

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

MECANISMO DE AÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL
DE FLAVONÓIDES, DITERPENOS E DERIVADOS
MESOIÔNICOS EM TUMORES EXPERIMENTAIS

NOEMA FAIGAGRYNBERG

1999

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**MECANISMO DE AÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL
DE FLAVONÓIDES, DITERPENOS E DERIVADOS
MESOIÔNICOS EM TUMORES EXPERIMENTAIS**

NOEMA FAIGA GRYNBERG

sob orientação dos Professores

Dr. Raimundo Braz-Filho e Dr^a. Áurea Echevarria Aznar

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica
da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Área: Química Orgânica

Seropédica, RJ

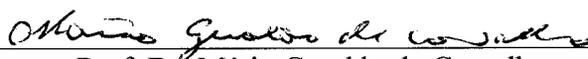
Outubro de 1999

**MECANISMO DE AÇÃO E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
FLAVONÓIDES, DITERPENOS E DERIVADOS MESOIÔNICOS EM
TUMORES EXPERIMENTAIS**

Noema Faiga Grynberg

Tese aprovada em 19/10/99: _____

Prof. Dr. Raimundo Braz Filho
LCQI/UENF-Campos, RJ



Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
DEQUIM, ICE - UFRRJ



Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso
Departamento de Entomologia e Fitopatologia, IB - UFRRJ



Prof. Dr. Ronald Bastos Freire
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV – UFRRJ



Prof. Dr. Vivian Rumjaneck
Departamento de Bioquímica – UFRJ



Prof. Dr. Áurea Echevarria Aznar
DEQUIM, ICE –UFRRJ - Suplente do Orientador

Prof. Dr. Maria Aparecida Medeiros Maciel
Escola Técnica Federal de Química e Departamento de Bioquímica –
Universidade Castelo Branco, RJ - Suplente

Em homenagem aos meus pais, Majer Grynberg e Chaja Grynberg, pelo esforço que empreenderam em minha formação.

“Sob o céu há, para cada coisa, uma ocasião e um tempo propício:

Um tempo de nascer e um tempo de morrer, um tempo de plantar e um tempo de colher o que se plantou;

Tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de edificar”.

Êclesiastis 3: 1-3.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à Professora Aurea Echevarria e ao Professor Raimundo Braz Filho pelo apoio em todos os momentos sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos colegas e funcionários do Departamento de Química, em especial aos professores do setor de Bioquímica, pelo apoio concedido para a realização deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer ao Rui de Souza Duarte do setor de Bioquímica pelo apoio técnico nos experimentos *in vivo*.

Quero expressar meus agradecimentos aos Professores Raimundo Braz Filho, Mário Geraldo de Carvalho, Javier Rincon Velandia e Isabel Craveiro Moreira pelas amostras de flavonóides utilizadas nas experiências.

Agradeço à Professora Maria Aparecida Maciel pelas amostras de diterpenos utilizadas nas experiências.

Agradeço ao Professor Paulo Sérgio Torres Brioso pelo apoio nas análises da reação em cadeia da polimerase.

Agradeço à Patrícia Sisto Ferreira pelas análises dos parâmetros hematológicos em camundongos nos trabalhos realizados com os mesoiônicos.

Agradeço à Juliana Echevarria Lima pelas análises de fator de necrose de tumor- α .

Finalmente, quero agradecer ao meu esposo Isak que incentivou e acompanhou meu trabalho constantemente, e com seu apoio terminei esta tese.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
JUSTIFICATIVA	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A célula tumoral	
1.1.1. Cinética do crescimento da célula tumoral	1
1.1.1.1. Ciclo celular	5
1.1.2. Características das células tumorais	7
1.2. Quimioterapia do Câncer	10
1.2.1. Histórico	12
1.2.2. Tratamento quimioterápico	20
1.2.3. Fator de necrose de tumor (TNF)	22
1.2.4. Resistência a drogas citotóxicas	25
1.2.5. Triagem de drogas	25
1.2.5.1. Ensaios para o crescimento celular <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	26
1.2.6. Drogas estudadas	27
1.2.6.1. Compostos mesoiônicos e definição	27
1.2.6.1.1. Características estruturais	28
1.2.6.1.2. Compostos mesoiônicos dos tipos A e B	29

1.2.6.1.3. Estrutura e propriedades espectroscópicas	31
1.2.6.1.4. Atividade biológica	35
1.2.6.1.4.1. Atividade antitumoral	35
1.2.6.1.4.2. Ação em doenças cardiovasculares: Atividade vasodilatadora e hipotensora	36
1.2.6.1.4.3. Atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária	38
1.2.6.2. Produtos naturais	40
1.2.6.2.1. Química e importância dos produtos naturais medicinais de origem vegetal	41
1.2.6.2.2. Flavonóides	43
1.2.6.2.2.1. Biflavonóides	48
1.2.6.2.2.2. Mecanismo de ação	49
1.2.6.2.3. Terpenóides	50
1.2.6.2.3.1. Definição e função	50
1.2.6.2.3.2. Biossíntese	51
1.2.6.2.3.3. Diterpenos	51
1.3. Análise das interações com a matéria por espectroscopia	54
1.3.1. Estado excitado	54
1.3.2. Leis de Lambert e Beer	55
1.3.3. Interações com a matéria: espectros atômicos	56
1.3.4. Espectroscopia de fluorescência	58
1.3.4.1. Estrutura e fluorescência	59
1.13.4.1.1. Efeito da concentração na intensidade de fluorescência	60
1.13.4.1.2. Fatores que afetam a fluorescência	61
1.3.4.1.2.1. pH e temperatura	61
1.3.4.1.2.2. Supressão	61
1.3.4.1.2.3. Transferência de energia	62
1.3.4.1.2.4. Supressão por transferência de elétron	62
1.3.4.1.2.5. Supressão paramagnética	62
1.3.4.1.2.6. Supressão por concentração	63

1.3.4.1.2.7. Efeito do átomo pesado	63
1.3.4.1.2.8. Supressão estática e dinâmica	63
1.4. Interação de drogas com os ácidos nucleicos	65
1.4.1. Técnicas para verificar a intercalação	67
1.5. Morte celular	69
1.5.1. Necrose	70
1.5.2. Apoptose	70
1.5.3. Critérios para distinguir apoptose e necrose	71
1.5.4. Mecanismo e regulação da apoptose	72
1.6. Gene supressor de tumor <i>p53</i>	78
1.6.1. Gene <i>p53</i> -Aspectos estruturais e função	79
1.6.2. Proteína p53	80
1.6.2.1. Estrutura	80
1.6.2.2. Função do p53 normal	82
1.6.2.3. Modulação da resposta da proteína p53 normal	84
1.6.3. Genes reguladores da transdução de sinal por <i>p53</i>	85
1.7. DNA Topoisomerasas	88
1.7.1. Classificação	88
1.7.2. DNA topoisomerasas I	89
1.7.3. DNA topoisomerasas II	91
1.7.4. Drogas antitumorais inibidoras de DNA topoisomerasas	92
1.7.4.1. Agentes químicos inibidores de DNA topoisomerasas	92
1.7.4.2. Mecanismo de morte celular pelos inibidores das DNA topoisomerasas	95

2. OBJETIVOS 96

3. MATERIAL E MÉTODOS	98
3.1. Material	98
3.1.1. Aparelhos	98
3.1.2. Drogas	99
3.1.2.1. Derivados mesoiônicos	99
3.1.2.2. Flavonóides	100
3.1.2.3. Diterpenos	101
3.1.3. DNA	102
3.1.4. Outros reagentes e solventes	102
3.1.5. Enzimas	102
3.1.6. Isótopos radioativos	103
3.1.7. Meio de cultura	103
3.1.8. Animais	103
3.1.9. Soluções tampão	103
3.1.10. Tumores	105
3.1.11. Linhagem celular WEHI- 164	105
3.2. Métodos	106
3.2.1. Cultura de células	106
3.2.2. Ensaio de citotoxicidade	106
3.2.2.1. Medida da síntese de DNA e de proteínas	106
3.2.2.2. Ensaio do MTT	107
3.2.3. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> de tumores ascíticos	107
3.2.4. Análise morfológica	108
3.2.5. Dosagem do fator de necrose de tumor- α (TNF- α)	108
3.2.6. Extração de DNA	109
3.2.7. Análise de fragmentos nucleossômicos por eletroforese em gel de agarose	110
3.2.8. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	110
3.2.9. Preparo de extrato contendo DNA topoisomerase I	111

3.2.10. Análise da ação da Topoisomerase sobre o DNA superhelicoidal de plasmídeo	112
3.2.10.1. Ensaio do relaxamento do DNA do plasmídeo superhelicoidal	112
3.2.10.2. Ensaio para verificar o complexo de quebra ("cleavable complex")	112
3.2.11. Espectro de absorção das drogas na região do Ultravioleta	113
3.2.12. Espectro de fluorescência das drogas	114
3.2.13. Análise estatística	114

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
4.1. Citotoxicidade das drogas <i>in vitro</i>	115
4.1.1. Ensaio colorimétrico com MTT	116
4.1.1.1. Derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	116
4.1.1.2. Flavonóides	117
4.1.1.3. Diterpenos CTN e DCTN	120
4.1.2. Inibição da incorporação de precursores de isótopos radioativos	120
4.1.2.1. Derivados mesoiônicos	120
4.1.2.2. Flavonóides	123
4.2. Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	126
4.2.1. Derivados mesoiônicos	126
4.2.1.1. Análise do fator de necrose de tumor (TNF- α)	129
4.2.2. Terpenóides CTN e DCTN	131
4.2.2.1. Atividade antitumoral	131
4.2.2.2. Análise de fator de necrose de tumor (TNF- α)	132
4.2.3. Flavonóides: 7"O-metilagatisflavona e Quercetina	134
4.2.3.1. Atividade antitumoral	134
4.3. Interação de drogas com o DNA do timo e de fago	136
4.3.1. Absorção no UV e fluorescência	136
4.3.1.1. Derivados mesoiônicos	137
4.3.1.2. Flavonóides	147
4.3.2. Eletroforese em gel de agarose com DNA de fago superhelicoidal	149
4.4. Apoptose	151
4.4.1. Derivados mesoiônicos	151
4.4.2. Flavonóides	154
4.5. Amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR)	159
4.5.1. Derivados mesoiônicos e flavonóides	159
4.6. DNA topoisomerasas	163

4.6.1. Derivados mesoiônicos	164
4.6.2. Flavonóides	168

5. CONCLUSÕES	171
----------------------	-----

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
--------------------------------------	-----

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	193
-------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BMI-D	4-fenil-5-(4-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida
BE	Brometo de etídio
Ca	Cálcio
C	Citosina
CPT	Campotecina
CTN	<i>Trans</i> crotonina
DCTN	<i>Trans</i> desidrocrotonina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Espectro de massas
Fe	Ferro
5-FU	5-Fluorouracil
G	Guanina
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia
ip	intraperitoneal
IPP	Pirofosfato de isopentenila
IV	Infravermelho
λ	Comprimento de onda
LUMO	Orbital molecular não ocupado de menor energia

Me	Metila
Mg	Magnésio
MI-A	Cloreto de 4-fenil-5-(4-H-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MI-C	Cloreto de 4-fenil-5-(4-metoxi-estiril)- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MI-D	Cloreto de 4-fenil-5-(4-nitro-estiril)- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MI-J	Cloreto de 4- fenil-5-(4-hidroxi-estiril)- 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Anion superóxido
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RMN	Ressonância magnética nuclear
S180	Sarcoma 180
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T	Timina
Topo	Topoisomerase
TNF- α	Fator de necrose de tumor-alfa
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estágios do crescimento celular benigno e maligno	3
Figura 2	Ciclo celular da célula normal	6
Figura 3	Alterações celulares observadas após transformação neoplásica	9
Figura 4.	Ação de agentes quimioterápicos sobre o DNA	11
Figura 5	Estruturas da mecloretamina e da estreptozocina	12
Figura 6	Estrutura do metrotexato	13
Figura 7	Estruturas da mercaptopurina e da tioguanina	13
Figura 8	Estrutura do 5-fluorouracil	14
Figura 9	Estrutura da adriamicina	15
Figura 10	Estruturas das bleomicinas A ₂ e B ₂	16
Figura 11	Estruturas da vinblastina e da vincristina	17
Figura 12	Estrutura da cisplatina	17
Figura 13	Estruturas da etoposida e da teniposida	18
Figura 14	Estruturas do paclitaxel e docetaxel	19
Figura 15	Estruturas da campotecina e dos derivados irinotecan e topotecan	20
Figura 16	Efeitos biológicos do TNF- α	23
Figura 17	Estrutura da desidroditizona	27
Figura 18	Fórmula geral para os compostos mesoiônicos	29
Figura 19	Estrutura geral dos compostos mesoiônicos do tipos A e B	29
Figura 20	Estrutura do 1,2-oxadiazólio-4-olato	30
Figura 21	Estrutura e formas canônicas dos compostos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida	31
Figura 22	Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-(4-metoxi-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, MI-C	32
Figura 23	Estrutura da sidnonimina	33
Figura 24	Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-X-tiadiazólios-2-fenilamina	34
Figura 25	Estrutura das aril-sidnonas	35
Figura 26	Estrutura do 1,3-difenil-2-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,3,4-triazólio-5-tiol	36

Figura 27	Estruturas dos compostos mesoiônicos GEA 3162 e GEA 3175	37
Figura 28	Estrutura da 3-morfolino-sidnonimina(SIN-1)	38
Figura 29	Estrutura da 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato, 5-substituídos	38
Figura 30	Estrutura da 3-[4-(2.5-dimetilpirrol-1-il-aminocarbonil)]-fenil-sidnona	39
Figura 31	Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-(3 e 4-X-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina	39
Figura 32	Estrutura da quinina	40
Figura 33	Inter-relações dos processos de síntese que levam à formação de componentes secundários nas plantas	42
Figura 34	Estruturas da bacatina III e da desacetilbacatina III	43
Figura 35	Estruturas básicas e substituições comuns de flavonóides	45
Figura 36	Estruturas da genisteína e da quercetina	47
Figura 37	Estrutura da flavonil(5- α)acético	47
Figura 38	Estruturas da quercetagenina e canferol	48
Figura 39	Estruturas do ácido abiético, do 13-O-acetil-12-O-miristilforbol e da forskolina	52
Figura 40	Ilustração das transições entre níveis de energia molecular durante a absorção da luz, fluorescência e fosforescência	57
Figura 41	Espectros de absorção e fluorescência	59
Figura 42	Modelo da estrutura do DNA normal e o DNA contendo moléculas de proflavina intercaladas	66
Figura 43	Diagrama ilustrando as alterações estruturais sequenciais na apoptose e na necrose	69
Figura 44	Eventos associados com a apoptose	74
Figura 45	Regulação da apoptose	77
Figura 46	Mutações em tumores humanos que inativam a função da proteína p53	79
Figura 47	Gene supressor <i>p53</i> com os exons de 1 a 11	80
Figura 48	Domínios e atividades da proteína p53	82
Figura 49	Função do p53 na sensibilidade à quimioterapia em células normais e	83

Figura 50	Controle da função de p53 pela proteína mdm2 em células normais e em células danificadas	84
Figura 51	Célula apresentando nível alto de p53	86
Figura 52	Fosforilação da proteína Rb é controlada no ciclo celular	87
Figura 53	Reação de transesterificação entre a DNA topoisomerase I e o DNA	90
Figura 54	Estruturas da elipticina e da m-AMSA	94
Figura 55	Estruturas da clerocidina e da terpentecina	94
Figura 56	Estrutura do Hoescht 33258	95
Figura 57	Estrutura dos derivados de cloreto de 4-fenil-5[4'-X-estiril]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI-A , MI-C , MI-D e MI-J)	99
Figura 58	Estrutura do 4-fenil-5-(4-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (BMI-D)	100
Figura 59	Estruturas da amentoflavona e da rutina	100
Figura 60	Estrutura da 7"-O-metilagatisflavona	101
Figura 61	Estruturas da CTN e da DCTN	101
Figura 62	Gráfico de Scatchard	114
Figura 63	Bioredução do MTT na presença das enzimas desidrogenases para produzir a formazana	116
Figura 64	Efeito de várias concentrações dos flavonóides 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada e quercetina em cultura de células de Ehrlich durante 48 horas na inibição das desidrogenases	119
Figura 65	Efeito de produtos mesoiônicos MI-A , MI-C , MI-D e MI-J na síntese de DNA de células de S180 durante 48 horas em comparação com o controle	122
Figura 66	Efeito de produtos mesoiônicos MI-A , MI-C , MI-D e MI-J na síntese de proteínas em células de S180 durante 48 horas em comparação com o controle	122
Figura 67	Efeito de flavonóides 7"-O-metilagatisflavona e quercetina na síntese	124

	de DNA (a) e na síntese de proteínas (b) em células de S180 durante 24 e 48 horas em comparação com o controle	
Figura 68	Inibição de crescimento de células WEHI 164 por sobrenadante de tumor ascítico de animais com carcinoma de Ehrlich tratados com MI-D e solvente (controle) em comparação com padrão de TNF- α	130
Figura 69	Inibição de crescimento de células WEHI 164 por sobrenadante de tumor ascítico de animais com carcinoma de Ehrlich tratados com CTN , DCTN e solvente (controle) em comparação com padrão de TNF- α	133
Figura 70	Espectro de absorção no UV da substância MI-D em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	138
Figura 71	Espectro de absorção no UV do brometo de etídio em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	139
Figura 72	Espectros de absorção no UV da campotecina em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	141
Figura 73	Espectro de fluorescência do MI-J em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	143
Figura 74	Espectro de fluorescência do MI-D em tampão TPE em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	144
Figura 75	Espectro de fluorescência do brometo de etídio em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	146
Figura 76	Espectro de fluorescência da amentoflavona em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo	148
Figura 77	Eletroforese em gel de agarose de DNA de lago super-helicoidal ϕ X174 na ausência ou presença de derivados mesoiônicos e do brometo de etídio	149
Figura 78	Eletroforese em gel de agarose de DNA de lago super-helicoidal ϕ X174 na ausência ou na presença de flavonóides e de brometo de etídio	150

Figura 79	Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído de células de Ehrlich tratadas com MI-D e B-MID por 24 horas	151
Figura 80	Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído de células de Ehrlich tratadas com MI-D , BMI-D , MI-J e etoposida por 4 e 24 horas	153
Figura 81	Estruturas da biochanina A e da tangeretina	155
Figura 82	Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células de Ehrlich após 24 e 48 horas de tratamento com amentoflavona, amentoflavona acetilada, quercetina e etoposida, na ausência (a) e na presença de ZnSO ₄ (b)	157
Figura 83	Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células de Ehrlich após 24-48 horas de tratamento com 7 ^{''} -O-metilagatisflavona e genisteína	158
Figura 84	Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos da amplificação de DNA por PCR de células de Ehrlich tratadas com flavonóides	161
Figura 85	Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação de derivados mesoiônicos MI-A , MI-C , MI-D e MI-J no relaxamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I	164
Figura 86	Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação de derivados mesoiônicos MI-D e MI-J no desenrolamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I, na presença de brometo de etídio	166
Figura 87	Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos derivados mesoiônicos MI-A , MI-C , MI-D e MI-J na formação do complexo de quebra, na presença de DNA de plasmídeo por topoisomerase I	167
Figura 88	Estruturas dos derivados indolcarbazóis NB-506 e do regioisômero de NB-506	168
Figura 89	Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos flavonóides 7 ^{''} -O-metilagatisflavona, amentoflavona no relaxamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas características da apoptose e da necrose	72
Tabela 2	Ligação ao DNA de venenos de DNA topoisomerasas de células eucarióticas	93
Tabela 3	Valores de IC ₅₀ para os derivados mesoiônicos em cultura de células de tumores S180 e carcinoma de Ehrlich	125
Tabela 4	Valores de IC ₅₀ para os flavonóides em cultura de células de tumores S180 e Carcinoma de Ehrlich	126
Tabela 5	Efeito do tratamento com derivados mesoiônicos no crescimento <i>in vivo</i> de tumores ascíticos S180 e Carcinoma de Ehrlich	128
Tabela 6	Valores hematológicos dos animais sem tumor tratados com MI-D MI-J , salina e solvente	129
Tabela 7	Efeito do tratamento com CTN , DCTN e 5-FU no crescimento <i>in vivo</i> de tumor ascítico S180 e Carcinoma de Ehrlich	132
Tabela 8	Efeito do tratamento com 7"-O-metilagatisflavona, quercetina e 5-FU no crescimento <i>in vivo</i> de tumor ascítico S180	135

JUSTIFICATIVA



JUSTIFICATIVA

O câncer produziu um campo de pesquisa fascinante para a compreensão não só da regulação celular como também para a procura de novas drogas que possam melhorar o tratamento de tão insidioso mal. O estudo das vias bioquímicas que controlam a morte celular podem auxiliar na busca de drogas seletivas para as células malignas.

A procura de drogas eficazes para serem usadas na quimioterapia é demorada e onerosa devido a necessidade de inúmeros ensaios de toxicidade nos animais e posteriormente em seres humanos. A pesquisa de inibidores das DNA topoisomerases sugerindo-se a via que provoca a morte celular, oferece a oportunidade de analisar os mecanismos de ação envolvidos no processo de reparo do DNA em células de mamíferos, permitindo uma elaboração mais racional na utilização de drogas e o estabelecimento de estratégias mais adequadas na quimioterapia do câncer.

Muitas drogas, com estrutura e mecanismo de ação tão diversificados, usadas em clínica, como a adriamicina, taxol, vincristina, derivados da campotecina e da podofilotoxina são extraídos de microorganismos e plantas, mostrando através da riqueza de diversificação e da complexidade estrutural, a capacidade imensurável de criação da natureza, que o homem sabiamente consegue as vezes copiar.

Na tentativa de contribuir para o estudo e descoberta de agentes quimioterápicos, analisamos a atividade antitumoral de produtos obtidos por síntese, como os derivados mesoiônicos e isolados de fontes naturais, como os flavonóides e diterpenóides, *in vivo* e a atividade *in vitro* sobre o DNA e as DNA topoisomerases.

