.

CERELLA, C; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, doi:10.1016/j.mito.2012.06.003, 2012.

## 104 Referências

- CORCELLE et al. Control of the Autophagy Maturation Step by the MAPK ERK and p38. **Autophagy**, v. 3, n. 1, p. 57-59, 2007.
- DAVID, O. et al. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 6865-6871, 2004.
- DE ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p.118-129, 2005.
- DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 3279-3290, 2007.
- DODSON, A. W.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M.; COEN, D. M. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, p. 340-348, 2007.
- DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. et al. The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. **Molecular Cancer**, v. 7, n. 82, p. 1-33, 2008.
- EDINGER, A.L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.
- ERDMANN, E.; SCHONER, W. Ouabain-receptor interactions in (Na+K+)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 307, p. 386-98, 1973.
- FAN, C. et al. Synthesis and discovery of autophagy inducers for A549 and H460 lung cancer cells, novel 1-(2'-hydroxy-3'-aroxypropyl)-3-aryl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3860-3864, 2008.

- FELTH, J. et al. Cytotoxic Effects of Cardiac Glycosides in Colon Cancer Cells, Alone and in Combination with Standard Chemotherapeutic Drugs. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1969–1974, 2009.
- FENG, B. et al. 2 Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 142-153, 2010.
- FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 382-39, 2003.
- FRANÇA. Globocan 2008 - Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. International Agency for research on Cancer – OMS. Lyon: IARC, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>> Acesso em 08 de julho de 2012.
- FRESE, S. et al. Cardiac Glycosides Initiate Apo2L/TRAIL-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Up-regulation of Death Receptors 4 and 5. **Cancer Research**, v. 66, p. 5867-5874, 2006.
- GHOSH, S.; KARIN, M. Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. **Cell**, v. 109, p. S81–S96, 2002.
- GOTO, A. et al. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 1093-1101, 1990.
- GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer. **Cancer Cell**, v. 12 p. 9-22, 2007.
- HAIL, J. N.; CARTER, B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 11, p. 889 – 904, 2006.

## 106 Referências

HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 6259-6263, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARTLEY, C.; HARTLEY, M.; PARDOE, I.; KNIGHT, A. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. **Arch. Virol.**, v. 151, p. 2495-2501, 2006.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, 2008.

HAUX, J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 6, p. 543-548, 1999.

HAUX, J.; KLEPP, O.; SPIGSET, O.; TRETTLI, S. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC Cancer**, v. 1, p. 1-11, 2001.

HOFFMANN, H. H.; PALESE, P.; SHAW, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Res.**, v. 80, p. 124-134, 2008.

HORISBERGER, J.-D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology**, v. 19, p. 377-387, 2004.

HU, W.; LANG, M. W.; KREBSBACH, P. H. Digoxigenin modification of adenovirus to spatially control gene delivery from chitosan surfaces. **Journal of Controlled Release**, v. 135, p. 250-258, 2009.

HUANG, Y.; CHUEHB, S.; TENGA, C.; GUHC, J. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 727–733, 2004.

HUNG, Y.; LIU, H. E. A hearty solution for acute myeloid leukemia. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, p. 1–2, 2012.

HUNDESHAGEN, P. et al. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. **BMC Biology**, v. 9, n. 38, p. 1-15, 2011.

IYER, A. K. V. A Direct Comparison of the Anticancer Activities of Digitoxin MeON-Neoglycosides and O-Glycosides: Oligosaccharide Chain Length-Dependent Induction of Caspase-9-Mediated Apoptosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 326–330, 2010.

JIANG, M. et al. Cardenolides from *Antiaris toxicaria* as Potent Selective Nur77 Modulators. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 7, p. 1005-1008, 2008.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. **Science**, v. 298, p. 1911-1912, 2002.

JOHNSON, P. H., et al. Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. **Molecular Cancer Therapy**, v. 1, p. 1293–1304, 2002.

JUNCKER, T. et al. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1-10, 2009.

JUNCKER, T. et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 13–23, 2011.

## 108 Referências

- KARIN, M. et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 301–310, 2002.
- KARIN, M.; DELHASE, M. The I $\kappa$ B kinase IKK and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signaling. *Seminars in Immunology*, v. 12, p. 85-98, 2000.
- KARIN, M.; LIN, A. NF- $\kappa$ B at the crossroad of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, p. 221-227, 2002.
- KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, v. 4, n. 2, p. 151–175, 2008.
- KOH, P. K. et al. Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 626–640, 2012.
- KOMETIANI, P.; LIU, L.; ASKARI, A. Digitalis-Induced Signaling by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in Human Breast Cancer Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 929-936, 2005.
- KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 726-734, 2005.
- KREUZALER, P.; WATSON, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 411-424, 2012.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3–11, 2009.
- KULIKOV, A. et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1691–1702, 2007.