RESUMO

Foi avaliada a atividade antitumoral *in vivo* em camundongos portadores de tumores ascíticos Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, de quatro derivados mesoiônicos [cloretos de 4-fenil-5-(4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, onde X = H, OCH₃, NO₂ e OH], duas biflavonas, amentoflavona e 7"-O-metilagatisflavona, o flavonol quercetina e dois diterpenos, trans-crotonina (CTN) e trans-desidrocrotonina (DCTN). Analisou-se a citotoxicidade *in vitro* dessas drogas em células de Ehrlich, sua ação sobre a DNA topoisomerase I e a dosagem de fator necrose de tumor (TNF- α). Foi realizado, também, o perfil eletroforético em gel de agarose do DNA obtido de células de Ehrlich tratadas com drogas. Os derivados mesoiônicos OH e NO₂ substituídos, em tratamento ip nas doses de 10 e 30 mg/kg respectivamente apresentaram atividade antitumoral significativa contra carcinoma de Ehrlich S180. Os produtos naturais 7"-O-metilagatisflavona e DCTN apresentaram atividade antitumoral significativa *in vivo*, contra o carcinoma de Ehrlich e S180 nas doses de 140 e 80-120mg/kg, respectivamente. O antimetabólito, 5-fluorouracil, utilizado como controle positivo, apresentou atividade antitumoral significativa contra os tumores S180 e Ehrlich na dose de 38 mg/Kg e 84 mg/Kg respectivamente. O estudo da citotoxicidade de células de carcinoma de Ehrlich por 48 horas mostrou que os produtos naturais, a amentoflavona (23,9 μ M), 7"-O-metilagatisflavona (10 μ M), quercetina (44 μ -M), **DCTN** e **CTN** (44 μ M) inibiram a proliferação celular. A biflavona 7"-O-metilagatisflavona, o flavonol quercetina e os derivados mesoiônicos inibiram a síntese de DNA e de proteínas em cultura de células de S180. As células de Ehrlich tratadas por 24 e

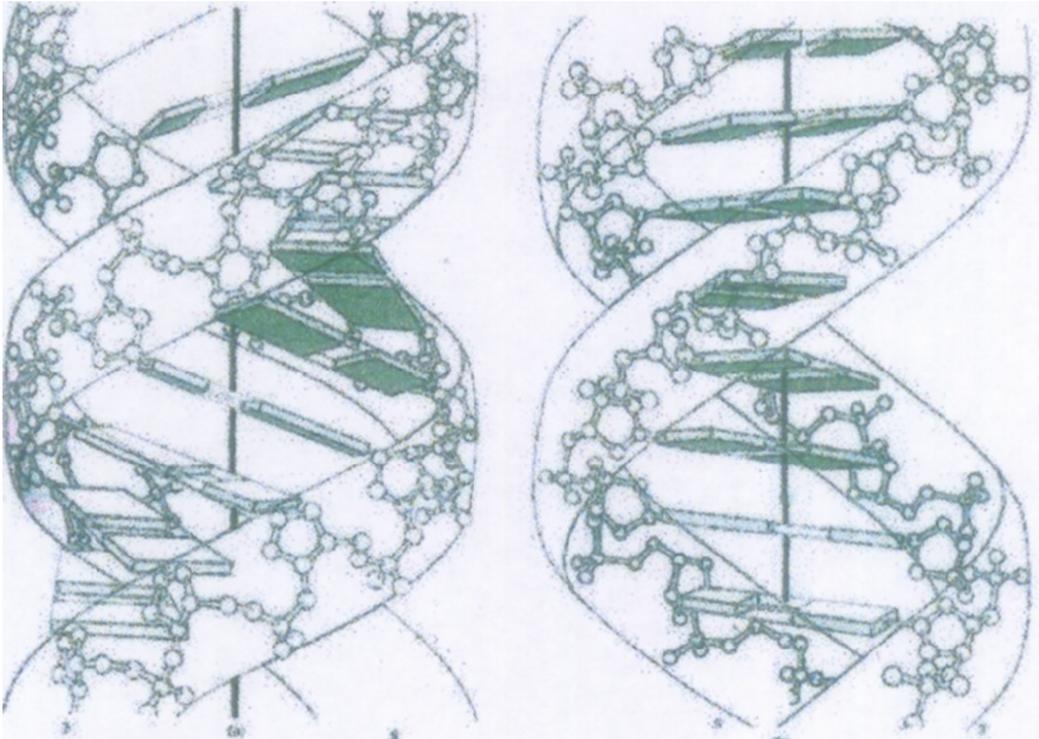
48 horas com amentoflavona, 7"-O-metilagatisflavona e quercetina apresentaram o DNA fragmentado sendo este fato inibido na presença de Zn^{2+} . A amplificação por reação de PCR para um fragmento do DNA de células de Ehrlich tratadas com os flavonóides, foi obtida utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores correspondendo as regiões dos exons 5 e 8 do gene *p53*. Camundongos tratados com o mesoiônico NO_2 -substituído e **DCTN** nas doses de 25 e 80 mg/kg respectivamente, apresentaram aumento significativo de $TNF-\alpha$, sugerindo resposta imunológica dos animais tratados. A inibição da topoisomerase I, por estabilização do complexo de quebra foi apresentada pelos derivados mesoiônicos. Os derivados mesoiônicos e a amentoflavona apresentaram características de interação ao DNA por medidas espectrofotométricas e espectrofluorimétricas. A atividade antitumoral significativa obtida *in vivo* e os demais efeitos estudados para os derivados sintéticos e os produtos naturais, sugerem que essas substâncias podem ser úteis na quimioterapia do câncer.

ABSTRACT

The antitumor activity in mice bearing Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma ascitic tumours, of four mesoionic derivatives [4-phenyl-5-(4-X-cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides, where X = H, OCH₃, NO₂ and OH], two biflavones amentoflavone and 7"-O-methylgathysflavone, the flavonol quercetin and two diterpenes, trans-crotonin (**CTN**) and trans-dehydrocrotonin (**DCTN**). The cytotoxic activity from these drugs on Ehrlich cells, the action on DNA topoisomerase I and the tumor necrosis factor (TNF- α) were determined. DNA profiles of Ehrlich cells treated with drugs were done by gel electrophoresis. The mesoionic derivatives OH and NO₂ substituted, in ip treatment at total dosis of 10 and 30 mg/kg, respectively, showed significant antitumoral activity against Ehrlich carcinoma and S180. The natural products 7"-O-methylgathysflavone e DCTN showed significant *in vivo* antitumour activity, against the Ehrlich carcinoma and S180 at total dosis of 140 and 80-120mg/kg, respectively. The antimetabolite, 5-fluorouracil, was used as a positive control had antitumour activity against S180 and Ehrlich tumours at dose of 38 mg/Kg and 84 mg/Kg, respectively. The cytotoxic studies of Ehrlich cells for 48 h showed that the natural products, the amentoflavone (23,9 μ M), 7"-O-metilgathysflavone (10 μ M), quercetin (44 μ M), DCTN and CTN (44 μ M) inhibited cellular proliferation. The biflavone 7"-O-methylgathysflavone, the flavonol quercetin and the mesoionic derivatives inhibited DNA and protein synthesis in S180 cells. The Ehrlich cells treated for 24 and 48 h with amentoflavone, 7"-O-methylgathysflavone and quercetin showed DNA "ladder" that were

markedly inhibited in the presence of Zn^{2+} . Amplification of a DNA fragment were obtained by PCR of DNA treated Ehrlich cells with flavonoids in the presence of oligonucleotides primers for the exons 5 and 8 of *p53* gene. Mice treated with mesoionic NO_2 -substituted and DCTN at dosis of 25 and 80 mg/Kg respectively, showed a significant $TNF-\alpha$ augmented values, suggesting that an imunologic response were obtained in treated mice. The mesoionic derivatives inhibits topoisomerase I by stabilizing the DNA-topoisomerase complex. It was observed the binding of mesoionic derivatives and amentoflavone with DNA from spectrophotometric and spectrofluorimetric measurements. The antitumour activity shown *in vivo* and the other effects studied for the synthetic derivatives and natural products suggest that these substances may be useful in cancer chemotherapy.

INTRODUÇÃO



Forma A do DNA

Forma B do DNA

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R., GELBART, W. M. N. **Introdução à Genética**, 6^a ed., Guanabara Koogan, 1998.

1. INTRODUÇÃO

A vida depende de reações bioquímicas para a manutenção da homeostasia normal, onde o crescimento e a divisão celular estão precisamente regulados (Vaux & Korsmeyer, 1999). Porém, em algumas células podem ocorrer alterações do controle no crescimento levando ao aparecimento de tumores. Os tumores afetam praticamente todos os organismos multicelulares, sejam animais ou vegetais. O estudo das alterações específicas da célula cancerosa em relação à célula normal pode contribuir para o melhor conhecimento da doença. Assim nasceu a oncologia, que é o estudo de tumores ou neoplasmas (Franks & Teich, 1998).

1.1. A célula tumoral

Ainda não é possível definir uma célula tumoral, sendo os tumores reconhecidos pelo crescimento anormal de suas células. Os tumores podem ser benignos ou malignos. A palavra câncer é usada para todos os tumores malignos. Em geral, os tumores benignos são bem diferenciados e crescem como massa coesiva, permanecendo em seu local de origem.

Já no tumor maligno ocorre falta de diferenciação ou anaplasia, que é acompanhada de infiltração progressiva e destruição do tecido vizinho. A maioria dos tumores malignos é invasivo, ocorrendo o crescimento celular progressivo e indefinido sem a regulação normal da célula. O tumor dissemina-se através da invasão local e das metástases, pela ruptura da membrana basal epitelial. Os receptores da membrana agem como sítios de ligação das células neoplásicas. As células tumorais podem alterar e degradar a matriz, através da secreção de várias proteinases, ocorrendo mais facilmente a disseminação das células malignas, a metástase, como resumido na Figura 1 (Matthews *et al.*, 1997).

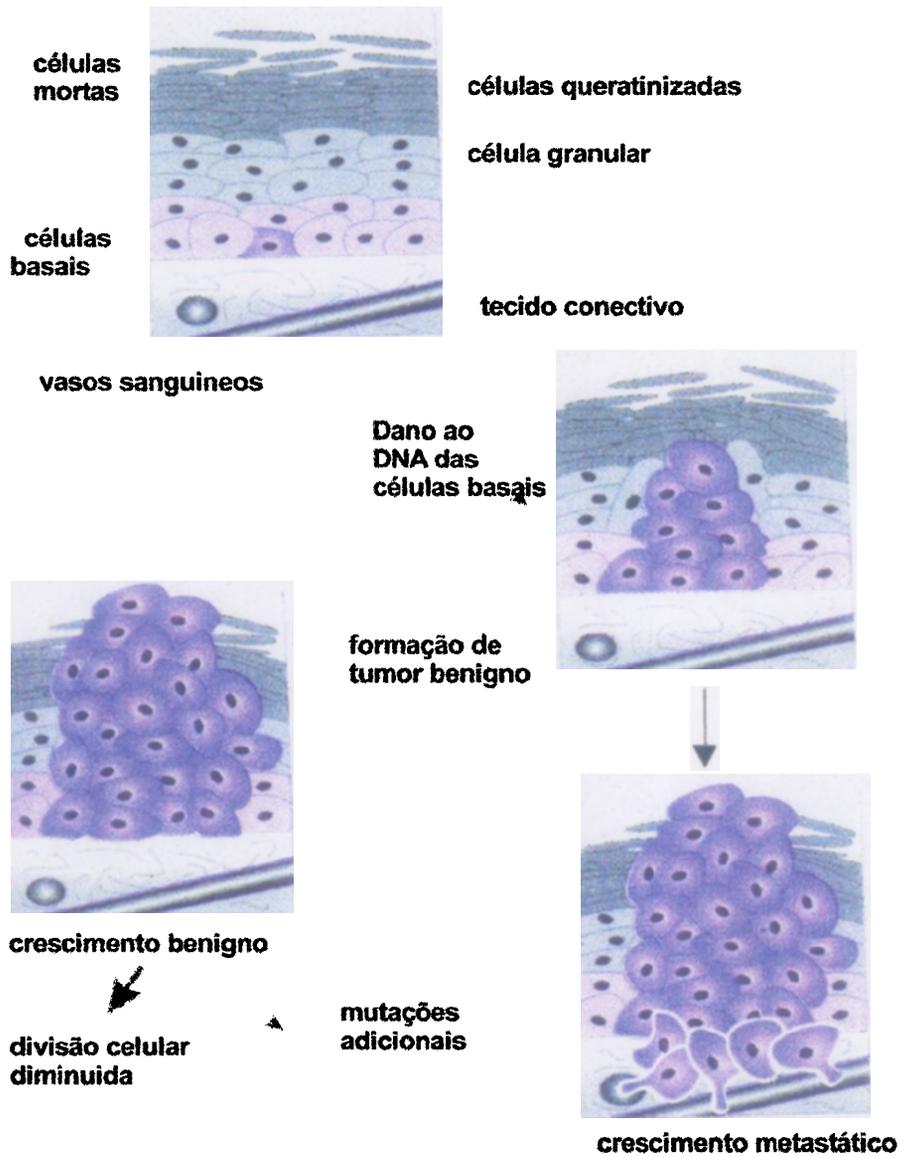


Figura 1. Estágios do crescimento celular benigno e maligno (adaptado de Matthews *et al.*, 1997).

O efeito combinado de mutação no DNA e a expressão alterada de genes por exposição a agentes promotores podem acelerar o desenvolvimento do crescimento maligno. A disseminação das células malignas pode ocorrer por três vias: a) implantação direta tanto em cavidades quanto em superfícies; b) disseminação linfática; c) disseminação hematológica.

A angiogênese (desenvolvimento de suprimento adequado de sangue) é uma etapa necessária mas não suficiente para produzir metástase, porém a inibição da angiogênese previne o crescimento de tumores (DeVita *et al.*, 1997). As células da maioria dos tumores secretam fatores de crescimento polipeptídicos angiogênicos, tais como fatores de crescimento epitelial (EGF), de plaquetas (PDGF) e de fibroblasto, interleucina-8, fator de crescimento transformante α (TGF- α) e β (TGF- β) e fator necrosante de tumor α (TNF- α), que promovem a proliferação de células endoteliais e estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos através do tumor (Fidler, 1997). Os novos vasos não são muito bem formados e podem ser facilmente lesados, permitindo a penetração da célula tumoral. Por outro lado, este fenômeno deve ser acompanhado por liberação local de inibidores da angiogênese, que podem estar sob o controle de genes supressores de tumores. Um exemplo, é a trombospondina, inibidor da angiogênese formada por fibroblastos humanos normais sob o controle do gene *p53* normal. Evidências adicionais mostram que os fatores angiogênicos estão sob o controle de oncogenes específicos (Folkman, 1997). A maioria dos estudos indica que o aumento de microvasos nas áreas de intensa vascularização é um fator prognóstico para vários tipos de câncer, como o de mama, cólon, melanoma e de ovário. Porém deve ser considerado que a angiogênese também é necessária para a

proliferação de células normais e é influenciada por leucócitos, macrófagos e linfócitos T (Fidler, 1997; Folkman, 1997). A interação de fatores de crescimento, como EGF ou PDGF com seus receptores, produz uma cascata complexa de eventos bioquímicos que podem estimular a síntese de DNA e a divisão celular, levando a alterações na expressão gênica. Os efeitos dos fatores de crescimento normais podem ser modulados pelos oncogenes em pontos-chave da transdução de vias regulatórias (DeVita *et al.*, 1997; Franks & Teich, 1998).

1.1.1. Cinética do crescimento da célula tumoral

Um mecanismo preciso durante o crescimento celular normal faz com que os diferentes órgãos atinjam um tamanho específico, sendo um dano reparado quando a célula é lesada. Existem fatores estimulantes e inibidores do crescimento que estariam normalmente em equilíbrio (Franks & Teich, 1998).

O crescimento de um tumor depende de diversos fatores inter-relacionados, como a fração de células que entra em divisão celular e o tempo de duplicação dessas células, sendo a duração do ciclo celular e a fração de crescimento uma representação da quantidade de células que é sensível às drogas (DeVita *et al.*, 1997).

1.1.1.1. Ciclo celular

O ciclo celular das células malignas é qualitativamente idêntico ao das células normais (Figura 2). Cada célula inicia seu crescimento durante o período pós-mitótico, uma fase denominada de G1, onde o RNA é sintetizado e são necessárias enzimas para a síntese de DNA e de outras proteínas. A fase G1 é seguida pela S, período durante o qual se processa

toda a síntese de DNA para um determinado ciclo, ocorrendo um aumento duplo do conteúdo celular de DNA. Após a síntese DNA, as células entram no período pré-mitótico, denominado G2. Neste período a síntese de DNA cessa, porém a síntese de RNA e de proteínas continua, iniciando-se a produção de precursores microtubulares do fuso mitótico. Este intervalo é seguido pela fase de mitose, M, ao final do qual ocorre a divisão física da célula, originando duas células-filhas, cada uma das quais inicia novo ciclo. A fase G1 encontra-se em equilíbrio com um estado de repouso denominado G0. As células em G0 não passam para a fase S, permanecendo inativas no que diz respeito à síntese de macromoléculas e insensíveis a muitos agentes quimioterápicos. O período entre duas mitoses é chamada interfase. Na célula animal estes eventos ocorrem a cada 18-24 horas. As fases S e G1 têm a maior duração e G2 a menor duração (Lewin, 1997).

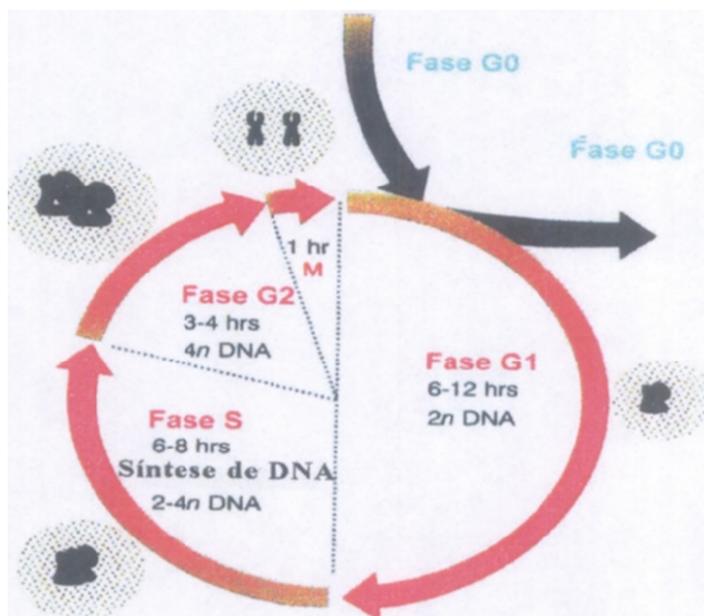


Figura 2. Ciclo celular da célula normal. A interfase é dividida nos períodos G1, S e G2. A mitose (M) separa um ciclo celular de outro. As células podem passar para uma fase de repouso G0 ou entrar no ciclo a partir de G0 (adaptado de Lewin, 1997).

Embora a maioria das drogas anti-câncer sejam mais eficazes contra células em proliferação ativa, alguns destes agentes antineoplásicos podem agir em determinada fase do ciclo celular, como o metrotexato atuando na fase S (ciclo específica), e as drogas que são citotóxicas para células em qualquer fase do ciclo (ciclo inespecífica), como as drogas alquilantes. As células danificadas que no ciclo celular estiverem na fase G1/S sofrerão apoptose se o gene *p53* estiver intacto. Ao contrário se o gene *p53* estiver mutado as células danificadas continuarão o ciclo celular, formando-se uma população de células resistentes às drogas (DeVita *et al.*, 1997). Assim, uma compreensão da cinética do ciclo celular e dos controles de crescimento das células normais e malignas é necessária para o tratamento quimioterápico e na pesquisa de novas drogas (Goodman & Gilman, 1996).

A taxa de crescimento tumoral depende da fração de crescimento e da relação de produção de células e a sua perda. A fração de crescimento das células tumorais é importante para a suscetibilidade ao tratamento quimioterápico. Tumores de crescimento rápido, que têm um grande número de células em divisão e um processo biossintético ativo de DNA, são sensíveis ao tratamento com drogas que matam as células em divisão. Porém, células normais que proliferam rapidamente como a medula óssea, o epitélio intestinal e os folículos pilosos são, também, sensíveis às drogas antineoplásicas, e limitam o uso.

1.1.2. Características das células tumorais

A proliferação celular no tecido neoplásico alterado proporciona a invasão e a metástase em locais distantes do organismo. As características histopatológicas incluem, entre outros, o aumento das células em mitose, a presença de diferentes tipos celulares pouco

diferenciados, a formação de células com núcleos grandes e nucléolo proeminente (Pratt *et al.*, 1994). Na Figura 3 pode-se observar um resumo de algumas características nas células malignas, tais como:

- alteração nas glicoproteínas e glicolipídeos da superfície celular,
- presença de antígenos tumorais,
- secreção de enzimas de hidrólise como proteases e collagenases,
- podem produzir componentes da matriz extracelular como laminina e fibronectina,
- secreção de uma variedade de fatores de crescimento,
- alta taxa de síntese de ácidos nucléicos, alterações nos genes, modificações nos cromossomos através de deleções e rearranjos,
- ocorre ainda perda de genes supressores do crescimento, como o gene *p53* em tumores humanos. Através de ensaios sensíveis pode-se detectar mutações nos genes *p53* (usualmente indica tumor invasivo) ou em *ras* (usualmente indica evento inicial na formação do tumor), em muitos fluídos do organismo que apresentam mutações idênticas no tumor primário (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997).

Todas estas alterações apresentam-se como alvos em potencial para drogas anti-câncer. O problema envolve a obtenção de drogas que destruam seletivamente a célula maligna sem afetar a célula normal.

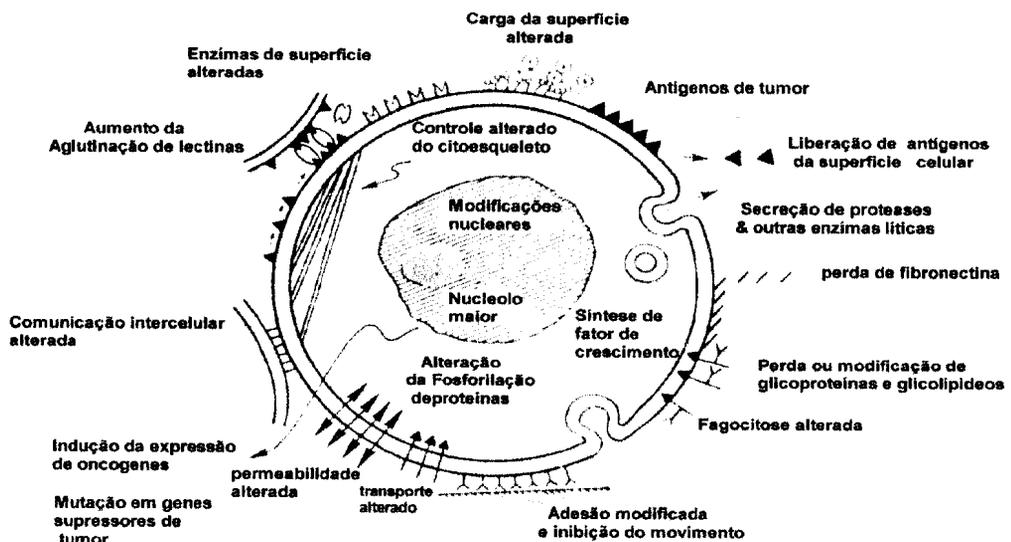


Figura 3. Alterações celulares observadas após transformação neoplásica (adaptado de Pratt *et al.*, 1994).