KUMAR, C.C.; MADISON, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. **Oncogene**, v. 24, p. 7493–7501, 2005.

KUO, P.; HSU, Y.; CHO, C. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, p. 3209-3221, 2006.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 547-566, 2009.

LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 232-233, 2010.

LEFRANC, F., KISS, R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. **Neoplasia**, v. 10, p. 198–206, 2008.

LEFRANC, F. et al. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. **Neurosurgery**, v. 62, p. 211–221, 2008.

LESNEY, M. S. Flowers for the heart. **Modern Drug Discovery**, v. 5, p. 46–48, 2002.

LEVRIER, C. Toxicarioside M, a new cytotoxic 10 $\beta$ -hydroxy-19-nor-cardenolide from *Antiaris toxicaria*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 4, p. 660-664, 2012.

LIANG, J; SLINGERLAND, J. M. Multiples roles of the PI3K/PKB (Akt) pathways in cell cycle progression. **Cell cycle**, v. 2, n. 4, p. 339-345, 2003.

LIANG, M. et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 10585–10593, 2007.

## 110 Referências

LINDHOLM, P. et al. Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 7, p. 333–340, 2002.

LOPEZ-LAZARO, M. et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1642-1645, 2005.

LOPEZ-LAZARO, M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 11, p. 1043–1053, 2007.

LU, Z. J. et al. Periplocin Inhibits Growth of Lung Cancer in vitro and in vivo by Blocking AKT/ERK Signaling Pathways. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 609-618, 2010.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. **Cancer Cell**, v. 4, p. 257-262, 2003.

LUO, J. et al. Inhibition of NF $\kappa$ B in cancer cells converts inflammation induced tumor growth mediated by TNF $\alpha$  to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer cell**, v. 6, p. 297-305, 2004.

MACFARLANE, M. Cell death pathways—potential therapeutic targets. **Xenobiotica**, v. 39, n. 8, p. 616–624, 2009.

MANNA, S. K. et al. Oleandrin Suppresses Activation of Nuclear Transcription Factor- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase1. **Cancer Research**, v. 60, p. 3838–3847, 2000.

MATHIEU, V. et al. The sodium pump  $\alpha$ 1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 9B, p. 3960-3972, 2009.

MCCONKEY, D. J. et al. Cardiac Glycosides Stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  Increases and Apoptosis in Androgen independent, Metastatic Human Prostate Adenocarcinoma Cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 3807–3812, 2000.

MIJATOVIC, T. et al. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor  $\text{KB}$ -mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 391-399, 2006a.

MIJATOVIC, T. et al. Cardenolide-Induced Lysosomal Membrane Permeabilization Demonstrates Therapeutic Benefits in Experimental Human Non-Small Cell Lung Cancers. **Neoplasia**. v. 8, n. 5, p. 402 – 412, 2006b.

MIJATOVIC, T. et al. The  $\alpha 1$  subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. **Journal of Pathology**, v. 212, p. 170–179, 2007.

MIJATOVIC, T. et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. **Molecular Cancer Therapy**, v. 7, p. 1285-1296, 2008.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Cardiotoxic Steroids-Mediated Targeting of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to Combat Chemoresistant Cancers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 627-646, 2012a.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and cancer. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, n. 1, p. 91-106, 2012b.

MOBASHERI, A. J. et al.  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports**, v. 20, p. 51–91, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

## 112 Referências

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, R. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, p. 354-364, 2007.

NEWMAN, R. A. et al. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular Interventions**, v. 8, n. 1, p. 36-49, 2008.

MORETTI, L. et al. Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 10, p. 135-143, 2007.

MUKERJEE, S. **O imperador de todos os males** – Uma biografia do câncer. São Paulo: Companhia da Letras, 2012, 634 p.

NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, p. 67-70, 2001.

OGIER-DENIS, E. et al. Erk1/2-dependent Phosphorylation of  $\alpha$ -interacting Protein Stimulates Its GTPase Accelerating Activity and Autophagy in Human Colon Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39090-39095, 2000.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

PAGLIN, S. et al. A Novel Response of Cancer Cells to Radiation Involves Autophagy and Formation of Acidic Vesicles. **Cancer Research**, v. 61, p. 439-444, 2001.

PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 1-8, 2010.

- PAN, E. et al. Cardenolides of *Leptadenia madagascariensis* from the Madagascar dry forest. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 422–428, 2011.
- PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in Bioscience**, v. S4, p. 142-156, 2012.
- PATHAK, S. et al. Anvirzel™, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not in murine cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 11, p. 455-463, 2000.
- PERNE, A. et al. Cardiac Glycosides Induce Cell Death in Human Cells by Inhibiting General Protein Synthesis. **Plos One**, v. 4, n. 12, p. 1-9, 2009.
- PIACENTE, S. et al. Cardenolides from *Pergularia tomentosa* Display Cytotoxic Activity Resulting from Their Potent Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1087–1091, 2009.
- PIKARSKY, E. et al. NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, p. 461-466, 2004.
- PLAS, D. R.; THOMPSON, C. B. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. **Oncogene**, v. 24, p. 7435–7442, 2005.
- POMMIER, Y. et al. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. **Oncogene**, v. 23, p. 2934–2949, 2004.
- PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 99-104, 1999.
- PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature**, v. 7, p. 926-935, 2008.

## 114 Referências

PubChem. **The PubChem Project:** chemical structure. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 11 de setembro de 2012.

PULLEN, M. A.; BROOKS, D. P.; EDWARDS, R. M. Characterization of the neutralizing activity of digoxin-specific Fab toward ouabain-like steroids. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, p. 319-325, 2004.

QAZZAZ, H. M. A. M.; CAO, Z.; BOLANOWSKI, D. D.; CLARK, B. J.; VALDES, R. J. *De Novo* biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-620, 2004.

RAGHAVENDRA, P. B.; SREENIVASAN, Y.; MANNA, S. K. Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: Dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 2292-2302, 2007a.

RAGHAVENDRA, P. B.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. **Apoptosis**, v. 12, p. 307-318, 2007b.

RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, p. 781-853, 1996.

RAMIREZ-ORTEGA, M. et al. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, p. 71-76, 2006.

RATES, S. M. K. Plants as sources of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

- RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2007. p. 685-710.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.
- RIEDER, C.L., MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Developmental Cell**, v. 7, p. 637–651, 2004.
- ROBEY, R. B.; HAY, N. Is Akt the “Warburg kinase”?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, p. 25–31, 2009.
- ROUSSELOT, P. et al. A clinical and pharmacological study of arsenic trioxide in advanced multiple myeloma patients. **Leukemia**, v. 18, p. 1518–1521, 2004.
- SÁNCHEZ-ALCÁZAR, J. A. et al. Camptothecin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer is independent of cyclooxygenase expression. **Apoptosis**, v. 8, p. 639–647, 2003.
- SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 551-563, 2001.
- SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-1677, 1996.

## 116 Referências

SHU, Y. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIDDIQUI, B. S. et al. Flavonoid and cardenolide glycosides and a pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander* and evaluation of cytotoxicity. **Phytochemistry**, v. 77, p. 238–244, 2012.

SMITH, J. A.; MARTIN, L. Do cells cycle? **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 70, n.4, p. 1263-1267, 1973.

SREENIVASAN, Y.; SARKAR, A.; MANNA, S. K. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2223–2239, 2003.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3.ed. New York: Freeman, 1995. p. 346-352.

STENKVIST, B. Cardenolides and cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v.12, p. 635-636, 2001.

SU, C. T. et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Res.**, v. 79, p. 62-70, 2008.

SUGGITT, M.; BIBBY, M. C. 50 Years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 971-981, 2005.

SVENSSON, A. et al. Digoxin inhibits neuroblastoma tumor growth in mice. **Anticancer Research**, v. 25, p. 207–212, 2005.

TAKADA, Y. et al. Odoroside A and ouabain inhibit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and prevent NF- $\kappa$ B-inducible protein expression by blocking  $\text{Na}^+$ -dependent amino acid transport. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1157–1166, 2009.

TAN, M. L. et al. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 7, p. 1547-1560, 2009.

TAN, T.T.; WHITE, E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 81 – 104, 2008.

TASKOVA, R. M.; GOTFREDSEN, C. H.; JENSEN, S. R. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1440-1447, 2005.

TAYLOR, B.S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **Journal of Pathology**, v. 223, p.318-326, 2011.

TESTA, J. R.; BELLACOSA, A. AKT plays a central role in tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 10983–10985, 2001.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. E. The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. **Toxicology in vitro**, v. 19, p. 845–852, 2005.

TYMIAK, A. A. et al. Physico-chemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8189-8193, 1993.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 700-714, 2010.

VAN QUAQUEBEKE, E. et al. Identification of a novel cardenolide (2'-oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro anti-tumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 849–56, 2005.

## 118 Referências

- VIRTUOSO, J. F. Morbidade e mortalidade da população idosa de Florianópolis: um estudo comparativo entre homens e mulheres. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 13, n. 2, p. 215-223, 2010.
- WANG, H. et al. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 17250–17259, 2004.
- WANG, G. et al. Tanghinigenin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 31–36, 2010.
- WANG, H. L. et al. C5'-Alkyl Substitution Effects on Digitoxigenin R-L-Glycoside Cancer Cytotoxicity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 259–263, 2011.
- WENNER, C. E. Cell Signaling and Cancer-Possible Targets for Therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 299–308, 2010.
- WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 401-410, 2012.
- WHITE, E.; DIPAOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.15, n. 17, p. 5308-5316, 2009.
- WINNICKA, K. et al. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. **Natural Products Research**, v. 24, p. 274–285, 2010.
- XIE, Z.; ASKARI, A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 2434–2439, 2002.