Nos tratamentos de câncer, utilizam-se a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia que têm sido usados sozinhos ou em combinação. A cirurgia e a radioterapia podem erradicar a doença localizada mas podem falhar quando ocorrem metástases. Em tais circunstâncias, a quimioterapia pode controlar a doença se utilizada adequadamente. A quimioterapia combinada com a cirurgia e a radioterapia podem aumentar a sobrevida do paciente. Alternativamente, pode envolver a quimioterapia como primeira etapa no tratamento para diminuir o tamanho do tumor primário (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997). O surgimento de novas drogas anti-câncer depende de investigações químicas e farmacológicas, que poderão contribuir para a descoberta e implementação de novas modalidades de tratamento, inclusive mais eficazes que os atuais.

1.2. Quimioterapia do Câncer

A quimioterapia tem por finalidade a destruição de células tumorais, preservando as células normais. Entretanto, a maioria dos agentes antitumorais atua de forma não específica, lesando células malignas e benignas, como consequência das diferenças mais quantitativas do que qualitativas entre as duas populações de célula (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997).

Os agentes utilizados interagem principalmente com o DNA, e seus precursores ou com enzimas que participam de sua síntese e transcrição, como resumido na Figura 4 (Waring, 1981).

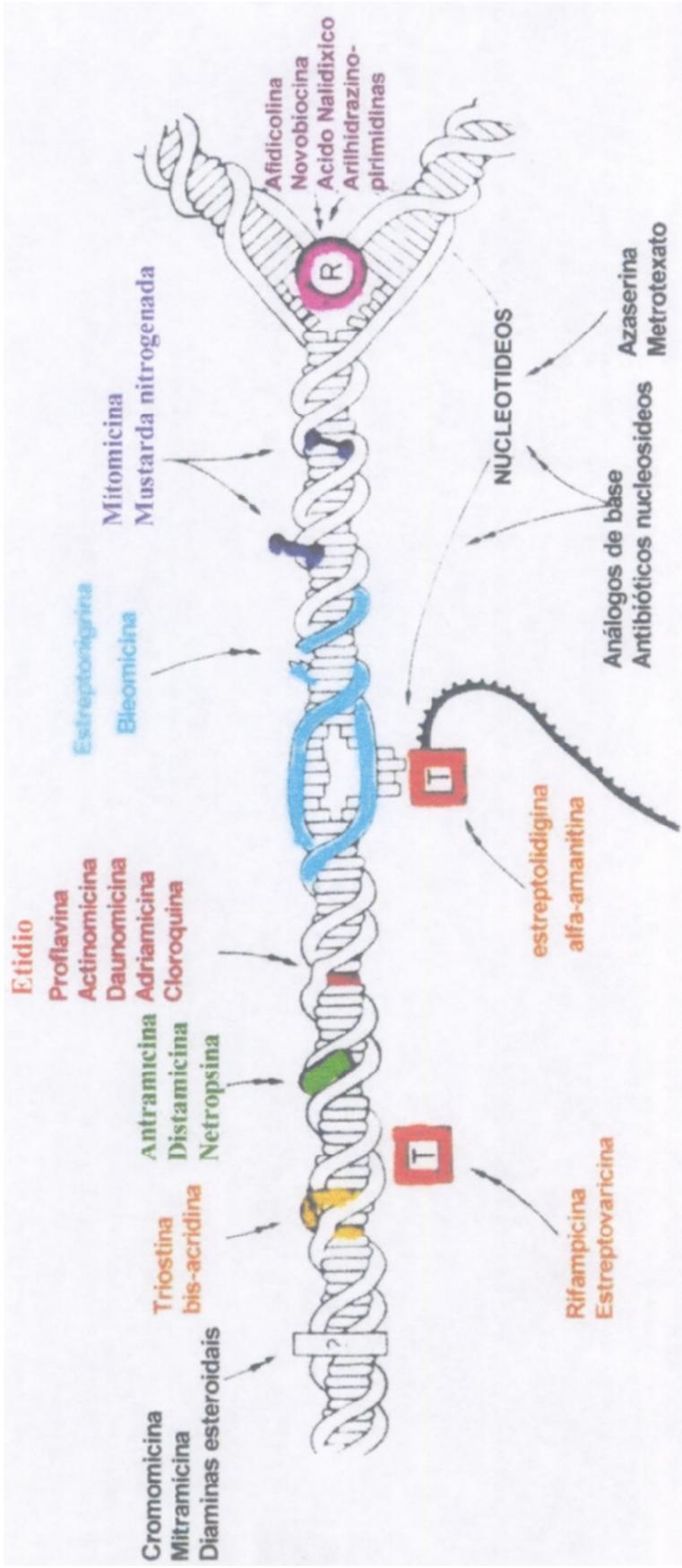


Figura 4. Ação de agentes quimioterápicos sobre o DNA. Na figura o local de ação de inibidores sobre o DNA está assinalado por setas com duas pontas. R= complexo enzimático para a replicação T = enzima de transcrição (adaptado de Waring, 1981).

1.2.1. Histórico

A primeira tentativa com sucesso de droga anti-câncer foi, com a mostarda nitrogenada em linfossarcoma, em 1942, pelo grupo de Gilman e Goodman. Somente em 1946, após a publicação desse resultado com tais compostos, iniciou-se a quimioterapia moderna do câncer. Até hoje, a mecloretamina, uma das primeiras mostardas nitrogenadas e a nitroso-uréia estreptozocina (Figura 5), são muito usadas em quimioterapia (Goodman & Gilman, 1996).

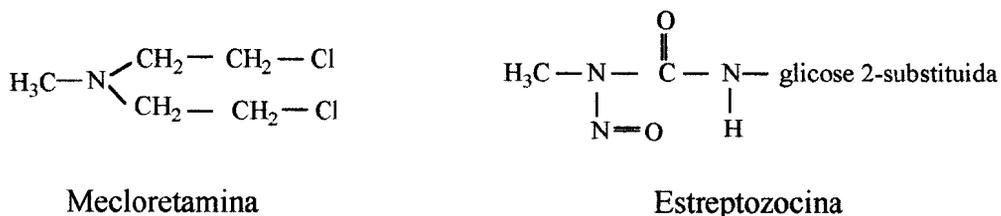


Figura 5. Estruturas da mecloretamina e da estreptozocina.

Os agentes alquilantes possuem estrutura molecular adequada para formação de intermediários carbocátions que funcionam como eletrófilos fortes na reação com as moléculas alvo. Essas reações de alquilação produzem ligações covalentes com grupos nucleofílicos (fosfato e amino) de vários componentes. O átomo de nitrogênio 7 da guanina aparece como um nucleófilo suscetível para essa ligação covalente. Outros átomos das bases pirimídicas e purínicas também podem ser alquilados. Assim, a guanina alterada por alquilação pode parear erradamente com a timina durante a síntese de DNA e levar a substituição do par de base resultando na ligação cruzada de duas moléculas de DNA. Todas essas substituições alteram a função do DNA causando os efeitos citotóxicos e mutagênicos desses agentes. A morte celular pode ocorrer por apoptose.

A segunda classe de agentes introduzidas envolve os antimetabólitos. Esses agentes se assemelham estruturalmente aos metabólitos necessários à função celular e interferem com a sua utilização normal. Tais agentes enquadram-se em 3 tipos: antifolatos, antipirimidinas e antipurinas. Em 1947, o primeiro antifolato usado contra leucemia aguda em crianças foi o ácido 4 aminofólico (aminopterina), após a observação de Farber e seu grupo de que antagonistas do folato eram citotóxicos. Já em 1949, foi sintetizado o metrotexato, ácido 4-amino-10-metil-fólico (ametopterina), Figura 6, usado até hoje, surgindo como primeiro exemplo de uma droga que cura o tumor coriocarcinoma (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997).

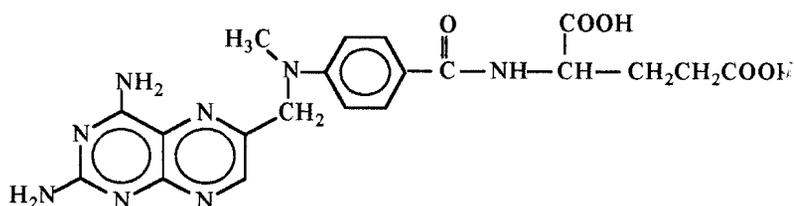
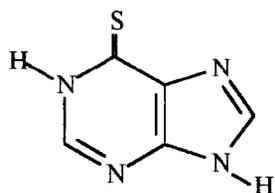
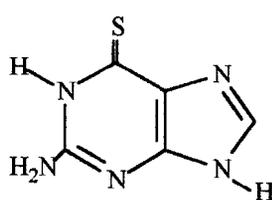


Figura 6. Estrutura do metrotexato.

Em 1953, utilizou-se um análogo das purinas, a 6-mercaptopurina, Figura 7, em tratamento de leucemia aguda de crianças, após muitos anos de pesquisa em animais realizadas por Elion e Hitching. Posteriormente, outro antagonista das purinas foi usado na clínica, como a tioguanina, Figura 7, para o tratamento das doenças malignas, como as leucemias humanas (Goodman & Gilman, 1996).



Mercaptopurina



Tioguanina

Figura 7. Estruturas da mercaptopurina e da tioguanina.

Heidelberg e seu grupo sintetizaram a primeira droga antipirimidina efetiva, o 5-fluorouracil (5-FU, Figura 8). Este agente sofre biotransformação anabólica em metabólitos de ribosil e desoxirribosil-nucleotídeos. Um dos metabólitos, 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-fosfato, forma um complexo ternário de ligação covalente com a enzima timidilato-sintetase e o cofator 5-N, 10-N-metileno-tetraidrofolato. Esta ação resulta em inibição da síntese de DNA e do RNA.

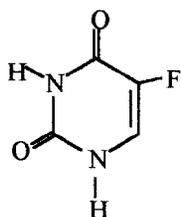


Figura 8. Estrutura do 5-fluorouracil.

Outras antipirimidinas foram sintetizadas, como a citosina arabinosídeo, sendo utilizadas nas terapias antileucêmicas.

Farber, em 1954, introduziu o antibiótico citotóxico actinomicina D, isolado de espécies de *Streptomyces*, para tratar o tumor de Wilms metastático de crianças. A partir de então, outros antibióticos com atividade antitumoral foram encontrados, incluindo-se a mitomicina, ativa contra leucemia mielogênica, e a doxorubicina (Adriamicina, Figura 9), uma das antraciclina efetivas no tratamento de leucemias e dotada de um largo espectro de ação em tumores sólidos. A adriamicina, produzida pelo fungo *S. peucetius*, tem anel tetraciclínico unido por ligação glicosídica ao açúcar daunosamina. As regiões planares da droga empilham-se entre as faces hidrofóbicas dos pares de bases do DNA, formando uma interação forte droga-DNA determinante de sua toxicidade. O anel do açúcar presente no

antibiótico liga-se ao sulco menor do DNA, formando complexo ternário com o DNA e a topoisomerase II (Goodman & Gilman, 1996).

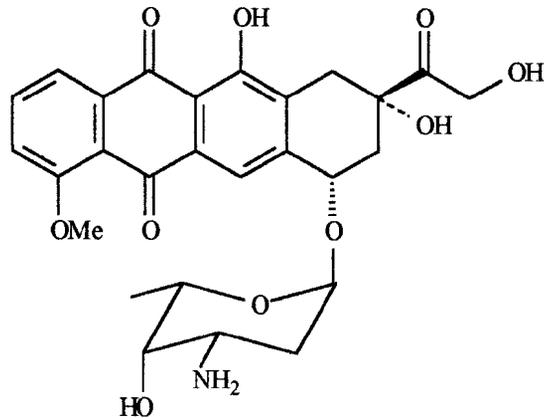


Figura 9. Estrutura da adriamicina.

Os glicopeptídeos, bleomicinas A₂ e B₂, Figura 10, originalmente extraídos do *S. verticillus*, executam a sua ação primária através da quebra do DNA de fita dupla, devido a produção de radicais livres por um complexo bleomicina-Fe(II) intercalado entre suas fitas opostas. As bleomicinas são ativas contra o câncer de testículo (Goodman & Gilman, 1996).

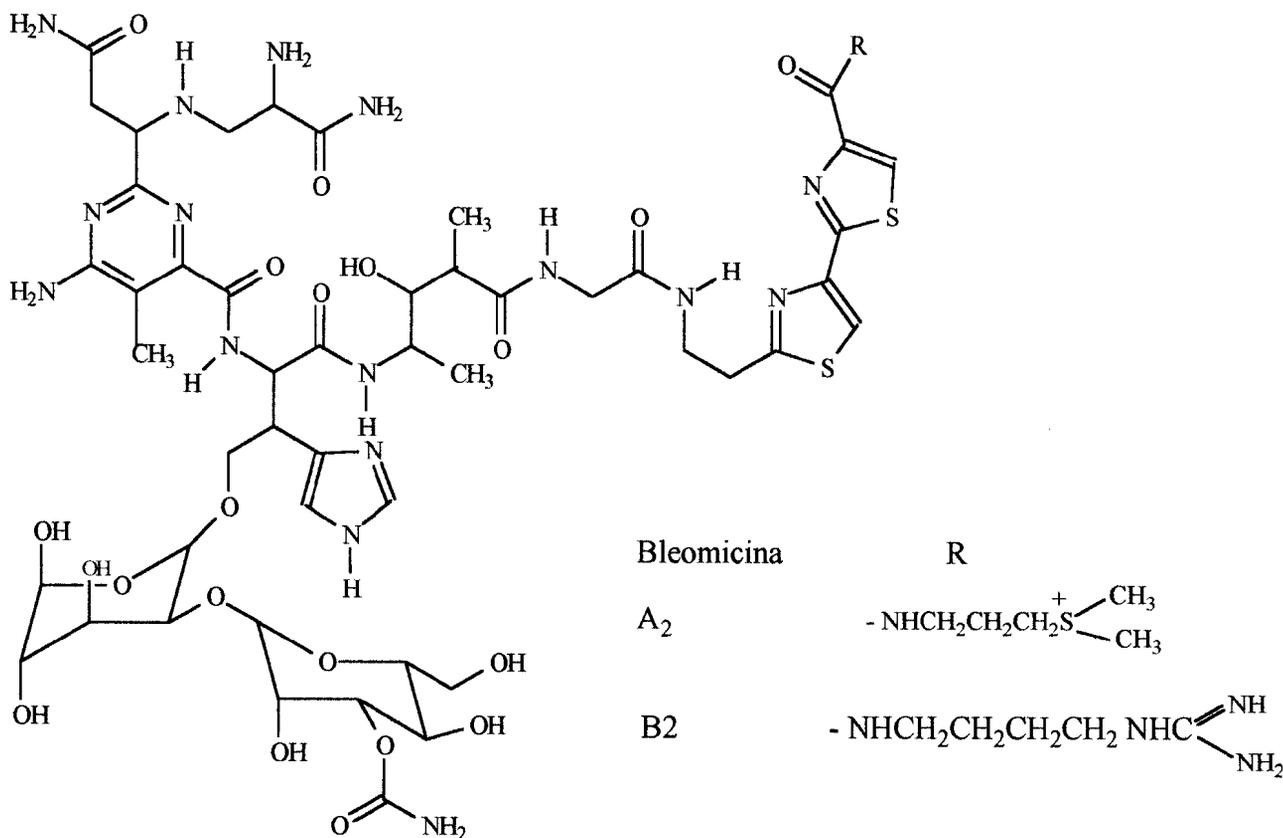


Figura 10. Estruturas das bleomicinas A₂ e B₂.

A investigação de plantas na busca de substâncias ativas contra o câncer conduziu à descoberta em 1958, dos alcalóides vincristina e vinblastina, Figura 11, isolados da pervinca (*Catharanthus roseus* G. Donn). Estes alcalóides diméricos ligando-se na tubulina inibem a polimerização dos microtúbulos, bloqueando as células na mitose e têm atividade em leucemias, linfomas e alguns carcinomas (Goodman & Gilman, 1996). É atribuído a Monroe E. Wall o estudo que levou ao isolamento e identificação da vincristina (Pezzuto, 1997).

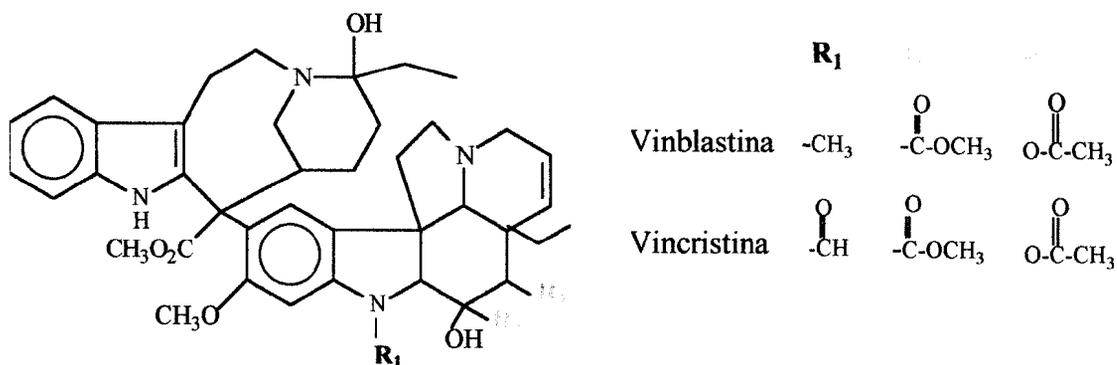


Figura 11. Estruturas da vinblastina e da vincristina.

Em 1965, foi introduzida a cisplatina, Figura 12, mas só em 1972 atingiu o estágio clínico, sendo usado em combinação com outras drogas para o câncer de pulmão, cervical e de cabeça, entre outros. Esse agente forma ligação cruzada com o DNA (Pratt *et al.*, 1994).

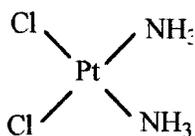


Figura 12. Estrutura da cisplatina.

A enzima L-asparaginase, outra droga utilizada para o controle de alguns tipos de leucemia, inibe a síntese de proteínas, em contraste com a maioria dos agentes atualmente em uso, que parecem exercer seus efeitos primários sobre a síntese ou função dos ácidos nucléicos.

Os antiestrogênios têm sido utilizados para o tratamento do câncer de mama. A observação de que as atividades estrogênica e antiestrogênica não eram dependentes do núcleo fenantreno levou a síntese de compostos fenólicos com atividade estrogênica como o dietilestilbestrol, e derivados trifeniletílenos como o tamoxifen com atividade antiestrogênica (Goodman & Gilman, 1996).

As terapias mais recentes incluem os inibidores da topoisomerase II, etoposida e a teniposida. A Figura 13 mostra dois derivados glicosilados semi-sintéticos da podofilotoxina, isolados da planta *Podophyllum peltatum* L. que possuem esta atividade. É atribuído a Morris S. Kuchpan os estudos que levaram ao isolamento e identificação da podofilotoxina (Pezzuto, 1997). A etoposida tem atividade contra câncer do testículo, pulmão, doença de Hodgkin e linfoma histiocítico difuso (DeVita *et al.*, 1997).

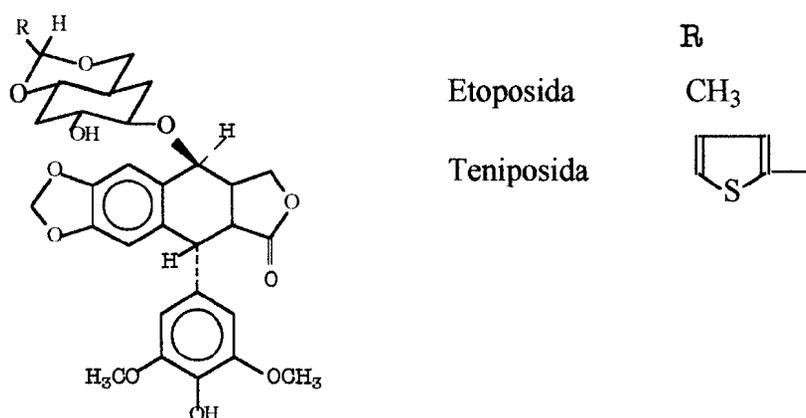


Figura 13. Estruturas da etoposida e da teniposida.

Os taxanos (taxol e docetaxel), Figura 14, representam uma nova classe de drogas que se destacaram como as mais importantes obtidas na última década devido a sua significativa atividade contra o câncer de ovário e de mama metastáticos. O diterpeno taxol (paclitaxel) foi isolado da planta *Taxus brevifolia* L. Esta substância natural liga-se especificamente à subunidade β -tubulina dos microtúbulos e inibe a desmontagem desta proteína do citoesqueleto, ocorrendo logo a seguir o bloqueio da mitose na metafase/anáfase. O docetaxel é um análogo mais potente do que o paclitaxel (Goodman & Gilman, 1996).

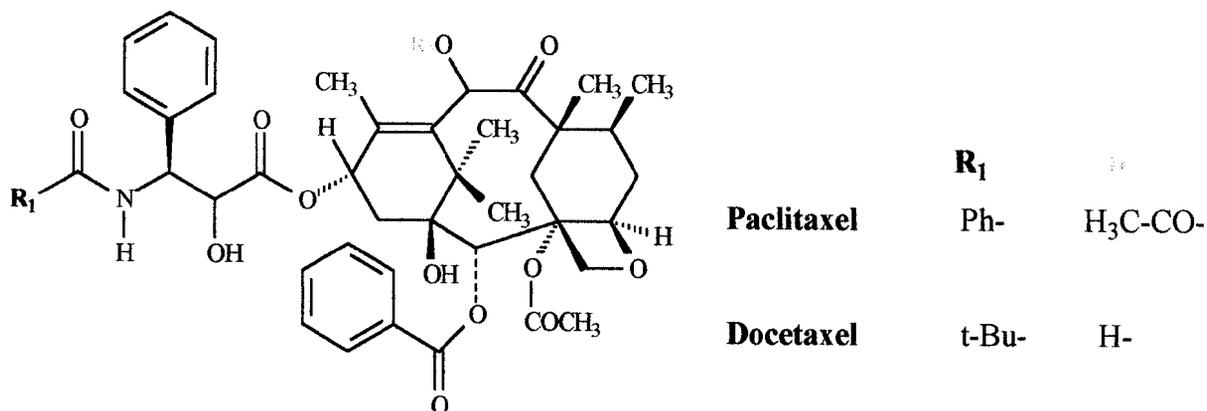
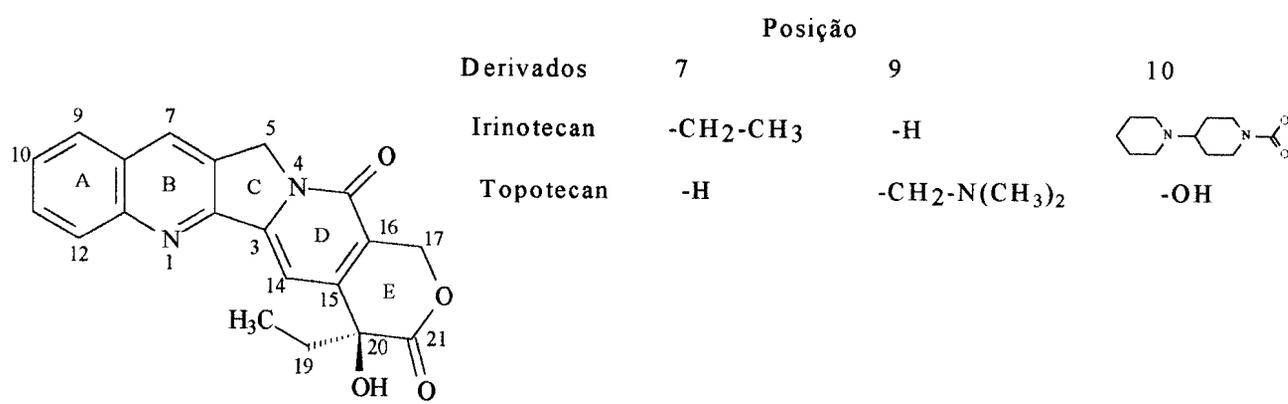


Figura 14. Estruturas do paclitaxel e docetaxel.

Recentemente, o topotecan, um derivado menos tóxico do alcalóide campotecina (Figura 15), isolado em 1960 da *Camptotheca acuminata* Decne, foi liberado para uso clínico, sendo efetivo contra tumores sólidos de crescimento lento (DeVita *et al*, 1997). Este produto é inibidor específico da topoisomerase I levando à morte celular, que pode ser devido à apoptose na fase G1 ou na fase G2 do ciclo celular. Esse agente com estrutura pentacíclica contém uma lactona no anel E, que é essencial para a citotoxicidade. São atribuídos a Mansukh C. Wani os estudos que levaram ao isolamento e caracterização da campotecina (Pezzutto, 1997). O topotecan (9-dimetilaminometileno-10-hidroxicampotecina) e outro derivado irinotecan, CPT-11 (7-etil-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)-carboniloxi-campotecina) estão representados na Figura 15.



campotecina

Figura 15. Estruturas da campotecina e dos derivados irinotecan e topotecan.

1.2.2. Tratamento quimioterápico

No início a maioria dos tumores apresenta-se como nódulos localizados (Pratt *et al.*, 1994). Dependendo do tipo do câncer, a terapia primária recomendada é a radioterapia ou cirurgia. A quimioterapia antineoplásica é usada principalmente no tratamento de tumores não curáveis pela cirurgia e/ou pela radioterapia. O tratamento com vários quimioterápicos pode curar tumores já em fase adiantada, como a doença de Hodgkin, as leucemias agudas, o carcinoma de células pequenas de pulmão e tumores sólidos pediátricos retinoblastoma, sarcoma de Ewing e rhabdomiosarcoma (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997). Acredita-se que a combinação de drogas previne o aparecimento de clones resistentes ao tratamento. Uma combinação de drogas, envolvendo uma que seja inespecífica para o ciclo celular e outra que seja fase específica, pode ser capaz de eliminar as células em divisão lenta e em divisão ativa.

O tratamento químico pode reduzir a massa tumoral em câncer de mama e carcinoma de ovário, adaptando as condições para uma cirurgia quando o tumor atingir um menor tamanho (Pratt *et al.*, 1994).

A resistência das células malignas aos agentes antineoplásicos é outra situação que deve ser considerada. Um dos meios para evitar este estágio é o de aumentar a taxa de erradicação celular. Mais recentemente, verificou-se que as mutações que ocorrem nas células tumorais como a perda do gene supressor *p53*, podem produzir a resistência à drogas. O funcionamento do gene *p53* nas células tumorais oferece condições de sensibilidade para a quimioterapia. Esta dedução baseou-se em observação no tecido normal como a medula óssea e o trato gastrointestinal, quando verificou-se que não desenvolvem resistência às drogas porque as células normais podem reparar o dano ao DNA ativando o gene *p53* ou sofrer apoptose (DeVita *et al.*, 1997). Estão sendo realizados trabalhos de síntese para obter drogas capazes de restaurar a apoptose nas células tumorais.

1.2.3. Fator de necrose de tumor (TNF)

A família dos fatores de necrose de tumor abrange oito membros, entre os quais as citocinas TNF- α e TNF- β (Franks & Teich, 1998). Nesta tese abordaremos a TNF- α . Esta proteína monomérica de 17.000 Dalton, foi originalmente identificada e denominada TNF em decorrência da sua mediação na necrose tumoral com inibição do crescimento de tumores nos animais tratados com lipopolissacarídeo. O TNF- α é produzido principalmente por monócitos e macrófagos ativados, embora outras células como as T estimuladas por antígenos, também, produzam essa citocina (Eigler *et al.*, 1997; Roitt, 1997). Após ligação a receptores na membrana das células alvo esta citocina induz uma cascata de proteínas ativadoras da mitogênese ativando dois fatores de transcrição nucleares, NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP-1), mediadores da indução de muitas proteínas centrais no processo inflamatório e resposta imune (Eder, 1997). O TNF está envolvido em efeitos diversos em órgãos e tecidos como mostrado na Figura 16 (Eigler *et al.*, 1997). O TNF funciona como fator de crescimento para os fibroblastos, além de apresentar atividade antiviral e estimular a atividade dos osteoclastos. Entre os efeitos imunes, participa com a indução de antígenos de histocompatibilidade MHC da classe I e com a interação com outras citocinas, como a interleucina-2 (IL-2) e o interferon- γ . O TNF age sobre os fagócitos mononucleares, estimulando a secreção de IL-1 e IL-6 na circulação. Contudo, o TNF é diretamente citotóxico para algumas células, possivelmente por indução na bioprodução de radicais livres do oxigênio (Havell *et al.*, 1988; North & Havell, 1988).

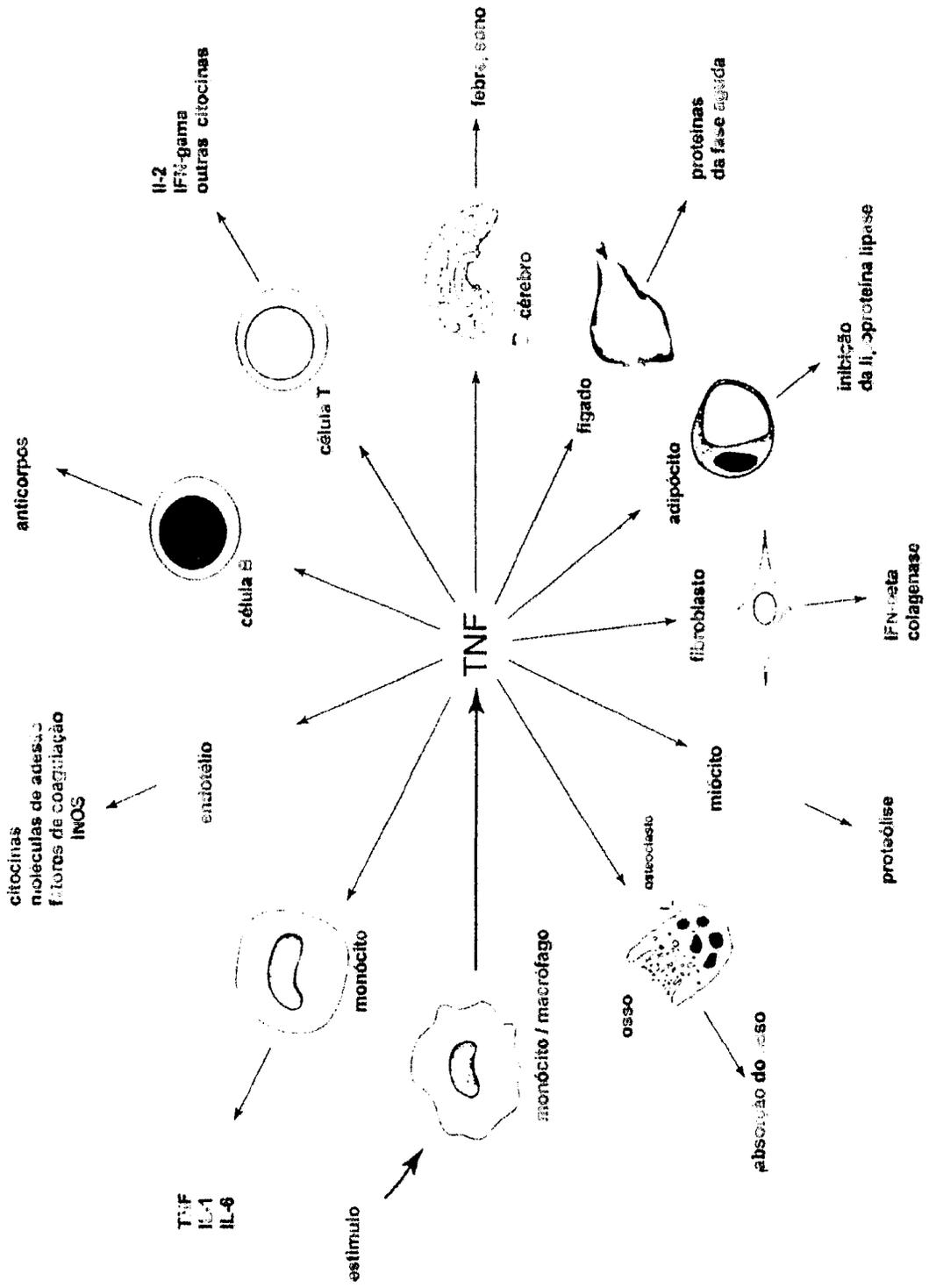


Figura 16. Efeitos biológicos do TNF- α . Esta citocina é produzida principalmente por monócitos/macrófagos (adaptado de Eigler *et al.*, 1997).

A administração de TNF por longo tempo pode induzir a caquexia e a inibição da síntese da lipoproteína-lipase (Musiani *et al.*, 1997). O TNF ministrado por via endovenosa promove a redução da resistência vascular sistêmica mediada através da indução do óxido nítrico nas células endoteliais. Esta citocina participa de doenças como artrite reumatóide, asma e a infecção por vírus da imunodeficiência humana, HIV (Eigler *et al.*, 1997). Por outro lado, estudos pré-clínicos sugerem que o TNF tem efeito antitumoral em cânceres avançados, sendo seu uso limitado em tratamento pela toxidez em doses elevadas (Havell *et al.*, 1988; North & Havell, 1988). Todavia, verificou-se que o TNF- α em associação com agentes quimioterápicos como o etoposídeo (um inibidor da topoisomerase II), assume atividade antitumoral significativa e com menor toxidez (DeVita *et al.*, 1997).

1.2.4. Resistência a drogas citotóxicas

O maior problema na quimioterapia é a resistência de tumores à ação de drogas. Alguns tipos de tumores, como o câncer de pequenas células do pulmão e o câncer de cólon, têm resistência primária. Outros tumores apresentam resistência adquirida, que se baseia em geral na alteração do aparecimento genético das células tumorais, como a amplificação ou o aumento da expressão de um ou mais genes específicos. Em outros casos, ocorre um fenótipo resistente a múltiplas drogas. A expressão aumentada de um gene normal encontra-se associada à glicoproteína P de membrana envolvida no efluxo da droga que necessita de ATP. Teoricamente, a resistência a múltiplas drogas pode ser inibida por administração concomitante da droga citotóxica e um inibidor do transportador da glicoproteína, como o verapamil (Pratt *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997).

1.2.5. Triagem de drogas

A triagem de drogas sintéticas ou naturais com base na atividade anti-câncer iniciou-se com o estabelecimento de linhagens singênicas de camundongos, nos quais eram transplantados tumores como as leucemias murinas L1210 e P338 e alguns outros tumores (Skehan *et al.*, 1990; DeVita *et al.*, 1997). Recentemente no Instituto Nacional do Câncer, Estados Unidos, foi introduzida a triagem de drogas com um painel de 60 linhagens de tumores humanos de mama, próstata, pulmão, ovário, rim, sistema nervoso central, leucemia e melanoma (Monks *et al.*, 1991).

1.2.5.1. Ensaios para o crescimento celular *in vitro* e *in vivo*

A investigação de agentes químicos no ensaio da sensibilidade de células tumorais *in vitro* iniciou-se na década de 50 com o advento de meios de cultura apropriados (Geran *et al.*, 1972; Skehan, 1995; DeVita *et al.*, 1997; Gura, 1997). Os ensaios para o crescimento celular e citotoxicidade podem ser avaliados por:

- I. Análise morfológica do dano celular por contagem de células ou de colônias.
- II. Medida da inibição do metabolismo celular com base no valor da atividade de avaliação de desidrogenases celulares.
- III. Medida da incorporação de precursores marcados por isótopos radioativos, como a [³H]-leucina, [³H]-uridina, [³H]-timidina em proteínas, RNA e DNA, respectivamente.
- IV. Ensaios de ligação de corante (e.g. SRB) com biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Esta análise é muito útil para ensaio de drogas em grande escala (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991). O ensaio colorimétrico com a sulforrodamina (SRB) para corar proteínas pode ser citado como um exemplo.

Ainda não existe um método ideal. O efeito citotóxico contra células tumorais pode revelar apenas a toxicidade que pode ocorrer também em células normais, sem definir se é específica. A escolha de um método *in vitro* depende de sua sensibilidade, levando-se em conta a ação da droga e a sua correlação com a atividade *in vivo* (Gura, 1997).

1.2.6. Drogas estudadas

1.2.6.1. Compostos mesoiônicos e definição

O termo mesoiônico foi introduzido por Baker, Ollis e Poole, em 1949, que definiram esses produtos como: heterocíclicos, de cinco ou seis membros, que não podem ser representados satisfatoriamente por estruturas totalmente polares ou totalmente covalentes (Newton & Ramsden, 1982). As substâncias desta classe têm sido estudadas desde o final do século passado, quando o primeiro mesoiônico obtido, a desidroditizona, teve sua estrutura elucidada muitos anos depois, Figura 17. Posteriormente, foram relatados vários trabalhos sobre a síntese e a atividade biológica de outros heterocíclicos, como as sidnonas (Kier & Roche, 1967; Newton & Ramsden, 1982).

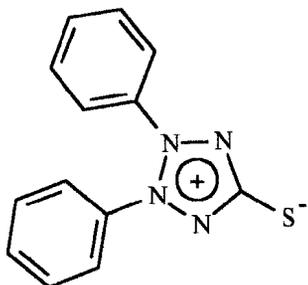


Figura 17. Estrutura da desidroditizona.

Esses compostos têm muito interesse científico e prático estimulado pela sua estrutura não clássica com regiões bem separadas de cargas negativas e positivas associadas com um sistema poliheteroatômico possibilitando a interação com várias biomoléculas, entre as quais os ácidos nucleicos e proteínas (Newton & Ramsden, 1982; Shinzato *et al.*, 1989).

1.2.6.1.1. Características estruturais

Em 1949, Baker, Ollis e Poole estabeleceram também as características estruturais de compostos mesoiônicos (Kier & Roche, 1967).

- O composto deveria conter um anel aromático heterocíclico de cinco ou seis membros que não fosse capaz de ser representado por uma estrutura totalmente covalente.
- Todos os átomos do anel seriam doadores de elétrons π , para formar um sexteto deslocalizado.
- O anel deveria apresentar uma carga parcial positiva, balanceada por uma carga negativa em um grupo ou átomo exocíclico α .

O anel deve ser planar ou quaseplanar contendo considerável energia de ressonância.

Embora a definição original de termo mesoiônico reconheça que alguns derivados com anéis de seis possam ser descritos, em 1976, foi recomendado que esse nome seja restrito a anéis de cinco membros (Newton & Ramsden, 1982). De acordo com essa modificação, os compostos mesoiônicos são representados pela fórmula geral 1 (Figura 18) onde a-f são átomos de carbono ou grupos derivados de carbono ou heteroátomos. Estes componentes do pentanel são escolhidos para produzir um sistema conjugado entre todos os átomos e o substituinte exocíclico no carbono α .

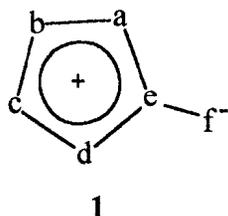


Figura 18. Fórmula geral para os compostos mesoiônicos.

Atualmente, os mesoiônicos são descritos como sendo compostos pertencentes à classe das betaínas mesoméricas heterocíclicas conjugadas (Echevarria *et al.*, 1995). Tais moléculas conjugadas neutras podem ser representadas apenas por estruturas dipolares, em que as cargas positiva e negativa estão envolvidas em conjugação mútua e num sistema comum de elétrons π .

1.2.6.1.2. Compostos mesoiônicos dos tipos A e B

A análise dos sistemas estruturais possíveis permitiu reconhecer 2 tipos de mesoiônicos heterocíclicos, tipos A e B, representados na Figura 19, onde os números sobrescritos correspondem ao número de elétrons com que cada átomo contribui para formar os orbitais π (Newton & Ramsden, 1982).

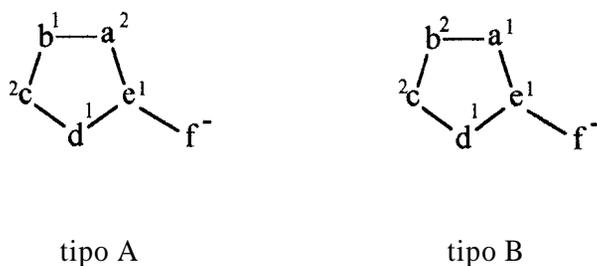


Figura 19. Estrutura geral dos compostos mesoiônicos do tipo A e B.

- Os compostos do tipo A apresentam condições estruturais adequadas para a participação em reações de adição 1,3 dipolares.
- Os compostos do tipo B dispõe de condições estruturais que facilitam a utilização de reações para abertura do anel, fornecendo o tautômero acíclico correspondente.

Usando uma combinação de átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre pode-se formar 144 produtos mesoiônicos do tipo A e 84 do tipo B. Os dois tipos de mesoiônicos apresentam propriedades químicas diferentes.

Como exemplo de mesoiônico do tipo 13 pode-se citar o 1,2-oxazólio-4-olato (Figura 20).

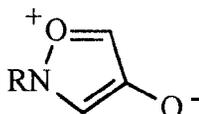


Figura 20. Estrutura do 1,2-oxazólio-4-olato.

Os compostos estudados neste trabalho podem ser citados como exemplos de compostos do tipo A, os derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (Figura 21), que são representados como híbridos de ressonância das quatro formas canônicas: **a**, **b**, **e**, **d**. Estes compostos são muitas vezes representados por estruturas contendo a unidade básica **a**, permitindo caracterizá-los como betaínas heteroaromáticas.

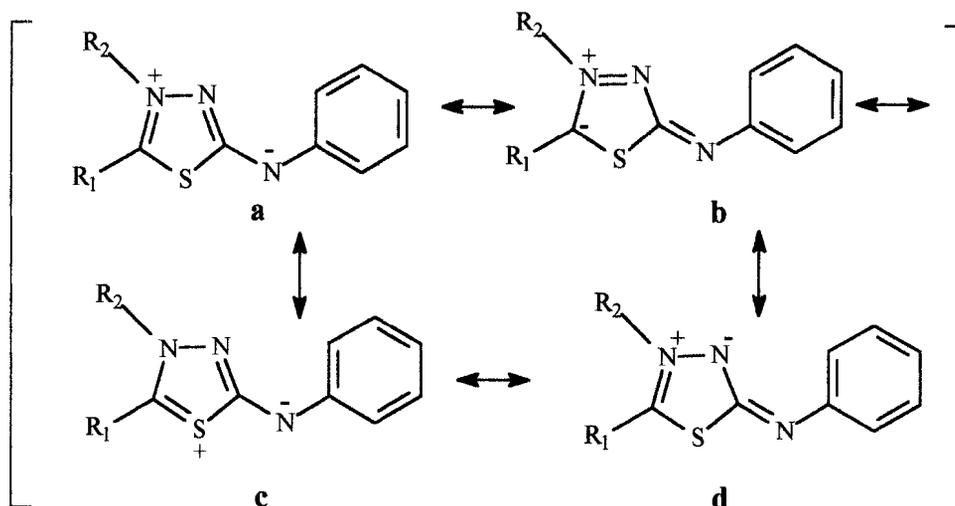


Figura 21. Estrutura e formas canônicas dos compostos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida.

1.2.6.1.3. Estrutura e propriedades espectroscópicas

Desde a introdução do conceito de compostos mesoiônicos, as estruturas desses compostos foram determinadas através de suas propriedades espectroscópicas na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear (Newton & Ramsden, 1982).

Utilizou-se também a difração de raios-X como método de definição estrutural do comprimento e ângulos de ligação. Foram realizados cálculos teóricos para determinar os valores de momentos dipolares, ordem de ligação e densidade eletrônica dos compostos mesoiônicos. Cheng *et al.*, em 1993, estudaram através da difração de raios -X e cálculos teóricos, o cloreto de 4-fenil-5-(4-metoxi-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, **MI-C** (Figura 22) e definiram sua estrutura betaínica na forma cristalina.