XIE, Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase mediated signal transduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 986, p. 497-503, 2003.

XU, Z. et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 125, n. 3-5, p. 181-91 2011.

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current Opinion in Cell Biology**, v.17, p. 559-564, 2005.

YANG, Q. et al. Cardiac glycosides inhibit TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 27, p. 9631-9636, 2005.

ZHAO, M. et al. The structure of a new cardenolide diglycoside and the biological activities of eleven cardenolide diglycoside from *Nerium oleander*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 3, p. 371-377, 2011.

ZIEGLER, D. S.; KUNG, A. L. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 20, p. 97-103, 2008.



**APÊNDICE**

CARVALHO, A.; BLUM-SILVA, C. H.; CALVETE, E.;  
REGINATTO, F. H.; SIMOES, C. M. O. Anti HSV-1 activity of five  
strawberry cultivars. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 31, p. 133-  
137, 2012.



## Anti HSV-1 Activity of Five Strawberry Cultivars

Annelise CARVALHO <sup>1,3</sup> #, Carlos H. BLUM-SILVA <sup>2,3</sup> #, Eunice CALVETE <sup>4</sup>,  
Flávio H. REGINATTO <sup>2,3</sup>, & Cláudia M. O. SIMÕES <sup>1,3</sup> \*

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Aplicada;

<sup>2</sup> Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacéuticas,

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC,  
Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo,  
UPF, Passo Fundo, RS, Brazil.

**SUMMARY.** Five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars harvested in Passo Fundo (State of Rio Grande do Sul, Brazil) were quantified for their total flavonoids (TF) and total anthocyanins contents (TA) and the extracts were evaluated for their *in vitro* antiherpes (anti-HSV-1, KOS strain) activity. The cultivars Camarosa and Aromas presented the highest TF (149.1 and 129.4 mg RE/100g FF), respectively; and TA (92.8 and 84.4 mg CGE/100 g FF), respectively. On the other hand, the Camino Real cultivar showed the lowest TF (69.9 mg RE/100 g FF) and TA (46.2 mg CGE/100 g FF). With regard to the antiherpes activity, Camarosa and Aromas cultivars also displayed the highest activity detected (IC<sub>50</sub> = 1.68 mg/mL and 1.80 mg/mL, respectively) and Camino Real the lowest (IC<sub>50</sub> = 2.69 mg/mL). A relationship between the presence of flavonoids and anthocyanins and the detected anti-HSV-1 activity might be suggested for the strawberry cultivars studied.

### INTRODUCTION

Consumption of fruits and vegetables is often associated with reduced risk of chronic diseases and thus has been recommended for prevention of such diseases (e.g. cancer and cardiovascular diseases), which are tightly related to oxidative stress in the human body. High levels of polyphenolic compounds are found in these fruits and vegetables and have been indicated as responsible for the observed prevention <sup>1-6</sup>.

In this context, berries have shown prominent effects due to their characteristic composition rich in flavonoids and anthocyanins. As part of this class, strawberries (*Fragaria x ananassa*) are worldwide consumed and their relevant content of both antioxidant micronutrients and polyphenolic constituents such as flavonoids, anthocyanins and phenolic acids has long been correlated to its high nutritional value. Fruits and vegetables containing high levels of anthocyanins generally have greater antioxidant ca-

capacity. Furthermore, several studies report the antioxidant capacity of flavonoids and anthocyanins present in strawberry extracts <sup>7-10</sup>.

Although polyphenolic constituents of strawberries have been correlated with cancer prevention and several other health benefits, there are no reports in the literature about its antiherpetic properties. Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) belongs to Herpesviridae family and its core shelters the viral double-stranded DNA. HSV-1 is a pathogen of worldwide occurrence responsible for latent infection of the sensory neurons. Its association with orofacial infection has been long reported and genital infections have been also attributed to this virus. As a latent infection, the reactivation of this virus is triggered by certain conditions like physical or emotional stress, exposure to UV light, fever and hormonal imbalance causing recurrent bouts of events <sup>11</sup>.

**KEYWORDS:** Anthocyanins, Antiviral activity, Flavonoids, HSV-1, Strawberry.

\* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: claudias@reitoria.ufsc.br

# Both authors contributed equally to this work.

Over the years, nucleoside analogs have proved to be an effective treatment for herpetic infections. However, a major drawback is the resistance presented by the virus against this drug class, especially amongst immunocompromised individual<sup>12,13</sup>. Therefore, different approaches have been investigated and new discoveries focusing on the performance of natural products and its protective effect against HSV-1 have been reported throughout the years<sup>14-19</sup>. Thus, the aim of the current study was to evaluate the *in vitro* antiherpes activity of five different cultivars of strawberries as well as to determine their total flavonoids and anthocyanins contents.