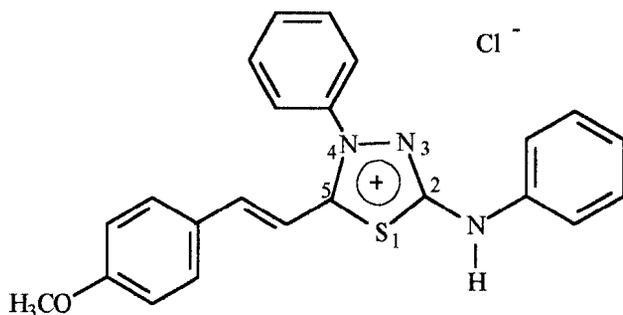


Figura 22. Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-(4-metoxi-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, **MI-C**.

Os compostos mesoiônicos foram estudados também na região ultravioleta (UV). Os compostos 1,3,4-triazólio-2-tiolato mostraram absorção máxima em λ_{max} de 240 nm ($\epsilon = 3100$) e 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida, λ_{max} entre 345-400 nm, atribuídas a transições eletrônicas do anel mesoiônico, entre 250-271 nm, correlacionadas com transições eletrônicas envolvendo o substituinte fenila ligado ao anel heterocíclico. O ácido conjugado do 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida apresenta absorções típicas entre 340-383 e 260-276 nm, sendo que a intensidade das bandas correspondentes às unidades mesoiônicas parece bem menor do que para os representantes do grupo substituinte fenila (Montanari *et al.*, 1994).

As sidnoniminas (Figura 23) absorvem intensamente no UV e seus derivados N(6)-nitroso atingem a região do visível. Os sais de alquilsidnoniminas têm absorção na região de 270-306 nm e 200-208 nm. Verificou-se que as absorções observadas nos espectros UV destas substâncias correlacionam-se com transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ envolvendo os níveis $S_0 \rightarrow S_1^*$ de maior λ e $S_0 \rightarrow S_3^*$ de menor λ . Os cálculos mostraram que existe uma outra banda correspondendo a transição entre os níveis $S_0 \rightarrow S_2^*$, mas a intensidade dessa banda é

muito baixa para ser detectada. A banda de absorção do derivado N(6)-exonitroso das sidnoniminas na região do visível é devido a transição $n \rightarrow \pi^*$. A natureza dos substituintes nas posições 3 e 4 do anel e do grupo exocíclico não tem influência significativa no máximo de absorção que aparece no menor λ . Em contraste, a absorção em maior λ , alcança valores altos. Por exemplo, a substituição por grupo aril na posição 3 ou 4 do anel da sidnonimina produz deslocamento batocrômico, aparecendo uma nova banda em λ entre 220-260 nm.

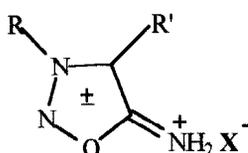


Figura 23. Estrutura da sidnonimina, onde R e R' são substituintes como fenil ou alquil. X = anion, por exemplo cloreto.

Souza em 1996, por espectroscopia de fluorescência, observou interação do DNA do timo de bezerro com os cloretos de 4-fenil-5-X-tiadiazólios-2-fenilamina onde X = benzila, naftila, α -acetopirenila e cinamoila (Figura 24). Foi obtido também o isômero estrutural do derivado benzil-substituído, o cloreto de 1,4,5-trifenil-1,3,4-triazólio-2-tiol.

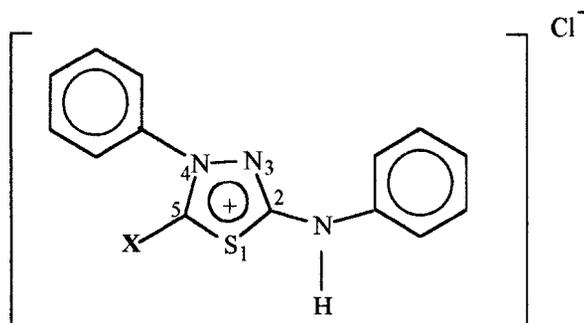


Figura 24. Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-**X**-tiadiazólio-2-fenilamina onde **X** = benzila, naftila, α -acetopirenila e cinamoila.

Os espectros de absorção da maioria desses compostos, com exceção do pireno-substituído, mostraram duas bandas características do anel mesoiônico em λ max entre 250 e 350 nm, com variação da absorptividade molar. Os heterocíclicos dissolvidos em acetonitrila emitiram baixa fluorescência quando excitados em λ de 250 nm ou 350 nm, e foi sugerido que a banda de emissão em λ de 390 nm seja devido ao sistema 1,3,4-tiadiazólio. Por outro lado, foi analisada a fluorescência desses compostos na presença ou ausência de DNA do timo de bezerro excitando-se em λ de 630 nm e as emissões foram monitoradas entre λ de 650 e 800 nm. O espectro de fluorescência da maioria das substâncias na presença de DNA indicou que, em geral, em baixa concentração dos compostos ocorre alteração do espectro de emissão, indicando possível intercalação desses compostos (Souza, 1996).

1.2.6.1.4. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os compostos mesoiônicos têm sido estudados em várias áreas: na área de cristais líquidos, na confecção de materiais com propriedades óticas não lineares, na síntese de corantes e quanto às suas atividades biológicas diversificadas.

1.2.6.1.4.1. Atividade antitumoral

Os derivados da classe das sidnonas, 1,2,3-oxadiazólio-5-olato e seus análogos 1,2,3-oxadiazólio-5-aminida, as sidnoniminas, são os mais estudados. Recentemente, derivados desta classe mostraram atividade antiproliferativa relacionada à formação de óxido nítrico (Vilpo *et al.*, 1997).

O nosso grupo relatou, os resultados das investigações envolvendo quatro novas aril-sidnonas da classe 3-[4-X-3-nitrofenil]- 1,2,3-oxadiazólio-5-olato, onde X = Cl (**SYD-1**), pirrolidinil (**SYD-2**), piperidinil (**SYD-3**) e morfolinil (**SYD-4**), Figura 25, revelando atividade significativa *in vitro* contra células de leucemia L1210, verificada através da inibição da incorporação de ^3H -timidina e ^3H -leucina. Duas arilsidnonas, **SYD-1** e **SYD-2**, apresentaram atividade *in vivo* contra os tumores murinos carcinoma de Ehrlich, S180 e o tumor histiocitoma B10MCII (Grynberg *et al.*, 1992).

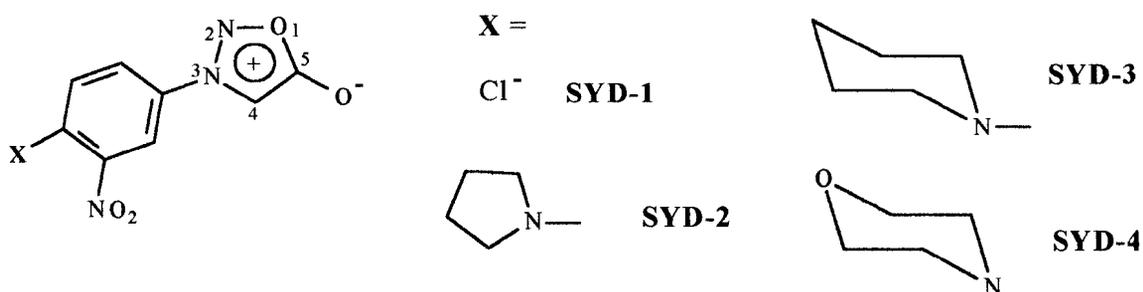


Figura 25. Estrutura das aril-sidnonas onde X = Cl (**SYD-1**), pirrolidinil (**SYD-2**), piperidinil (**SYD-3**), morfolinil (**SYD-4**).

Shinzato *et al.*, em 1989, evidenciaram que o derivado 1,3,-difeníl-2-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,3,4-triazólio-5-tiol (Figura 1.26) mostrou-se ativo contra 3 tumores murinos, Ehrlich, S180 e o histiocitoma induzido por metilcolantreno B10MCII.

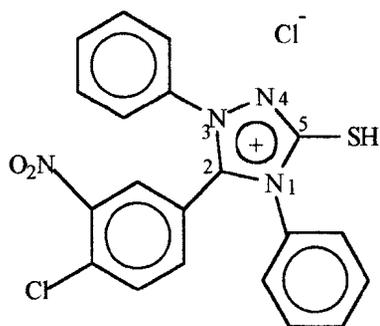


Figura 26. Estrutura do 1,3,-difeníl-2-[4-cloro-3-nitro-fenil]-1,3,4-triazólio-5-tiol.

1.2.6.1.4.2. Ação em doenças cardiovasculares: Atividade vasodilatadora e hipotensora

Os nitratos são vasodilatadores ativos usados no tratamento de doenças cardiovasculares. Recentemente, verificou-se que estão envolvidos na formação de NO, que é sintetizado a partir da L-arginina pelas isoenzimas óxido nítrico sintases. O NO ativa a enzima guanilato ciclase levando ao acúmulo de cGMP e subsequente relaxamento vascular (Goodman & Gilman, 1996).

Derivados mesoiônicos oxatriazólios-5-imina-3-aryl substituídos sintetizados pela GEA Ltd, **GEA 3162** e **GEA 3175**, Figura 27, inibem a função dos neutrófilos, suprimem o crescimento de células tumorais, têm atividade antibacteriana, são vasodilatadores, antiplaquetários e fibrinolíticos, apresentando também atividade inibitória da oxidação de

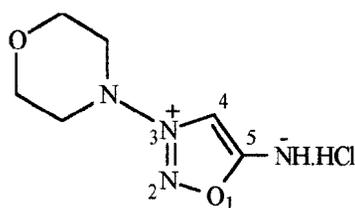


Figura 28. Estrutura da 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1).

1.2.6.1.4.3. Atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária

As arilsidnonas têm atividade antimicrobiana maior do que os correspondentes derivados alquila (Philli *et al.*, 1993).

Os mesoiônicos da série 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato, 5- substituídos com metil, etil, isopropil e propila, (Figura 29), revelaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. Compostos com substituintes mais volumosos não apresentaram atividade (Kier & Roche, 1967).

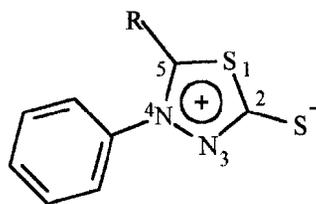


Figura 29. Estrutura da 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato, 5- substituidos com R =metil, etil, isopropil e propila.

O mesoiônico 3-[4-(2,5-dimetilpirrol-1-il-aminocarbonil)]-fenilsidnona (Figura 30) apresentou atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (Hiremath *et al.*, 1994).

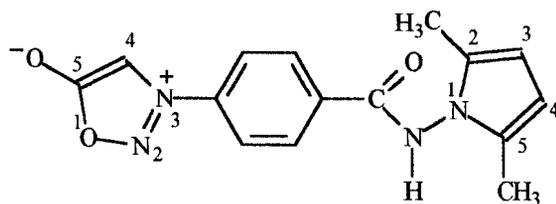


Figura 30. Estrutura da 3-[4-(2,5-dimetilpirrol-1-il-aminocarbonil)]-fenilsidnona.

Foram relatadas as atividades antifúngica e antibacteriana de derivados da classe dos 1,3,4-triazólio-5-tiolatos, além da atividade antitumoral (Áurea Echevarria, comunicação pessoal).

Sete derivados de cloreto de 4-fenil-5-(3 e 4-X-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, Figura 31, revelaram atividade significativa *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* (Torres *et al.*, 1998).

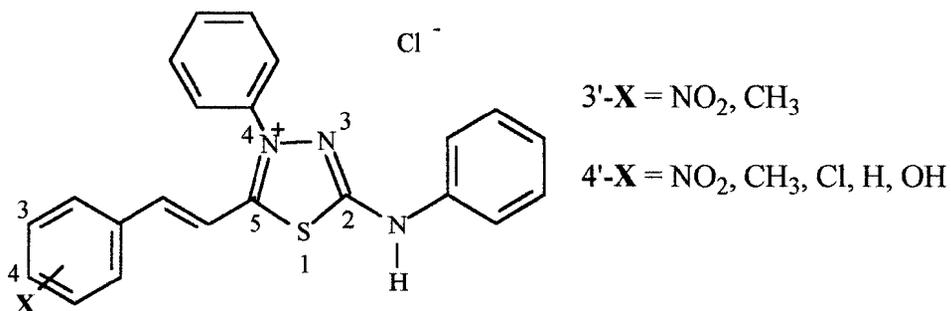


Figura 31. Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-(3 e 4- X-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.

1.2.6.2. Produtos naturais

Desde que o conhecimento farmacêutico e médico começou a organizar-se, todas as informações referentes a medicamentos foram chamadas *de materia medica*. No primeiro século da era cristã foi escrito o livro *De materia medica libri quinque*, que abordava cerca de seiscentas plantas medicinais, além de certo número de produtos animais, utilizadas durante cerca de 15 séculos. Já nas últimas décadas do século XX, os leigos descobriram a utilidade dos medicamentos de origem vegetal, talvez devido à admiração pelas coisas naturais, levando as pessoas ao seu uso (Robbers *et al.*, 1997). Vale a pena citar que os espanhóis, durante a ocupação na América, aprenderam com os índios peruanos a beber a água obtida da casca da árvore *Cinchona*, que contém quinina (Figura 32), para combater a febre (malária).

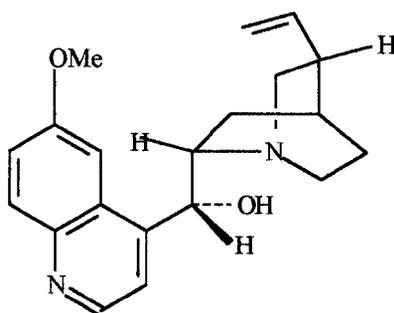


Figura 32. Estrutura da quinina.

Desde então, a indústria farmacêutica reconheceu que certas plantas eram as melhores fontes de componentes de novos medicamentos e a pesquisa na área da botânica voltou-se para plantas existentes em regiões como as florestas tropicais. Finalmente, na era moderna tem-se a tecnologia do DNA recombinante para a produção de novos medicamentos, que

poderá poupar as plantas da natureza para que elas continuem ocupando seu lugar no mundo atual (Pezzuto, 1997; Robbers *et al.*, 1997).

1.2.6.2.1. Química e importância dos produtos medicinais de origem vegetal

O organismo vivo pode ser considerado um laboratório biossintético não só no que se refere aos compostos químicos como as proteínas, glicídeos e lipídeos, produtos do metabolismo primário utilizados como alimentos, mas também no que se refere a uma infinidade de compostos como os glicosídeos, alcalóides, flavonóides e terpenóides, produtos do metabolismo secundário, que exercem efeitos fisiológicos. São estes últimos que conferem propriedades terapêuticas aos princípios ativos extraídos de extratos. Nos últimos anos aumentou o interesse no estudo da biossíntese dos componentes secundários usados nos medicamentos. Algumas das seqüências fundamentais de reações que levam a diferentes tipos de metabólitos secundários estão apresentados na Figura 33.

Há muito se discute a utilidade desses princípios ativos para as plantas que os produzem. Uma das hipóteses mais aceita é a de que a função desses compostos estaria ligada à sobrevivência das plantas (Cody *et al.*, 1987; Robbers *et al.*, 1997).

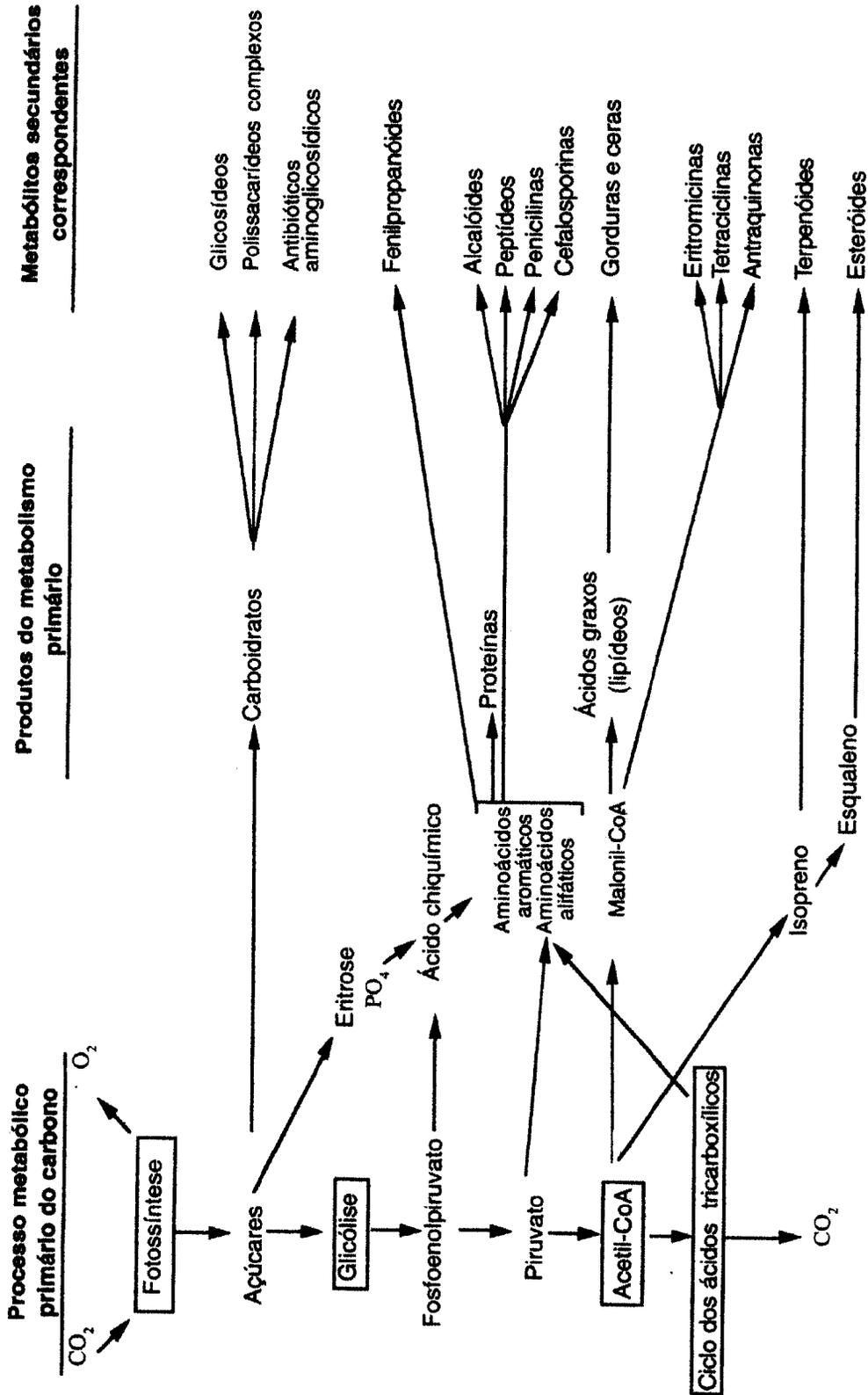


Figura 33. Inter-relações dos processos de síntese que levam à formação de componentes secundários nas plantas (adaptado de Robbers *et al.*, 1997).

livre como na forma de glicosídeos, derivados metilados, acilados ou prenilados (Geissman & Crout, 1969; Dewick, 1998). São componentes da dieta humana por fazerem parte da composição química de frutas, legumes e sementes (Cody *et al.*, 1987; Kandaswami *et al.*, 1992). O esqueleto básico origina-se de três unidades de malonil CoA e uma unidade de cinamoil CoA como iniciador. Os flavonóides são caracterizados estruturalmente por conterem dois anéis aromáticos hidroxilados (A e B) unidos por um fragmento de três carbonos (esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆). Cada classe difere entre si dependendo da variação do estado de oxidação do segmento conectante C₃. Várias classes foram encontradas: chalconas, isoflavonas, auronas, antocianidinas, flavanonas e flavonóis (Cody *et al.*, 1987; Stafford, 1990; Dewick, 1998), Figura 35. Através do acoplamento oxidativo de dois flavonóides formam-se os biflavonóides (Stafford, 1990).

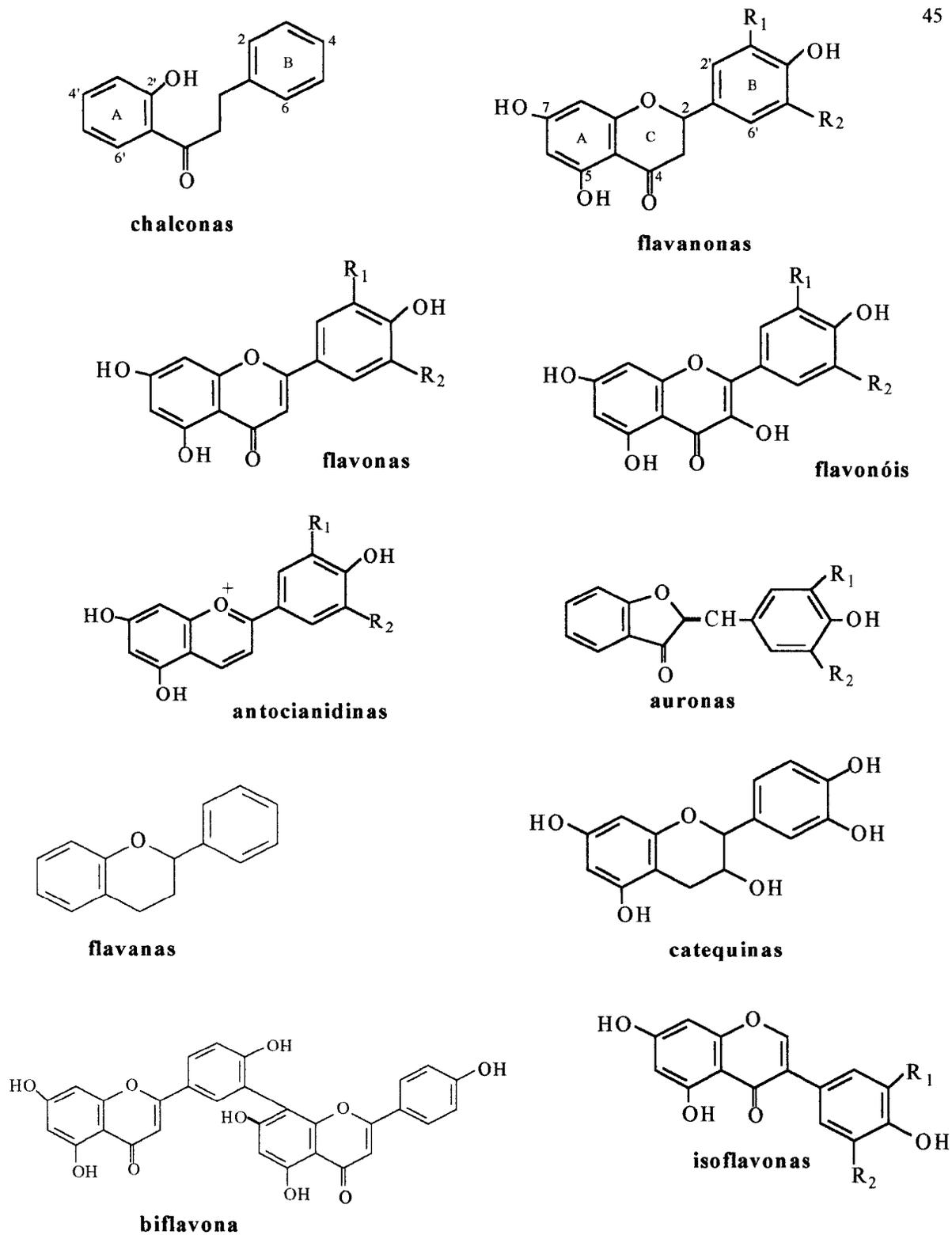
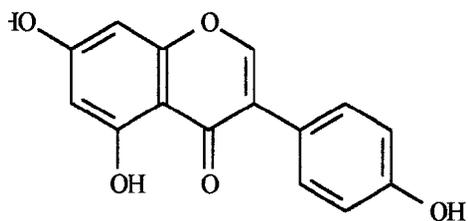


Figura 35. Estruturas básicas e substituições comuns de flavonóides (adaptado de Geissman & Crout, 1969; Stafford, 1990).