## MATERIALS AND METHODS

### Fruit samples

Five strawberry cultivars (Portola, Aromas, Camarosa, San Andreas and Camino Real) originated at the University of California (CA, USA) were studied. Regarding their daylight exposure Portola, Aromas and San Andreas are neutral day cultivars, while Camarosa and Camino Real are short day cultivars. They were cultivated under plastic greenhouse conditions at the University of Passo Fundo Horticultural Sector (28°15'41"S; 52°24'45"W) at Passo Fundo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. They were harvested in October 2010, separated by cultivar and immediately frozen, and stored at -20 °C.

### Extraction

The extracts were prepared according to a method previously described<sup>20</sup> with minor modifications. Briefly, 50 grams of frozen fruits of each strawberry cultivar were sonicated (Ultrasonic Cleaner 1450, Unique) with 100 mL of acidified ethanol 70 °GL (pH 1.0) for 20 min. The extracts were filtered, the volumes were adjusted to 100 mL with acidified ethanol 70° GL, and they were separated in two aliquots of 50 mL each. One aliquot of each cultivar extract was neutralized with NaOH (Vetec® Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brazil) 1M (pH 7.0) for the antiviral assays, and the other one, which was not neutralized, was used for the phytochemical determinations. The solvent of both aliquots was evaporated under reduced pressure to dryness yielding the crude extracts.

### Total flavonoids content

The content of total flavonoids was determined by a method previously described<sup>21</sup> with minor modifications. A calibration curve was prepared by mixing 1 mL aliquots of 100, 150,

200, 250, 300, 500, and 1000 µg/mL of ethanolic rutin (Sigma®) solutions with 1 mL of aluminium trichloride (Vetec®) in ethanol (20g/l) and diluted with ethanol to 25 mL. After 40 min, the absorbances were read at 415 nm (Lambda 25 UV/Vis Spectrometer, PerkinElmer®) and the calibration curve was drawn. The absorption of each strawberries cultivar was measured under the same conditions. All analyses were performed in triplicate. The results were expressed as milligrams of rutin equivalents per 100 g of fresh fruit (mg RE/100 g FF).

### Total anthocyanins content

Anthocyanin quantification was performed by the pH-differential method<sup>22</sup>. Calculation of anthocyanins concentration in each sample was based on a cyanidin-3-glucoside molar extinction coefficient 26900 and a molecular mass of 449.2 g/mol. Results were expressed as mg of cyanidin-3-glucoside equivalents per 100 g of fresh fruit (mg CGE/100 g FF).

### Virus and cell line

VERO cells (green monkey kidney fibroblasts) were obtained from ATCC (CCL 81) and used to evaluate both cytotoxicity and virus inhibition concentration of each strawberry cultivar. Cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM; Cultiab, Campinas, Brazil) and supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA), penicillin G, streptomycin and amphotericin B (100 U/mL, 100 µg/mL and 25 µg/mL, respectively, Cultiab). VERO cells were maintained in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. HSV-1 stocks (KOS strain, Faculty of Pharmacy, University of Rennes, France) were propagated in VERO cells, titrated based on plaque forming units (PFU) count by viral plaque assay<sup>23</sup> and stored at -80 °C.

### Cytotoxicity assay

Cells were treated for 72 h with different concentrations of each strawberry cultivar after reaching confluence. Cytotoxicity was evaluated by the sulforhodamine B assay, as previously described<sup>24</sup> with minor modifications. The 50 % cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) of each sample was defined as the concentration that reduced cell viability by 50 % when compared to untreated controls.

### Viral plaque number reduction assay

The different extracts were tested for their antiviral activity against HSV-1(KOS strain) by a

plaque reduction assay, as previously described<sup>25</sup>. Approximately 100 PFU of HSV-1 were adsorbed for 1 h at 37 °C on confluent cells, and overlaid with MEM containing 1.5% carboxymethylcellulose (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) either in the presence or the absence of different concentrations of the samples. After 72 h, cells were fixed and stained with naphthol blue-black (Sigma) and plaques were further counted. The IC<sub>50</sub> was defined as the concentration that inhibited 50% of viral plaque formation when compared to untreated controls. Acyclovir (Sigma) was used as a positive control.

#### Data Analysis

Data were expressed as mean values ± standard deviation from three independent experiments. For the determination of CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values, nonlinear regressions of concentration–response curves were used. Differences between treatments were compared by ANOVA one-way analysis of variance followed by Tukey's test.

## RESULTS

### Total flavonoids and anthocyanins contents

According to the obtained results (Table 1), Camarosa cultivar presented the highest total flavonoids content, while Camino Real cultivar presented the lowest one. The statistical analysis of total flavonoids contents showed significant differences among the tested samples ( $p < 0.05$ ). Table 1 also shows the content of anthocyanins and the highest content observed was also for Camarosa cultivar, while Camino Real cultivar also exhibited the lowest one.

| Strawberry cultivar | Total flavonoids*         | Total anthocyanins**     |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| Portola             | 117.3 ± 0.57 <sup>a</sup> | 80.6 ± 0.18 <sup>a</sup> |
| Aromas              | 129.4 ± 0.36 <sup>b</sup> | 84.4 ± 0.8 <sup>b</sup>  |
| Camarosa            | 149.1 ± 0.5 <sup>c</sup>  | 92.8 ± 1.69 <sup>c</sup> |
| San Andreas         | 80.9 ± 0.91 <sup>d</sup>  | 48.2 ± 0.62 <sup>d</sup> |
| Camino Real         | 69.9 ± 0.71 <sup>e</sup>  | 46.2 ± 0.33 <sup>d</sup> |

**Table 1.** Total flavonoids and anthocyanins contents of different strawberry cultivars. \* Total flavonoids content was determined by the AlCl<sub>3</sub> method and the data are mean ± S.D. values expressed as mg RE//100g fresh fruit ( $n = 3$ ). \*\* Total anthocyanins content was determined by the pH-differential method and the data are mean ± S.D. values expressed as mg CGE/100g fresh fruit ( $n = 3$ ). Different letters indicate significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### Antiberpes activity

The crude extracts of different strawberries cultivars were tested for their activity against HSV-1 (KOS strain) and the obtained data are shown in Table 2. As observed, all the tested samples showed an antiherpes activity against HSV-1 in some extent. Camarosa and Aromas cultivars showed greater antiviral activity than those observed for San Andreas, Portola and Camino Real. The reduction degree of viral plaque number was higher for Camarosa cultivar while the cytotoxicity was lower when compared to untreated controls (IC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> values). This cultivar also presented the highest Selectivity Index (SI) observed among the tested cultivars.

## DISCUSSION

Strawberries are a rich source of flavonoids and other polyphenolic compounds, which are responsible for the plant protection against DNA oxidative damage. Other functions such as, protection from solar ultraviolet radiation, attraction of animal vectors for pollination and seed dispersal, enhancement of defense against herbivores and pathogens, are due to the presence of flavonoids<sup>26</sup>. It has also been shown that they possess important pharmacological actions, such as antioxidant,<sup>9,27,28</sup> vasoprotective<sup>29</sup>, anti-inflammatory<sup>30</sup>, antidiabetic<sup>31</sup>, and antiplatelet<sup>32</sup> activities. The production of these compounds by plants is broadly influenced by genetic factors and thus likely to cause variation in the amount of produced metabolites<sup>33,34</sup>.

Our results are in agreement with previous studies reporting the flavonoid content of strawberry genotypes, even though the reported culti-

| Strawberry cultivar | CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> | SI <sup>c</sup> |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Portola             | 15.26 ± 5.27                  | 2.10 ± 0.12                   | 7.3             |
| Aromas              | 14.47 ± 2.36                  | 1.80 ± 0.34                   | 8.0             |
| Camarosa            | 15.36 ± 3.77                  | 1.68 ± 0.18                   | 9.1             |
| San Andreas         | 14.46 ± 5.21                  | 1.89 ± 0.28                   | 7.6             |
| Camino Real         | 19.99 ± 1.93                  | 2.69 ± 0.10                   | 7.4             |
| Acyclovir           | > 225                         | 1.25 ± 0.35                   | > 180           |

**Table 2.** Cytotoxicity and antiherpes (anti-HSV-1, KOS strain) activity of different strawberry cultivars. Values represent the mean ± standard deviations of three independent experiments. <sup>a</sup> cytotoxicity was determined by sulforhodamine B assay on VERO cells (mg/mL); <sup>b</sup> antiherpes activity was determined by plaque number reduction assay (mg/mL); <sup>c</sup> Selectivity Index = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>. No significant differences were observed among the different tested cultivars (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

vars were different from those used in this study. Moreover, these reports showed a correlation of the total flavonoids and anthocyanins contents with the detected antioxidant activity <sup>7, 35-38</sup>.