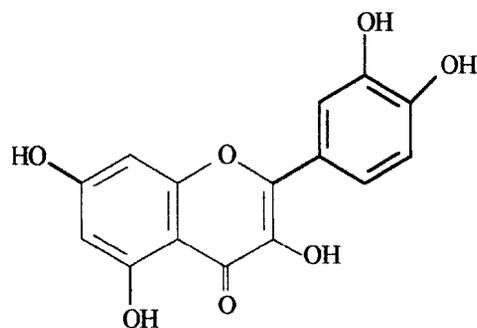
Foram atribuídas diferentes funções nas plantas a flavonóides, tais como: inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas e de pigmentos, moléculas sinalizadoras e proteção da ação à luz UV como decorrência da atividade antioxidante (Harbome *et al.*, 1975; Cody *et al.*, 1987; Joyeux *et al.*, 1995).

Os flavonóides têm ampla atividade farmacológica como:

- Inibição da liberação de histamina e inibição da adesão de plaquetas (Cody *et al.*, 1987; Dewick, 1998).
- Têm atividade anticarcinogênica e antimutagênica. A atividade anticarcinogênica foi demonstrada para alguns isoflavonóides, como a genisteína, Figura 36, e pode ser em parte devido à atividade estrogênica (Lamartiniere *et al.*, 1995).
- Ação como drogas antitumorais com atividade em tumores sólidos murinos e humanos tanto *in vitro* como *in vivo*. A genisteína, a quercetina, Figura 36, e outros flavonóides polihidroxilados revelaram-se ativos contra tumores murinos sólidos e ascíticos (Suolina *et al.*, 1975; Castillo *et al.*, 1989; Scambia *et al.*, 1990; Kandaswami *et al.*, 1992).



Genisteína



Quercetina

Figura 36. Estruturas da genisteína e da quercetina.

- O derivado flavonil(5→ α)acético na presença de HCl, Figura 37, revelou atividade *in vitro* nas células L1210 e *in vivo* contra vários tumores sólidos, como adenocarcinoma de mama e de cólon (Bibby *et al.*, 1991; Moilanen *et al.*, 1998).

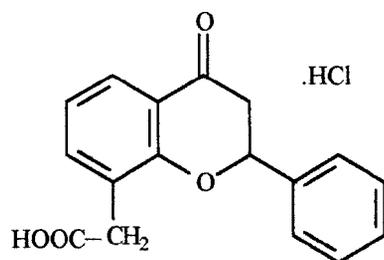
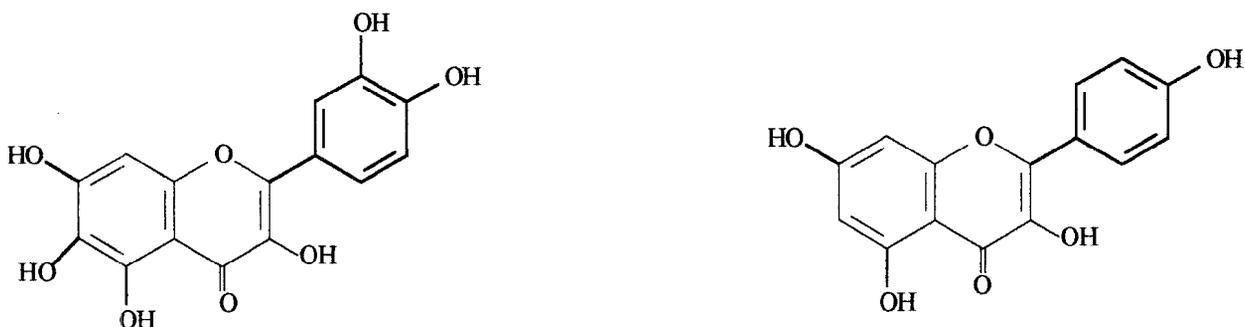


Figura 37. Estrutura da flavonil(5→ α)acético.

Também o derivado sintético de flavonóide, o ácido 5,6-dimetilxantenona, apresentou atividade contra tumores sólidos (Moilanen *et al.*, 1998).

Alguns flavonóides, entre os quais a quercetina (Figura 36), quercetagenina e o canferol (Figura 38) inibem a replicação do vírus, como o HIV-1 devido à inibir a atividade da HIV integrase (Fesen *et al*, 1994).



Quercetagenina

Canferol

Figura 1.38. Estrutura da quercetagenina e do canferol.

- A quercetina inibe o crescimento de células de câncer de ovário, possivelmente através da interação com sítios de ligação para o estrogênio nessas células (Scambia *et al.*, 1999).
- Biflavonóides como a amentoflavona, têm atividade protetora do fígado (Anand *et al.*, 1992).

1.2.6.2.2.1. Biflavonóides

O acoplamento oxidativo de duas unidades de flavonóides aparece na literatura como postulação biossintética dos biflavonóides. Os biflavonóides descritos na literatura encontram-se classificados em quatro grupos: biflavonas, flavanona-flavona, biflavanonas e

outros biflavonóides, como o dimero flavona-isoflavona (Stafford, 1990). Cerca de cento e trinta e quatro estruturas são conhecidas. A amentoflavona aparece com mais frequência nas plantas vasculares. Ocorre em Angiospermas e Gimnospermas, freqüentemente nas folhas e na parte aérea do caule. Atribue-se aos biflavonóides a função de resistência das plantas à invasão de microorganismos e a de repelir insetos (Harborne *et al.*, 1975; Stafford, 1990).

1.2.6.2.2.2. Mecanismo de ação

O grande número de atividades dos flavonóides sugere o envolvimento de vários alvos.

Poucos trabalhos descritos na literatura referem-se à interação direta de flavonóides com o DNA. Estudos da interação por RMN do 7-0-neohesperidosilcanferol com a sequência do promotor de DNA de *E. coli*, evidenciaram a formação de pontes de hidrogênio com o sulco menor do DNA (Nerdal *et al.*, 1993). A cisão mediada por Cu^{++} do DNA na presença do flavonóide epicatequina também foi observada (Chrissey *et al.*, 1988).

Os isoflavonóides (e.g. genisteína e biochanina A) e, flavonóides (e.g. tangeretina) suprimem o crescimento de células tumorais *in vitro* através da ativação de uma via de transdução de sinal, que produz a morte da célula por apoptose (Yanagyhara *et al.*, 1993; Hirano *et al.*, 1995).

Alguns flavonóides como a genisteína e a quercetina (Figura 36) são inibidores das DNA topoisomerases (Chen & Liu, 1994; Boege *et al.*, 1996; Capranico *et al.*, 1997).

Flavonóides, como o flavonil(5→ α)acético derivado da flavona (Figura 37), estimulam a atividade tumoricida de macrófagos residentes e ativados no peritônio de camundongos. Também aumentam a síntese de óxido nítrico e de certas citocinas *in vitro* e *in vivo*. A expressão de mRNA para o TNF e a síntese de TNF e de NO foi detectada em macrófagos e no baço de camundongos tratados com flavonil(5→ α)acético. Porém, na presença de inibidores da óxido nítrico sintase verificou-se que o NO não é um componente significativo no mecanismo antitumoral (Bibby *et al.*, 1991; Moilanen *et al.*, 1998).

Recentemente, um novo alvo para os flavonóides foi obtido após a inibição da polimerização da tubulina pelo derivado 3,6,4'-trimetoxi-5,7,3'-triidroxiflavona (Beutler *et al.*, 1998).

1.2.6.2.3. Terpenóides

1.2.6.2.3.1. Definição e função

Os terpenóides são produtos naturais encontrados amplamente em plantas, fungos, organismos marinhos e em feromônios de insetos. Cerca de vinte mil terpenóides já foram isolados. Estes bioprodutos são derivados de unidades do isopreno, unidade precursora com cinco carbonos, obedecendo ao que se chama "regra biogenética do isopreno". A unidade isoprênica é formada do ácido mevalônico oriunda do acetato (acetil coenzima A). Na formação dos terpenóides, as unidades de isopreno encadeam-se através de reação cabeça-cauda, sendo o número de unidades $(C_5)_n$ presentes no terpenóide usado para a classificação: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos

(C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), e tetraterpenos (C₄₀) (Geissman & Crout, 1969; Dewick, 1998).

Os terpenóides desempenham várias funções nas plantas tais como: fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, ferormônios, hormônios vegetais e moléculas de sinalização (Geissman & Crout, 1969; Dewick, 1998).

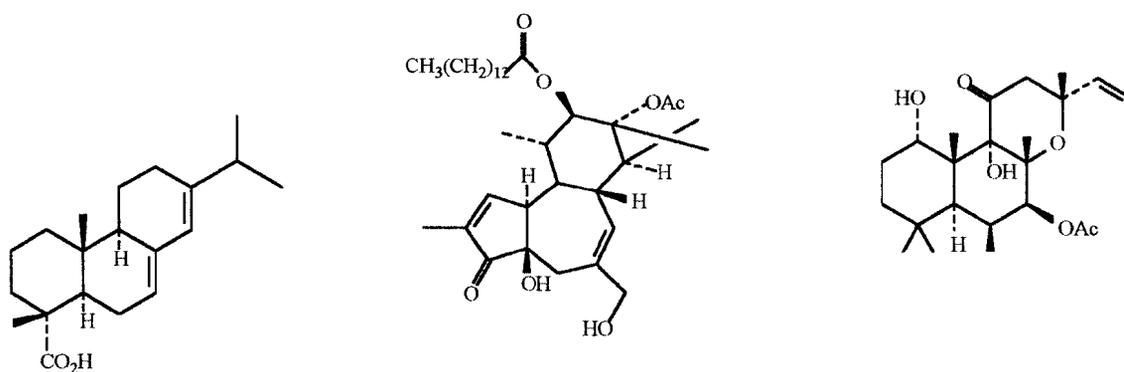
1.2.6.2.3.2. Biossíntese

De modo geral a biossíntese inicia-se com a participação de 3 moléculas de acetil coenzima A que após algumas etapas envolvendo NADPH e enzimas, leva à formação de ácido R-mevalônico. Após algumas etapas catalisadas por enzimas e na presença de ATP, ocorrem fosforilações, levando à formação de pirofosfato de isopentenila (IPP). O IPP forma pirofosfato de dimetilalila por ação de enzimas. A reação envolvendo dimetilalila e IPP produz o pirofosfato de geranila (C₁₀), o precursor de monoterpénóides. A seqüência enzimática converte o pirofosfato de geranila em pirofosfato de farnesila (C₁₅) e em pirofosfato de geranilgeranila (C₂₀), precursores de sesquiterpenóides e diterpenóides, respectivamente (Geissman & Crout, 1969; Dewick, 1998).

1.2.6.2.3.3. Diterpenos

Os diterpenos compreendem um grupo de compostos C₂₀ de diversos tipos, derivados do pirofosfato de geranilgeranila e reações subseqüentes. Os diterpenóides podem ser acíclicos ou cíclicos e ocorrem em diferentes estados de oxidação (Geissman & Crout, 1969; Dewick, 1998).

Os diterpenos respondem por diversas atividades biológicas, como os hormônios vegetais giberilinas que estimulam o crescimento de plantas. O ácido abiético, Figura 39, protege as plantas de infecções e ataques de insetos. No entanto, os ésteres de forbol, como o 13-O-acetil-12-O-miristilforbol, Figura 39, são capazes de provocar tumores devido a ativação da proteína cinase C, responsável pela fosforilação de várias proteínas. Outro diterpeno, a forskolina, Figura 39, ativa a adenilato ciclase, sendo usada em clínica contra a asma e miocardiopatias (Geissman & Crout, 1969; Robbers *et al.*, 1997; Dewick, 1998).



Ácido abiético

13-O-acetil-12-O-miristilforbol

forskolina

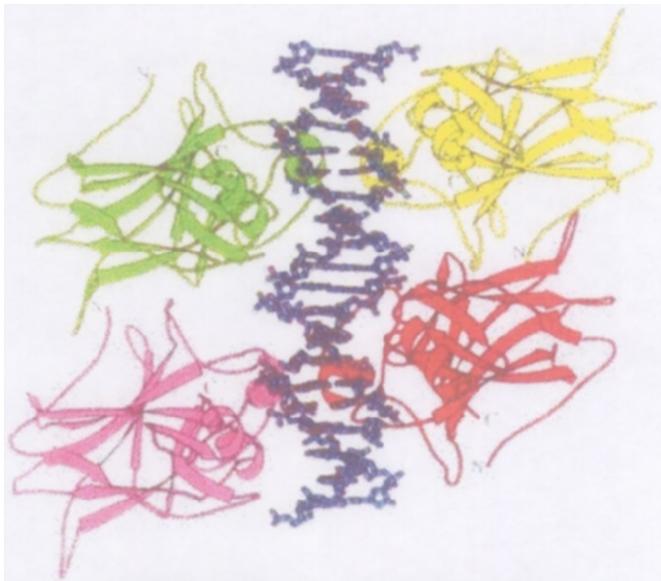
Figura 39. Estruturas do ácido abiético, do 13-O-acetil-12-O-miristilforbol e da forskolina.

O extrato obtido de folhas da *Ginkgo biloba* L., planta da família Ginkgoaceae, é usado para prevenção de doenças vasculares. Tal extrato é uma mistura complexa de componentes contendo lactonas diterpênicas e flavonóides. Estes diterpenos lactônicos, chamados ginkgolidos, inibem o fator ativador de plaquetas, o que leva a melhora na circulação do sangue (Geissman & Crout, 1969; Robbers *et al.*, 1997; Dewick, 1998). Um

dos componentes presentes é a biflavona amentoflavona, que pode atuar também como antioxidante (Pratt *et al.*, 1994; Joyeux *et al.*, 1995).

Outro diterpeno que tem atividade significativa contra tumores metastáticos de mama é o taxol (paclitaxel), Figura 14. O taxol foi identificado como o agente antineoplásico ativo obtido da casca do *Taxus brevifolia* por Wani *et al.*, em 1971. O análogo taxotere (Docetaxel), foi obtido, com maior solubilidade em água do que o taxol e com atividade antitumoral significativa (Goodman & Gilman, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Modelo do tetramero p53-DNA

CHO, Y., GORINA, S., JEFFREY, P. D., PAVLETICH, N. P. **Science**, v. 265, p.346-355, 1994.

1.3. Análise das interações com a matéria por espectroscopia

1.3.1. Estado excitado

Max Planck e Albert Einstein evidenciaram que a radiação eletromagnética têm propriedades ondulatória e corpuscular (Rao, 1967). Ela é propagada através do espaço, na forma de onda, obedecendo a relação $c = v\lambda$, onde:

v = frequência, c = velocidade de propagação da luz no vácuo e λ , = comprimento de onda da radiação. Ao mesmo tempo, a absorção ou emissão da radiação pela matéria ocorre como quantidades discretas de energia (fótons). A energia do fóton, E , pode ser calculada pela equação:

$E = hv = hc/\lambda$ (Equação 1) onde h = constante de Planck

A absorção da energia radiante nas regiões do espectro visível e ultravioleta depende primariamente do número e arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes (Rao, 1967). Os comprimentos de onda de absorção máxima de um composto fornecem um meio de identificar o cromóforo que ele contém. Em geral os espectros são modificados pela presença de vários grupos atômicos. Tais substituintes têm efeito em deslocar as bandas de absorção para comprimentos de onda mais longos (Suppan, 1994).

Quando a radiação eletromagnética na região do UV e do visível incide sobre a molécula contendo ligações múltiplas, ela sofre excitação por absorção de um fóton de energia suficiente para produzir uma transição do estado fundamental para um estado excitado. Uma porção da radiação é absorvida, que depende do λ da radiação e da estrutura do composto. A absorção da substância é devida a diferença de energia da radiação entre

os elétrons na orbital de menor energia e o de maior energia que pode ser calculada pela Equação 1. Moléculas de substâncias contendo ligações múltiplas conjugadas absorvem luz em maiores comprimentos de onda.

Quando uma molécula absorve luz, um elétron é excitado de seu orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) para o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO). Em geral, o HOMO corresponde a um orbital ligante π e o LUMO representa o primeiro orbital antiligante π^* . O λ de absorção máxima é determinado pela diferença de energia entre esses dois níveis. Assim, se a diferença de energia for grande entre os dois níveis energéticos HOMO e LUMO, a energia necessária para a transição eletrônica aparece em região de menor λ do que para outro composto em que a diferença entre esses dois níveis for menor. Quanto maior o número de ligações duplas conjugadas maior o λ da transição eletrônica. A diferença de energia do HOMO e LUMO é refletida em seu espectro de absorção. Compostos que têm ligação dupla como a carbonila C=O absorvem luz no UV, correspondendo à excitação dos elétrons não ligantes (n) do átomo de oxigênio, para o orbital π^* ($n \rightarrow \pi^*$), (Silverstein *et al.*, 1981; Streitwieser *et al.*, 1992).

1.3.2. Leis de Lambert-Beer

O tratamento quantitativo da absorção de energia radiante pela matéria depende da Lei de Lambert-Beer (Coxon & Halton, 1987; Streitwieser *et al.*, 1992). Incrementos sucessivos no número de moléculas de igual poder de absorção situadas no percurso de um feixe de radiação monocromática, absorvem iguais frações da energia radiante que os atravessa. Em termos de cálculo podemos escrever:

$\log I_t/I_o = A = \epsilon lc$, onde A = absorvância, I_t = intensidade da luz transmitida,

I_o = intensidade da luz incidente, ϵ = constante de proporcionalidade, constante de extinção ou ainda absorvividade (uma propriedade da substância), l = comprimento do percurso (em geral em cm), e c = concentração, pode ser em molaridade, ou em %, etc..

1.3.3. Interações com a matéria: Espectros atômicos

Uma molécula típica apresenta um estado fundamental denominado de singlete chamado S_0 , que representa sua condição normal não excitada. Quando a molécula absorve energia o processo é chamado **excitação**. A molécula passa do estado de energia mínima, estado fundamental, para um estado excitado de maior energia.

As regiões do infravermelho, visível e do ultravioleta, podem envolver excitação rotacional, vibracional ou de energia eletrônica. Com o diagrama de Jablonski, Figura 40, visualiza-se os diferentes níveis de energia da molécula. Podem existir duas séries de estados excitados, as séries singlete, S_1 , S_2 , S_n e as séries tripletos T_1 , T_2 , T_n . Um nível tripleto geralmente apresenta menos energia que o correspondente singlete. Essas duas séries se referem a uma diferença no spin eletrônico dos átomos em vários níveis. A cada nível eletrônico (S ou T) se associa uma série de subníveis vibracionais e de rotação dos átomos dentro da molécula. A energia total da molécula corresponde à soma de suas energias eletrônica, vibracional e rotacional (Barton, 1986; Streitwieser *et al.*, 1992).

Diagrama de Jablonski

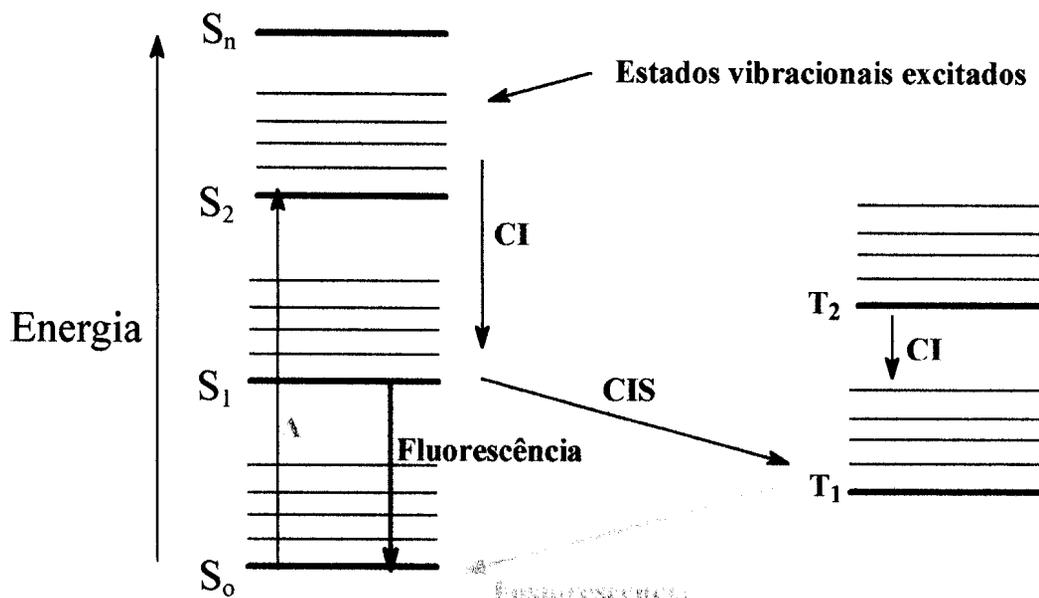


Figura 40. Ilustração das transições entre níveis de energia molecular durante a absorção da luz, fluorescência e fosforescência. A absorção de um fóton produz excitação (A) do estado fundamental (S_0) para um estado excitado (S_1 ou S_2). Do estado S_2 , S_1 pode ser rapidamente alcançado por conversão sem radiação (CI). A energia decai ao nível de energia vibracional mais baixo de S_1 por relaxamento vibracional. A fluorescência é produzida por transição radioativa entre estados do mesmo spin, por exemplo de S_1 para S_0 . Quando ocorre cruzamento intersistema (CIS) de S_1 para T_1 , pode-se ter a fosforescência que é a emissão por transição radioativa entre estados de spin de níveis de energia diferentes (T_1 para S_0). **S** = estado singleto, **T** = estado tripleto (adaptado de Skoog & Leary, 1992).

1.3.4. Espectroscopia de Fluorescência

A luminescência é um método ótico no qual as moléculas em análise são excitadas para dar um espectro de emissão de fótons, fenômeno que fornece informações sobre uma molécula em estudo.

Diferentes tipos de luminescência são conhecidos. De acordo com a causa da excitação e a natureza das transições eletrônicas envolvidas, pode-se observar a fluorescência e a fosforescência (Barton *et al.*, 1986; Suppan, 1994). A fluorescência é uma propriedade das substâncias, de modo que quando irradiadas com luz de comprimento de onda curto uma parte da luz é absorvida e outra parte da energia da luz absorvida é irradiada como luz, em geral de comprimento de onda mais longo (Figura 40). A luz incidente é descrita como luz de excitação, enquanto que a fluorescência é também chamada luz emitida. Muitos compostos orgânicos quando irradiados com luz ultravioleta, apresentam fluorescência no espectro visível.

Como visto na Figura 40, a fluorescência difere da fosforescência porque a transição de energia eletrônica responsável pela fluorescência não envolve uma alteração no spin do elétron, por exemplo de S_1 para S_0 tendo tempo de vida curta ($< 10^{-5}$ s). Em contraste na fosforescência ocorre alteração no spin do elétron, por exemplo de T_1 para S_0 , antes de emitir a radiação tendo tempo de vida de vários segundos ou mais. O final do espectro de emissão de fluorescência de comprimento de onda menor normalmente se superpõe ao final de comprimento de onda maior do espectro de absorção que origina a excitação. Sendo assim na fluorescência o espectro de excitação é a imagem especular do espectro de emissão como se verifica na Figura 41.

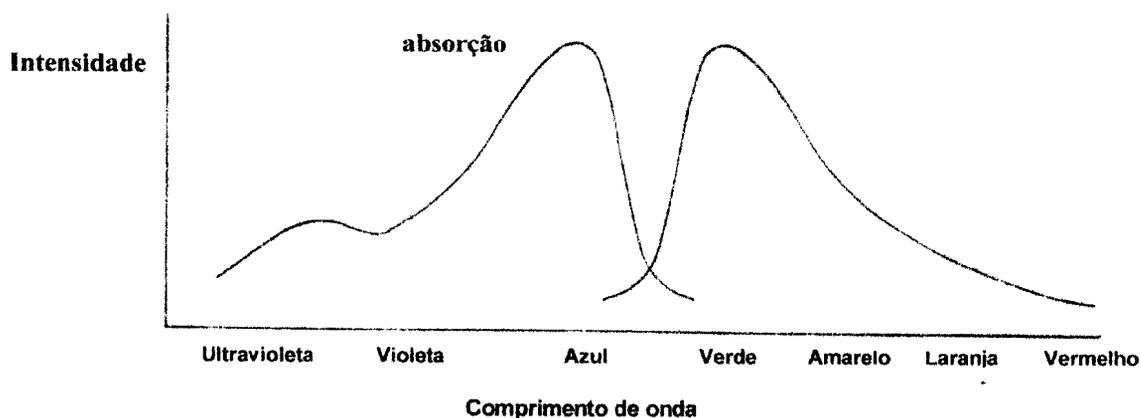


Figura 41. Espectros de absorção e de fluorescência (adaptado de Rost, 1992).

O mecanismo do processo de absorção-emissão foi descrita por Stokes, em 1852. O deslocamento de Stokes é definido como a diferença entre o máximo da luminescência em relação ao do espectro de absorção relacionado (Figura 41). Esse deslocamento varia quando a geometria da molécula é diferente entre o estado fundamental e o estado excitado. Por exemplo, esse deslocamento aumenta com a polaridade do solvente quando o estado excitado tem um momento dipolar relativamente alto (Suppan, 1994).

1.3.4.1. Estrutura e fluorescência

A fluorescência da molécula é dependente de sua estrutura e do meio onde se encontra, sendo influenciada pelo pH, força iônica, temperatura, viscosidade ou rigidez do meio e ligação á macromoléculas. Muitas moléculas orgânicas e algumas inorgânicas são

fluorescentes. Os compostos orgânicos possuindo estrutura planar, rígida e contendo sistema conjugado (elétrons π ligados mais fracamente do que os elétrons σ) revelam transições eletrônicas de elétrons π ligantes para antiligantes π^* através de absorção de energia (fóton). A maioria dos compostos orgânicos fluorescentes são carboaromáticos ou heteroaromáticos. Em solução, a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não substituídos têm fluorescência forte na faixa ultravioleta ou visível (Skoog & Leary, 1992; Suppan, 1994).

Para caracterizar a emissão fotoexcitada de moléculas em um sistema complexo, determina-se a distribuição espectral, o rendimento de fótons, tempo de vida do estado excitado e a polarização da emissão de fluorescência como função do comprimento de onda de excitação. As técnicas surgiram em 1920, na época em que a teoria quântica revelou a origem da emissão da fluorescência e deu a primeira explicação das características da emissão de luz. O rendimento quântico é a relação entre os quanta absorvidos e as moléculas dos produtos fotoquímicos (Coxon & Halton, 1987; Skoog & Leary, 1992).

1.3.4.1.1. Efeito da concentração na intensidade da fluorescência

A intensidade da radiação fluorescente (F) é proporcional à intensidade da radiação excitante que é absorvida pelo sistema,

$$F = K'(P_0 - P),$$

Onde P_0 = intensidade da radiação incidente na solução e P = intensidade após atravessar o meio. A constante K' depende da eficiência quântica do processo fluorescente. Para

relacionar F com a concentração c da partícula fluorescente, usa-se a lei de Lambert-Beer na forma:

$P = P_0 \times 10^{-\epsilon c}$, onde ϵ = extinção molar da molécula fluorescente e indica a probabilidade da transição.

Assim, um gráfico de F de uma solução contra a concentração da espécie que emite deve ser linear em concentração baixa, obtendo-se o valor de K (Suppan, 1994).

1.3.4.1.2. Fatores que afetam a fluorescência

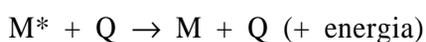
1.3.4.1.2.1. pH e temperatura

Os compostos fluorescentes revelam dependência do pH de uma solução sendo muitas vezes acentuada e requerem procedimentos geralmente cuidadosos de tamponamento. A quantidade de fluorescência é dependente também da temperatura.

1.3.4.1.2.2. Supressão

A fluorescência pode ser afetada por fatores físicos e químicos. A absorção parcial da luz fluorescente pode ser afetada por algum componente presente na solução. A supressão pode ser efetuada por transferência de energia através da colisão de moléculas excitadas da substância fluorescente com moléculas do solvente ou de outros solutos, resultando em mecanismos paralelos não radiantes para voltar ao estado fundamental.

Processo geral:



Onde: molécula excitada M^* por molécula Q (o supressor).

Assim, observa-se vários tipos de supressão: transferência de energia, transferência de elétron, paramagnética, concentração, efeito do átomo pesado, estática e dinâmica.

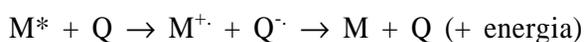
1.3.4.1.2.3. Transferência de energia

Se a molécula supressora Q tem um estado excitado Q^* menor do que M^* a energia de excitação pode ser transferida de acordo com $M^* + Q \rightarrow M + Q^*$.

Desativação radioativa ou não radioativa de Q^* para Q completa o processo de supressão.

1.3.4.1.2.4. Supressão por transferência de elétrons

Em uma reação de transferência de elétrons entre duas moléculas neutras por exemplo que podem formar um par iônico, se uma das moléculas neutras excitada é desativada, o processo surge como supressão se o par iônico recombina para voltar ao estado fundamental neutro:

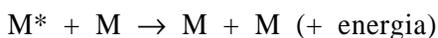


1.3.4.1.2.5. Supressão paramagnética

Campos magnéticos externos provenientes da substância podem aumentar o acoplamento spin-órbita. Assim, o oxigênio molecular 3O_2 é uma espécie paramagnética com estado fundamental tripleto e é o supressor paramagnético mais conhecido.

1.3.4.1.2.6. Supressão por concentração

Foi observado que em muitos casos, o rendimento quântico de luminescência obtido em solução diminui quando a concentração do soluto aumenta. O processo pode ser representado:



A molécula M no estado fundamental se comporta como supressor para a molécula excitada M*. O mecanismo da supressão por efeito da concentração ainda não foi esclarecido.

1.3.4.1.2.7. Efeito de átomo pesado

O efeito de átomo pesado ocorre quando um átomo de peso atômico elevado encontra-se diretamente ligado à molécula com propriedades luminescentes, produzindo efeito interno ou no seu ambiente.

1.3.4.1.2.8. Supressão estática e dinâmica

Sendo a supressão um processo bimolecular, as moléculas M* e Q devem manter um contato próximo, mas não necessariamente pelas forças de van der Waals (Suppan, 1994). Um dos modelos teóricos adotado para caracterizar a supressão aparece no gráfico de Stern-Volmer: as moléculas M* e Q podem entrar em contato através do movimento de difusão ao acaso. O rendimento quântico de luminescência é previsto pela equação de Stern-Volmer (Sen & Maiti, 1994; Suppan, 1994):

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q],$$

I_0 e I são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, K_{sv} = constante de supressão de Stern-Volmer e $[Q]$ = concentração do supressor.

O gráfico de Stern-Volmer deve ter uma interseção no eixo de y no valor unitário quando a concentração do supressor é zero. Quando o gráfico não é linear, o mecanismo da supressão é mais complexo.

1.4. Interação de drogas com os ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos interagem com outras moléculas. A transcrição e a tradução do DNA requer sistemas enzimáticos para a leitura da informação genética (Alberts *et al.*, 1994). O controle genético também ocorre através de substâncias que se ligam a regiões específicas da molécula do DNA. Por exemplo, a regulação da transcrição é mediada em parte pela atividade promotora de proteínas que se ligam a sítios específicos no DNA (Lodish *et al.*, 1995). A afinidade dessa interação pode ser medida pela constante de equilíbrio da reação (Pommier *et al.*, 1987; Carpenter & Kneale, 1994). A maioria das drogas usadas em câncer interagem com o DNA, alterando a sua estrutura e função. O estudo da interação de DNA com ligantes é um dos meios promissores para caracterizar drogas sintéticas e naturais com melhor especificidade e seletividade de ação (Bloomfield *et al.*, 1974).

Essa interação pode ocorrer de várias maneiras:

- a) Os grupos fosfato no DNA com carga negativa podem interagir eletrostaticamente com íons positivos e dipolos. Esta maneira de ligação não é seletiva.
- b) Por intercalação clássica. Os trabalhos pioneiros de Michaelis, em 1947, revelaram a ligação de corantes no DNA com possível atividade quimioterápica. O processo de intercalação no DNA foi inicialmente estabelecido para as fenantridinas, por Peacocke e Skherrett, e para as aminoacridinas, por Lerman na década de 60. O comportamento desses ligantes é considerado clássico (Waring, 1970; Waring, 1981). O modelo proposto para a intercalação considera as seguintes características:
 - i. O sistema planar da unidade aromática policíclica da droga deve se empilhar entre os pares de bases púricas e pirimídicas, onde podem estar envolvidas ligações hidrogênio,

transferência de carga e forças de van der Waals. Portanto, o plano do cromóforo aromático deve ser paralelo ao dos pares de base (mais ou menos perpendicular ao eixo da hélice). Ocorre então alteração no ângulo de rotação da hélice do DNA. O esquema proposto para a intercalação da droga proflavina com o DNA está representado na Figura 42 (Waring, 1968).

ii. Drogas intercalantes têm demandas estéticas e eletrônicas. A estabilização adicional vem da interação eletrostática forte entre os grupos do ligante com carga positiva e os grupos fosfato com carga negativa do DNA.

c) Ocorre especificidade, em geral, para ligação a seqüências ricas em guanina-citosina no DNA, que favorece a coplanaridade na interação ligante-DNA (Waring, 1981).

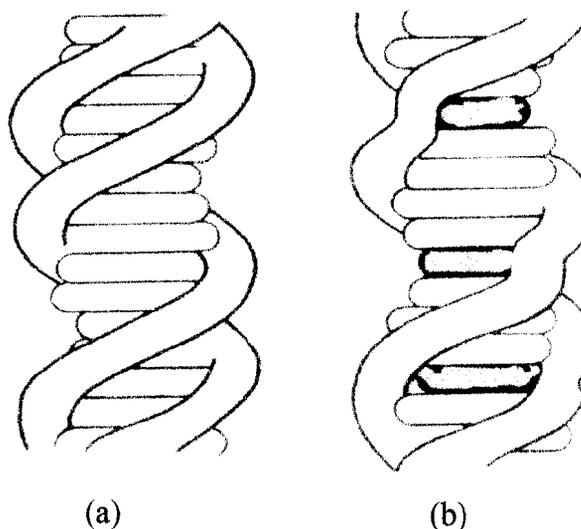


Figura 42. Modelo da estrutura do DNA normal (a) e o DNA contendo moléculas de proflavina intercaladas (b), adaptado de Waring, 1968.

1.4.1. Técnicas para verificar a intercalação

O critério mais aceito para caracterizar a intercalação do DNA com drogas (LePecq & Paoletti, 1967; Bloomfield *et al.*, 1974; Waring, 1981; Nandi & Maiti, 1985; Barton *et al.*, 1986; Nandi *et al.*, 1990; Nandí *et al.*, 1991), tem por base a utilização de técnicas diretas que medem os parâmetros:

- a) A medida do comprimento do DNA na presença e na ausência de drogas por autoradiografia, microscopia eletrônica e difração de raios-X.
- b) Medida do efeito no estado superhelicoidal do DNA após a ligação da droga no DNA circular; a quantidade de droga intercalante ligada altera o estado superhelicoidal. Pode ser observado por medidas do coeficiente de sedimentação, por viscosidade e por mobilidade em gel.
- c) Características físico-químicas, como a medida da constante de ligação de ácidos nucléicos e ligantes. Essa constante de ligação pode ser obtida através de espectrometria no UV e por fluorescência.

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas óticas usadas para estudar biomoléculas com tempo de vida longo no excitado, envolvendo período de vida suficiente para que uma variedade de interações químicas e físicas possam acontecer antes da emissão. O tempo de vida depende de orientação do solvente, formação de complexo e transferencia de prótons e de energia do estado excitado de um cromóforo para outro (Urano *et al.*, 1991; Kumar & Asuncion, 1993; Sen & Maiti, 1994).

Para as análises de absorção no UV e por fluorescência pode-se aplicar a equação e o gráfico de Scatchard (Scatchard, 1949) para calcular a constante intrínseca de ligação K , que é usada na medida da eficiência de ligação de substâncias que estão sendo investigadas

e o DNA (Scatchard, 1949; Bloomfield *et al.*, 1974; Nandi *et al.*, 1990). Para a análise da eficiência de ligação do ligante com o DNA por fluorescência pode-se também aplicar a equação e o gráfico de Stern-Volmer para calcular a constante de supressão de Stern-Volmer, K_{sv} (Scatchard, 1949; Nandi *et al.*, 1990; Sen & Maiti, 1994).

1.5. Morte celular

A homeostasia celular é regulada por um balanço envolvendo a proliferação, parada de crescimento e morte celular. No estudo das neoplasias deve-se incluir o conceito de morte celular. Ocorrem duas formas diferentes de morte celular, a apoptose e a necrose. A apoptose, a morte celular programada, ocorre por estímulos fisiológicos mas, também, pode depender de outros estímulos (Wyllie *et al.*, 1980; Hall & Lane, 1994; Ramachandra & Studzinski, 1995; Wyllie, 1997). Na Figura 43 está apresentado um diagrama com as diferenças ultra-estruturais seqüenciais na apoptose e na necrose.

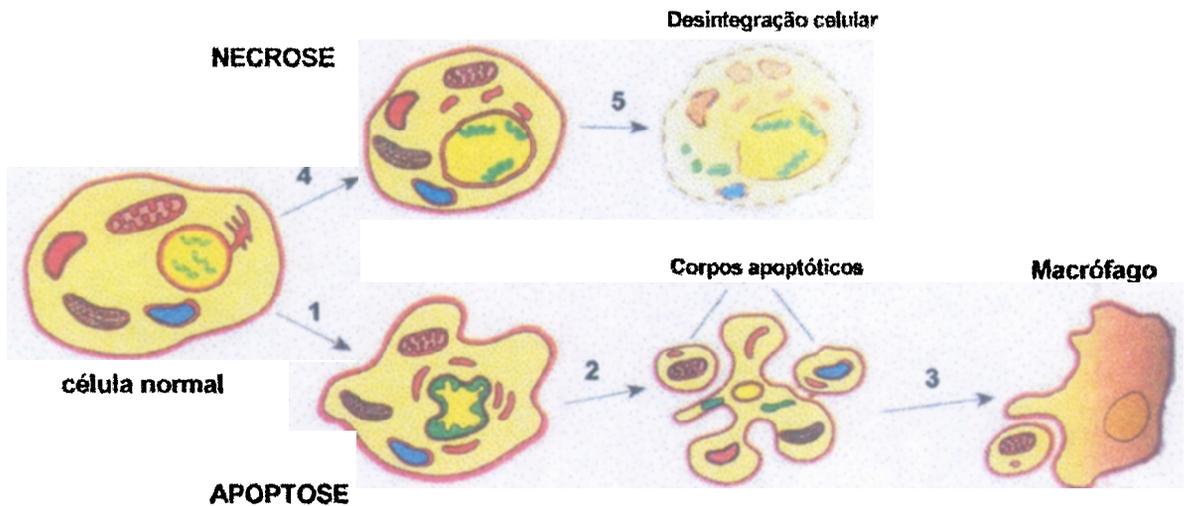


Figura 43. Diagrama ilustrando as alterações ultra-estruturais seqüenciais na apoptose e na necrose. Uma célula normal é mostrada na figura à esquerda. O início da apoptose ocorre pela compactação da cromatina, etapa 1, fragmentação nuclear e formação de protuberâncias e corpos apoptóticos, etapa 2, que são fagocitados, etapa 3. Os sinais de necrose incluem aglomeração da cromatina em massas mal definidas, tumefação das organelas, etapa 4 e, posteriormente, dano à membrana, etapa 5 (adaptado de Atlas, 1996).

1.5.1. Necrose

A necrose depende de uma série de alterações morfológicas tanto nucleares como no citossol, que se seguem à morte celular em um tecido vivo, resultante, em grande parte, da ação degradativa de enzimas sobre a célula lesada (Figura 43). O conteúdo celular é liberado no fluido extracelular, produzindo um efeito irritante nas células vizinhas com inflamação (Cotran *et al.*, 1994).

1.5.2. Apoptose

Muitas vezes, o termo apoptose é usado como sinônimo de morte celular programada (Wyllie, 1997). Kerr *et al.*, em 1972, propuseram o nome de apoptose para descrever a estrutura celular onde as massas nucleares tinham a cromatina condensada e as organelas não alteradas. A apoptose é um processo dependente de energia levando a morte celular que é definida por alterações morfológicas responsáveis pela condensação da cromatina e formação de vesículas no citoplasma digeridas por fagócitos profissionais, como os macrófagos, que atuam durante o desenvolvimento e crescimento de tecidos normais, produzindo pouca inflamação. Alterações bioquímicas envolvendo a apoptose incluem: alterações na membrana da célula com o aparecimento de fosfatidilserina na superfície exterior e expressam marcadores que podem ser açúcares que as fazem ser identificadas por macrófagos; ocorre modificações nucleares, como a quebra endonucleotídica da cromatina que produz fragmentos grandes de DNA, variando de 50 a 300 kb, dando origem posteriormente a fragmentos menores de oligonucleossomos com cerca de 180 pares de bases nucleotídicas (DeVita *et al.*, 1997; Wyllie, 1997; Leist & Nicotera, 1998).

A apoptose pode ocorrer para a deleção de células no desenvolvimento normal, organogênese, funcionamento imune e crescimento do tecido. E pode ser desencadeada por retirada de fatores de crescimento, mas também pode ser induzida por estímulos patológicos como adição de compostos xenobióticos por exemplo, drogas e por radiação γ (Cotran *et al.*, 1994; Ramachandra & Studzinski, 1995; Illidge, 1998).

1.5.3. Critérios para distinguir apoptose e necrose

A apoptose e a necrose podem ser diferenciadas por critérios morfológicos e/ou bioquímicos. A morfologia, por microscopia ótica ou eletrônica, é ainda um critério muito usado quando se examina tecidos e a condensação do núcleo é fácil de se visualizar. O método clássico em bioquímica para se visualizar a apoptose nas células é a presença de fragmentos oligonucleossômicos de DNA, que podem ser observados por eletroforese em gel de agarose mostrando padrão característico em escada do fragmento de DNA ("DNA ladder"), enquanto que a necrose mostra o DNA com aspecto difuso. As observações de que o DNA mitocondrial está intacto nos estágios iniciais da apoptose fornecem uma base para quantificar a apoptose por este método. O aumento da permeabilidade da membrana das células em processo de apoptose podem ser demonstradas por corantes, como azul de tripan porém, é inespecífico (Cotran *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997; Wyllie, 1997). Na Tabela 1 estão apresentados os critérios mais utilizados para distinguir apoptose de necrose.

Tabela 1. Algumas características da apoptose e da necrose (adaptado de Cotran *et al.*, 1994).

Características	Apoptose	Necrose
Estímulo	Fisiológicos e patológicos	Hipoxia e toxinas
Histologia	Células isoladas Condensação da cromatina Corpos apoptóticos	Tumefação celular Rompimento de organelas
Mecanismos de degradação do DNA	Quebra internucleossomal com formação de corpos apoptóticos Ativação gênica Endonuclease	Aleatórios, depleção difusa de ATP Lesão da membrana Dano por radicais livres
Cromatina nuclear	Compactação com massas densas	Aglomeração da cromatina em massas mal definidas
Reação do tecido	Sem inflamação Fagocitose de corpos apoptóticos	Inflamação

1.5.4. Mecanismo e regulação da apoptose

O processo da morte celular na apoptose aparece como resultado da interação entre um estímulo iniciador, que pode ser uma consequência fisiológica ou o resultado de injúria que afeta a célula e ocorrem antes da perda da integridade celular, e fatores que determinam a

suscetibilidade da célula à ativação dos eventos celulares finais, já observando-se a morfologia característica da apoptose (Wyllie, 1997).