In the investigation of the cultivars cytotoxicity the classic and rapid 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay <sup>39</sup> was replaced by the sulforhodamine B assay since the former seems to cause an inaccurate determination of CC<sub>50</sub> values due to the oxidative capacity of the anthocyanins present in strawberries, which may undergo a redox reaction in the presence of the MTT salt <sup>40</sup>. Regarding the antiherpes activity, the SI, which is the ratio between CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values, is considered to be an evaluation parameter and if this value is higher than three, it indicates potential antiviral activity <sup>41</sup>. According to our findings, all the cultivars might present activity in some level. As observed, Camarosa and Aromas presented higher contents of both flavonoids and anthocyanins and major antiherpes activity. The same pattern was seen for Camino Real, since it presented the lowest contents of flavonoids and anthocyanins and the activity displayed is the lowest among the tested cultivars, although the content of anthocyanins did not statistically differ between Camino Real and San Andreas. Although the viral inhibition observed did not present significant differences (ANOVA,  $p > 0.05$ ) the amounts of total flavonoids and anthocyanins contents found for Camarosa, Aromas and Camino Real (Table 1) may indicate a relationship between the presence of flavonoids and anthocyanins and the detected anti-HSV-1 activity, when comparing their IC<sub>50</sub> values. According to Lyu *et al.* <sup>42</sup> who evaluated the antiherpes activity (HSV-1 and HSV-2) of the most abundant flavonoids present in food, this class of compounds showed great activity against HSV *in vitro*. Other studies also report the *in vitro* antiherpes activity associated to the presence of different flavonoids <sup>45, 43-47</sup> and raises support for the observed results of this work.

The HSV drug-resistance and triggering mechanisms of virus reactivation among immunocompromised subjects reported in the literature should be considered <sup>12</sup> since their impaired immunity requires, amongst other aspects, a diet able to improve their immunity in some extent. It is known that flavonoids grant an effect of immune protection <sup>48</sup> and as the total flavonoids contents of the tested strawberry cultivars seem to be related to a protective effect

*in vitro* against HSV-1, further studies should confirm it and allow studies *in vivo*.

Although the antiviral activity was not statistically different among all strawberries cultivars tested in this work, the total content of flavonoids presented differences. The knowledge about the chemical profile of these different strawberry cultivars could be a tool to assess the value of each cultivar as it is evident that a considerable segment of our society has been concerned about their health issues and food intake is relevant when such aspects are addressed.

## CONCLUSION

In summary, a relationship between the presence of flavonoids and anthocyanins and the detected anti-HSV-1 activity might be suggested, and to our knowledge, there are no reports in the literature showing a protective effect of strawberries against HSV-1 replication. Further studies are in progress to examine the anti HSV-1 mechanism of action of these extracts.

**Acknowledgments.** This work and the research fellowships of A. Carvalho, F.H. Reginatto and C.M.O. Simões were supported by CNPq. The research fellowship of C. H. Blum-Silva was provided by CAPES/REUNI/UFSC.

## REFERENCES

1. Heiss, C., C.L. Keen & M. Kelm (2010) *Eur. Heart J.* **31**: 2583-92.
2. Mehta, R.G., G. Murillo, R. Naithani & X. Peng (2010) *Pharmaceut. Res.* **27**: 950-61.
3. Pascual-Teresa, S., D.A. Moreno & C. García-Viguera (2010) *Int. J. Mol. Sci.* **11**: 1679-703.
4. Vauzour, D., A. Rodriguez-Mateos, G. Corona, M.J. Oruna-Concha & J.P.E. Spencer (2010) *Nutrients* **2**: 1106-31.
5. Bhupathiraju, S.N. & K.L. Tucker (2011) *Clin. Chim. Acta* **412**: 1493-514.
6. Nadochiy, S.M. & E.K. Redman (2011) *Nutrition* **27**: 733-44.
7. Wang, S.Y., W. Zheng & G.J. Galletta (2002) *J. Agr. Food Chem.* **50**: 6534-42.
8. Da Silva Pinto, M., J.E. De Carvalho, F.M. Lajolo, M.I. Genovese & K. Shetty (2010) *J. Med. Food* **13**: 1027-35.
9. Isabelle, M., B.L. Lee, M.T. Lim, W. Koh, D. Huang & C.N. Ong (2010) *Food Chem.* **120**: 993-1003.
10. Piljac-Žegarac, J. & D. Šamec (2011) *Food Res. Int.* **44**: 345-50.

11. Roizman, B., D. Knipe & R. Whitley (2007) "Herpes simplex viruses", in "Fields Virology" (D.M. Knipe, P.M. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, B. Roizman et al., eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 2502-601.
12. Field, H.J. (2001) *J. Clin. Virol.* **21**: 261-9.
13. Cushnie T.P.T. & A.J. Lamb (2005) *Int. J. Antimicrob. Ag.* **26**: 343-56.
14. Khan, M.T., A. Ather, K.D. Thompson & R. Gambari (2005) *Antivir. Res.* **67**: 107-19.
15. Fritz, D., C.R. Venturi, S. Cargnin, J. Schripsema, P.M. Roche, J.A. Montanha et al. (2007) *J. Ethnopharmacol.* **113**: 517-20.
16. Camargo Filho, I., D.A.G. Cortez, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura & B.P. Dias Filho (2008) *Phytomedicine* **15**: 202-8.
17. Kuo, Y., Y. Lee, Y. Leu, W. Tsai & S. Chang (2008) *Antivir. Res.* **80**: 206-12.
18. Bertol, J.W., C. Rigotto, R.M. De Pádua, W. Kreis, C.R.M. Barardi, F.C. Braga et al. (2011) *Antivir. Res.* **92**: 73-80.
19. Cardozo, F.T.G.S., C.M. Camellini, A. Mascarello, M.J. Rossi, R.J. Nunes, C.R.M. Barardi, et al. (2011) *Antivir. Res.* **92**: 108-14.
20. Bordignon, Jr. C.L., V. Francescato, A.A. Nienow, E. Calvete & F.H. Reginatto (2009) *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **29**: 183-8.
21. Miliauskas, G., P.R. Venskutonis & T.A. Van Beek (2004) *Food Chem.* **85**: 231-7.
22. Lee, J., R.W. Durst & R.E. Wrolstad (2005) *J. AOAC Int.* **88**: 1269-78.
23. Burleson, F.G., T.M. Chamberts & D.L. Wiedbrauk (1992) *Virology: A Laboratory Manual*. San Diego: Academic.
24. Vichai, V. & K. Kirtikara (2006) *Nat. Protoc.* **1**: 1112-6.
25. Silva, I.T., G.M. Costa, P.H. Stoco, E.P. Schenkel, F.H. Reginatto & C.M.O. Simões (2010) *Lett. Appl. Microbiol.* **51**: 143-8.
26. Gould, K.S. & C. Lister (2006) "Flavonoids functions in plants", in "Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications". (O.M. Andersen & K.R. Markham, eds) Boca Raton: CRC Press; pp. 397-442.
27. Kong, J., L. Chia, N. Goh, T. Chia & R. Brouillard (2003) *Phytochemistry* **64**: 923-33.
28. Pérez-Gregorio, M.R., J. Regueiro, E. Alonso-González, L.M. Pastrana-Castro & J. Simal-Gándara (2011) *LWT - Food Sci. Technol.* **44**: 1793-801.
29. Woodman, O.L. & E. Chan (2004) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**: 786-90.
30. Boots A.W., G.R. Haenen & A. Bast (2008) *Eur. J. Pharmacol.* **585**: 325-37.
31. Lee, M.J., Y.K. Rao, K. Chen, Y.C. Lee & Y.M. Tzeng (2009) *J. Ethnopharmacol.* **126**: 79-85.
32. Watson, S.P., J.M. Auger, O.J. McCarty & A.C. Pearce (2005) *J. Thromb. Haemost.* **3**: 1752-62.
33. Atkinson, C.J., P.A.A. Dodds, Y.Y. Ford, J. Le Mière, J.M. Taylor, P.S. Blake et al. (2006) *Ann. Bot.-London* **97**: 429-41.
34. Jeong, S.T., N. Goto-yamamoto, K. Hashizume & M. Esaka (2006) *Plant. Sci.* **170**: 61-9.
35. Wang, S.Y. & H. Lin (2000) *J. Agr. Food Chem.* **48**: 140-6.
36. Moyer, R.A., K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei & R.E. Wrolstad (2002) *J. Agr. Food Chem.* **50**: 519-25.
37. Meyers, K.J., C.B. Watkins, M.P. Pritts & R.H. Liu (2003) *J. Agr. Food Chem.* **51**: 6887-92.
38. Tulipani, S., B. Mezzetti, F. Capocasa, S. Bompadri, J. Beekwilder, C.H. Ric de Vos et al. (2008) *J. Agr. Food Chem.* **56**: 696-704.
39. Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
40. Elisia, I., D.G. Popovich, C. Hu & D.D. Kitts (2008) *Phytochem. Analysis* **19**: 479-86.
41. Chattopadhyay, D., M. Chawla-Sarkar, T. Chatterjee, R.S. Dey, P. Bag, S. Chakraborti et al. (2009) *New Biotechnol.* **25**: 347-68.
42. Lyu, S.Y., J. Rhim & W. Park (2005) *Arch. Pharm. Res.* **28**: 1293-301.
43. Serkedjiev, J. & S. Ivancheva (1999) *J. Ethnopharmacol.* **64**: 59-68.
44. Du, J., Z. He, R. Jiang, W. Ye, H. Xu & P.P. But (2003) *Phytochemistry* **62**: 1235-8.
45. Chattopadhyay, D. & T.N. Naik (2007) *Mini-Rev. Med. Chem.* **7**: 275-301.
46. Freitas, A.M., M.T.R. Almeida, C.R. Andrighetti-Fröhner, F.G.T.S. Cardozo, C.R.M. Barardi, M.R. Farias et al. (2009) *J. Ethnopharmacol.* **126**: 512-7.
47. Orhan, D.D., B. Özçelik, S. Özgen & F. Ergun (2010) *Microbiol. Res.* **165**: 496-504.
48. Bagchi, D., M. Bagchi, S.J. Bagchi, S.D. Stohs, C.K. Ray & H.G. Sen (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**: 260-70.