Os mecanismos e fatores conhecidos incluem (Figura 44):

- A ativação de proteases dependentes da concentração de cálcio como a calpaina também podem degradar o citoesqueleto celular (Cotran *et al.*, 1994).
- Existem várias endonucleases, como as estimuladas pelo aumento do cálcio citossólico, que causam a fragmentação do DNA; as dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, as ativadas só por Mg^{2+} que induzem apoptose em células tratadas por drogas, as ciclofilinas e as desoxirribonucleases (Yoshida *et al.*, 1998).
- A ativação de transglutaminase, que parcialmente contribui para as alterações da forma e do volume; fagocitose mediada por receptores nos corpos apoptóticos (Cotran *et al.*, 1994).

O mecanismo de ativação da apoptose é complexo e controlado por genes mediadores, que podem estimular ou inibir o processo. Em alguns casos a transcrição gênica e a síntese de proteínas são necessárias para a indução da apoptose (Kaufman, 1989; Wyllie, 1997).

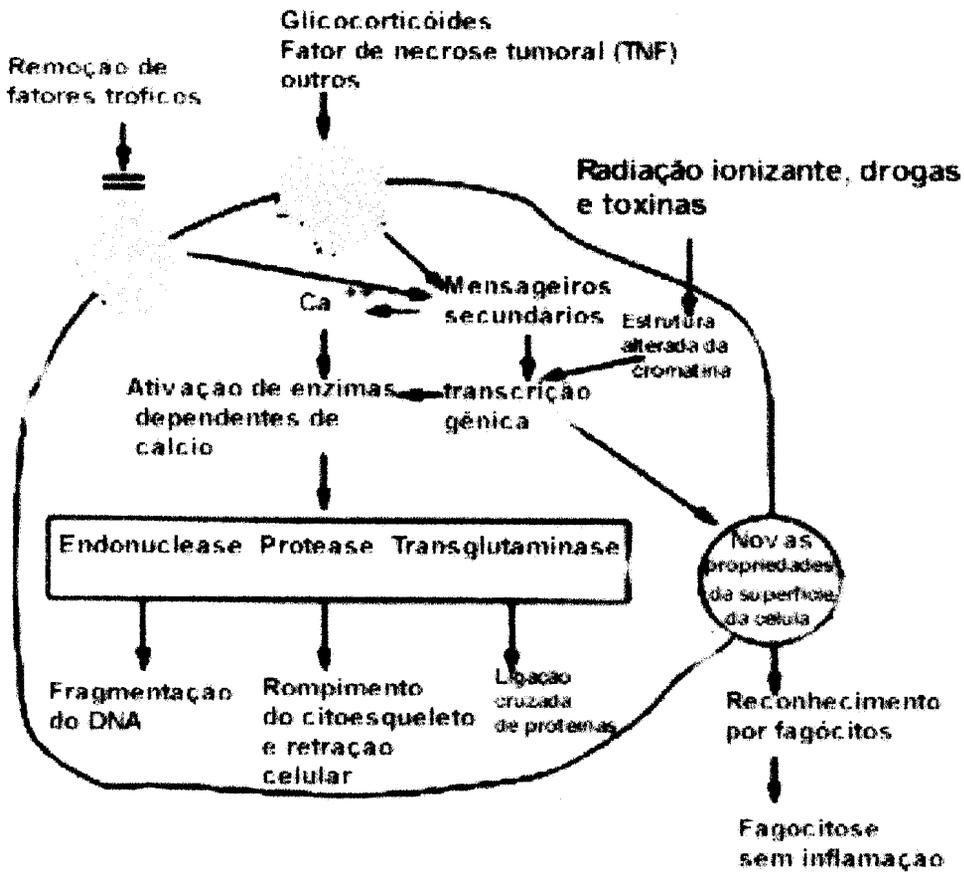


Figura 44. Eventos associados com a apoptose (adaptado de Cotran *et al.*, 1994).

Um dos mecanismos existentes no organismo vivo contra a transformação maligna é a eliminação de células defeituosas por apoptose. Este mecanismo aparece induzido nas células quando o DNA está danificado. A maior parte das células contém proteínas reguladoras e outros fatores que podem inibir ou ativar a apoptose, como se verifica na Figura 44. O gene *p53* normal pode induzir a apoptose enquanto que o gene *bcl-2* inibe a apoptose. Quando as células T ativadas matam outras células, ocorre a ativação da apoptose na direção de seus alvos. Muitos cânceres humanos têm mutação em seus genes que controlam o ciclo celular como *p53*, *Rb*, *mdm2*, e outros (DeVita *et al.*, 1997; Lane & Hall, 1997).

As radiações ionizantes, drogas citotóxicas, cálcio, gene *p53* normal, sinais de crescimento celular, infecção viral e a morte celular por linfócitos citotóxicos aparecem entre os processos que ativam a apoptose. Entre os processos que inibem a apoptose temos: a retirada de fatores de crescimento, inibidores de proteases, baculovírus 35 e o gene *bcl-2* (Cotran *et al.*, 1994; DeVita *et al.*, 1997; Wyllie, 1997; Leist & Nicotera, 1998). Um resumo desses processos está apresentado nas Figuras 44 e 45.

Os genes específicos que estimulam (*ced 3,4*) ou inibem a apoptose (*ced-9*) foram identificados no desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Genes homólogos ocorrem nos mamíferos, como o gene *bcl-2* que é homólogo do *ced-9* (Alberts *et al.*, 1994; Cotran *et al.*, 1994; Wyllie, 1997). Desde o reconhecimento da semelhança entre a proteína *ced-3* envolvida na apoptose no *C. elegans* e proteases contendo cisteína em mamíferos como a protease ICE ("Interleukin 1- β converting enzyme"), foram encontradas pelo menos dez proteases com cisteína. Essas enzimas têm especificidade para o ácido aspártico e são chamadas caspases (semelhantes a ICE), sendo sintetizadas como pró-enzimas e encontradas no citoplasma (DeVita *et al.*, 1997). As caspases são mediadores das etapas finais da apoptose (Figura 45). O processo de ativação de caspases durante a apoptose resulta na quebra de substratos, como a poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), as proteínas lâminas envolvidas na integridade do envelope nuclear, as proteínas actina e fodrina que participam na organização do citoesqueleto e a proteína do ciclo celular retinoblastoma (Rb). Assim, tais biotransformações geram modificações na morfologia característica da apoptose. Os sinais adequados como fator de necrose de tumor e CD 95 (fas/APO-1), após se ligarem aos receptores na célula, promovem a morte celular através da

ativação de várias caspases. A supressão da apoptose, protegendo a célula da morte, é realizada pela ação do gene *ced-9* no nematódeo e, nos mamíferos a molécula homóloga é o gene *bcl-2* (Cohen, 1997; Wyllie, 1997; Cory, 1998). Algumas proteínas, relacionadas ao gene *bcl-2* inibem a apoptose (*bcl-X_L*) enquanto que outras, induzem a apoptose (*bax* e *bcl-X_s*), (DeVita *et al.*, 1997). Outras proteases diferentes das caspases podem estar envolvidas na morte celular (Kaufman, 1989; Hirano *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1998).

Embora nos últimos anos tenha ocorrido progresso para a elucidação da ativação da apoptose pelas caspases, os mecanismos da ativação por endonucleases são pouco conhecidos (Yoshida *et al.*, 1998).

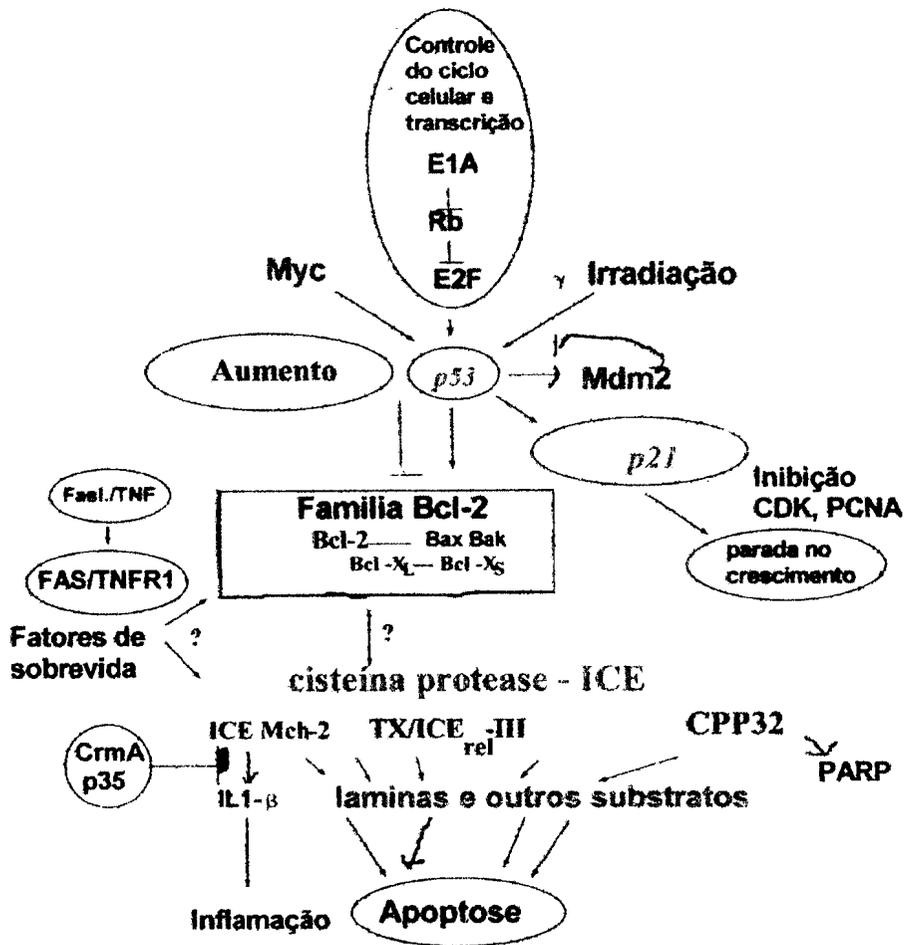


Figura 45. Regulação da apoptose (adaptado de DeVita *et al.*, 1997; Thornberry, 1997).

CDK – ciclinas cinases; Cpp32 =caspase 3;

CrmA= proteína viral que inibe a apoptose; Fas = produto do gene *fas*;

E1A = proteína do adenovírus; E2F = fatores de transcrição;

ICE = protease ICE (“Interleukin 1-β converting enzyme”); ICE_{rel-II} = caspase-5;

IL1-β = interleucina-β; Mch2 = caspase 6; Mdm2 = produto do gene *mdm2*;

Myc = gene *myc*; PARP = poli(ADP-ribose) polimerase;

p35 = proteína do baculovírus 35, inibe a apoptose;

PCNA = antígeno nuclear da célula proliferante; Rb – retinoblastoma;

TNFR = receptor de fator de necrose de tumor; TX = caspase 4.

1.6. Gene supressor de tumor *p53*

O estudo de genes supressores de tumor iniciou-se com a descoberta do gene do retinoblastoma *Rb* e, posteriormente, com a descrição da proteína supressora de tumor *p53*, que se ligava ao antígeno T do vírus SV40 em 1979 (Mowat, 1998). Desde então outros genes supressores de tumor foram encontrados como *APC*, *NF1*, *WT-1*. No entanto, os genes *Rb* e *p53* são os supressores que influenciam diretamente a progressão do ciclo celular em determinada fase. Só nos últimos anos evidenciou-se que o gene normal *p53* é um regulador negativo ou supressor de tumor (Lane, 1994). Quase 50 % dos cânceres humanos contém mutação no gene *p53*, incluindo cânceres de mama, cólon, pulmão, fígado, próstata, baço e pele (Harris, 1993). Estes cânceres são mais agressivos e consequentemente mais aptos no bioprocessamento de metástases. A proteína *p53* com mutação é um mau prognóstico em câncer de pulmão e mama. A maioria das mutações está localizada nas regiões da porção central do gene *p53*, que codifica para o domínio de ligação no DNA (exons 5 a 9) correspondendo às regiões II, III, IV e V da proteína, como resumido na Figura 46 (Harris, 1993; Ozbun & Butel, 1995)

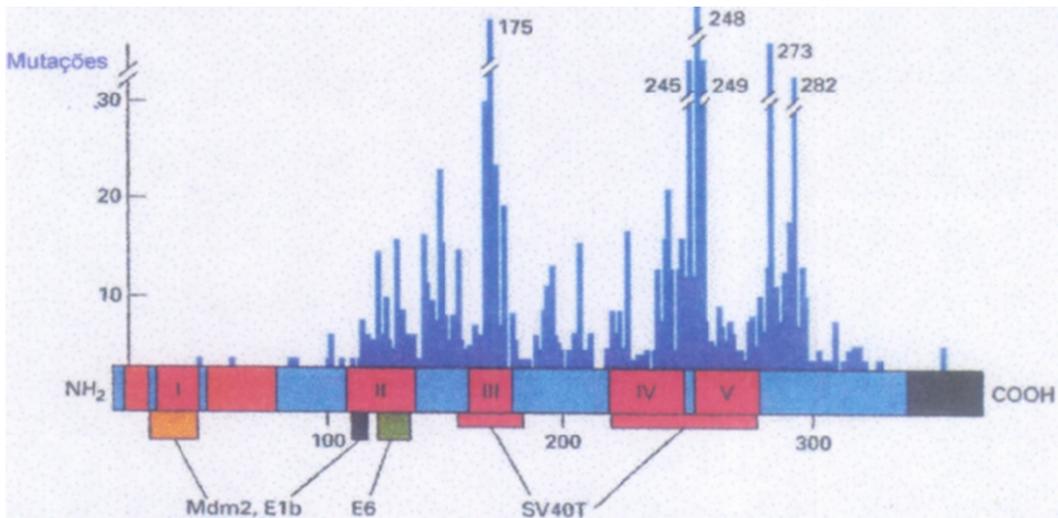


Figura 46. Mutações em tumores humanos que inativam a função da proteína p53 (adaptado de Harris, 1993).

Mdm2 = Proteína mdm2; E1b = proteína do adenovírus; E6 = proteína do vírus do papiloma; SV40T = proteína do vírus SV40. As barras indicam as bases que sofreram mutações (n=1361) nos códons 175, 245, 248, 249, 273 e 282.

1.6.1. Gene *p53*- Aspectos estruturais e função

O gene humano *p53* compreende 20 kb do DNA do genoma e encontra-se localizado no cromossomo 17 p13.1. O gene de camundongo está no cromossomo 11. Os genes de camundongos e humanos têm 11 exons semelhantes, ocorrendo diferenças significativas em 10 íntrons (Figura 47). O primeiro exon aparece como não codificante em todas as espécies. Encontra-se o mRNA *p53* em grande quantidade em tumores murinos. A expressão do mRNA parece estar correlacionado com o estado proliferativo da célula. Na glândula mamária de camundongos, os níveis de mRNA do *p53* são altos durante a gestação (Donehower & Bradley, 1993; Selivanova & Wiman, 1995).

O mutante *p53* age como oncogene dominante e coopera com o oncogene *ras* para transformar células primárias. Além disso, a inserção de retrovírus inativa o gene *p53* em eritroleucemias de camundongo, significando que a perda do gene normal *p53* pode contribuir para a formação de tumor (Selivanova & Wiman, 1995).

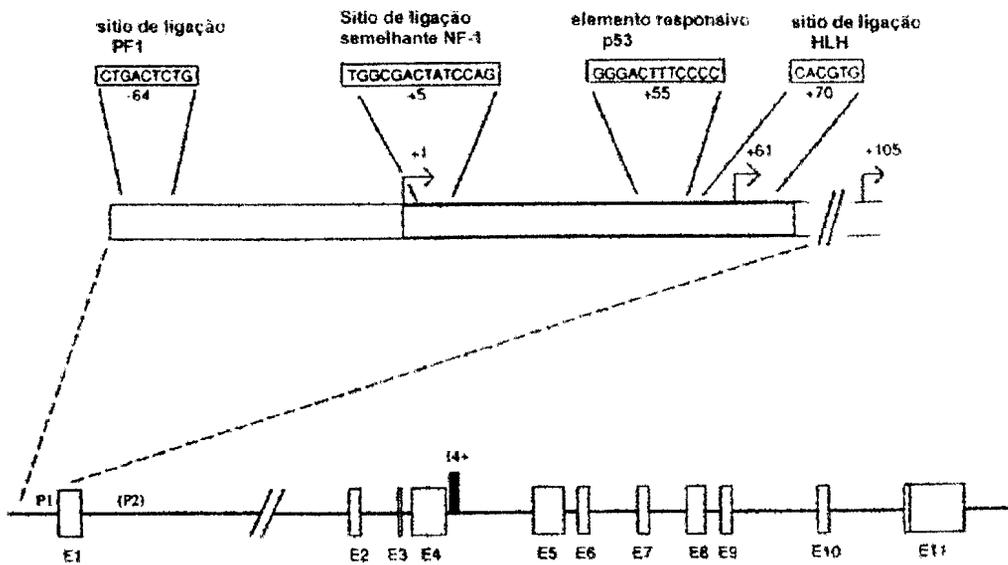


Figura 47. Gene supressor *p53* com os exons de 1 a 11 (adaptado de Donehower & Bradley, 1993).

1.6.2. Proteína p53

1.6.2.1. Estrutura

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos em humanos e 390 aminoácidos em camundongo. A homologia da seqüência de nucleotídeos no gene que especifica esses aminoácidos revela 81%. A seqüência do p53 é conservada nos vertebrados, mas não foram encontrados homólogos desta proteína nos organismos eucarióticos inferiores (Donehower & Bradley, 1993; Ozbun & Butel, 1995).

A proteína p53 age como um tetramero ou oligômero de ordem maior. Essa proteína se liga numa seqüência específica do DNA, bioadministra a transcrição de vários genes e fornece produtos protéicos capazes de regular o ciclo celular e a apoptose. A ocorrência de mutação na célula em um só alelo da proteína pode afetar toda a atividade do p53.

A comparação das seqüências de aminoácidos do p53 humano, camundongo e outros animais revelou cinco domínios conservados da proteína denominados I, II, III, IV e V (Figuras 46 e 48). Nos domínios de II a V ocorrem o maior número de mutações nos seres humanos. Com base na carga, a proteína é subdividia em regiões:

- uma região amino terminal (aminoácidos 1-75), que é ácida, interage com a maquinaria da transcrição e serve como alvo de proteínas celulares. É onde se encontra o domínio de transativação.
- uma região hidrofóbica rica em prolina (aminoácidos 75-150) e uma região central (aminoácidos 150-300) onde se encontra a região de ligação específica ao DNA. A maioria das mutações por ponto são encontradas nesta região.
- Uma região carboxila terminal básica (aminoácidos 265-390), que se correlaciona com os domínios de ligação não especifica ao DNA, sinais de localização nuclear e oligomerização.

A região com função de supressão do crescimento abrange quase toda a proteína. A proteína p53 é fosforilada em vários resíduos de serina, como está mostrado na Figura 48 (Donehower & Bradley, 1993; Ozbun & Butel, 1995).

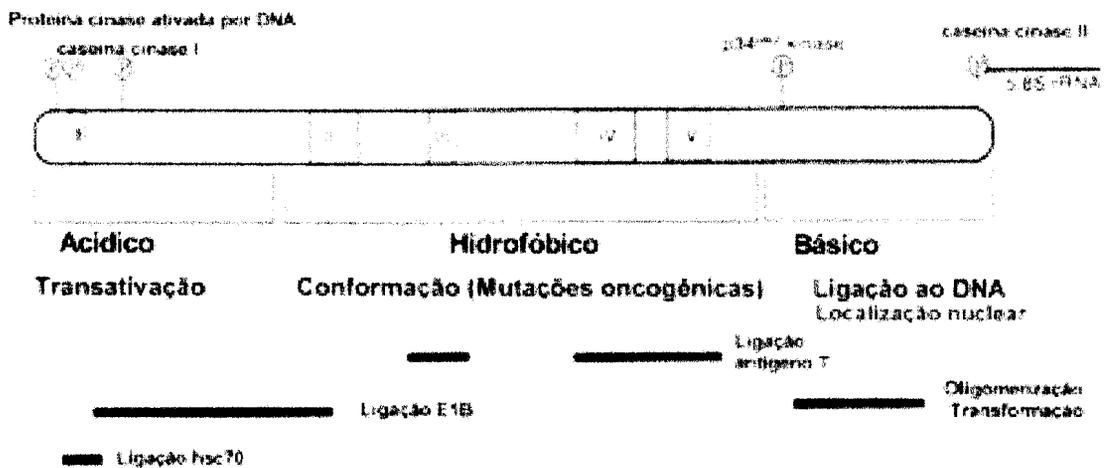


Figura 48. Domínios e atividades da proteína p53 (adaptado de Donehower & Bradley, 1993)

1.6.2.2. Função do p53 normal

Sob condições fisiológicas, a proteína p53 normal tem tempo de vida de cerca de 20 a 40 minutos e não há evidências de que seja necessária para a divisão normal da célula. Uma vez que as células sejam expostas a agentes que causem dano ao DNA, como radiação ionizante, UV ou muitas drogas quimioterápicas, ocorrem modificações pós-traducionais, conferindo maior estabilidade da proteína que se acumula no núcleo (Cotran *et al.*, 1994; Lane, 1994; Selivanova & Wiman, 1995; DeVita *et al.*, 1997). A p53 normal liga-se ao DNA e faz com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, tornando-se necessária a reparação para não ocorrer a morte celular por apoptose (Figura 49).

A decisão da célula de parar o crescimento e reparar o dano ao DNA, ou induzir a apoptose, não é bem conhecido, mas pode ser devido a intensidade da lesão ao DNA, o estágio do ciclo celular no qual a lesão ocorreu, ou a existência de mecanismos de apoptose

em algumas células que fazem parte de seu desenvolvimento normal ou maturação, por exemplo, células linfóides (DeVita *et al.*,1997).

Uma célula cancerosa, com *p53* funcional é mais sensível à quimioterapia do que uma célula normal, porque mutações no gene *ras* conduzem a célula para a fase S do ciclo celular, sobrepondo os mecanismos dependentes de *p53* que levam ao reparo (Figura 49).

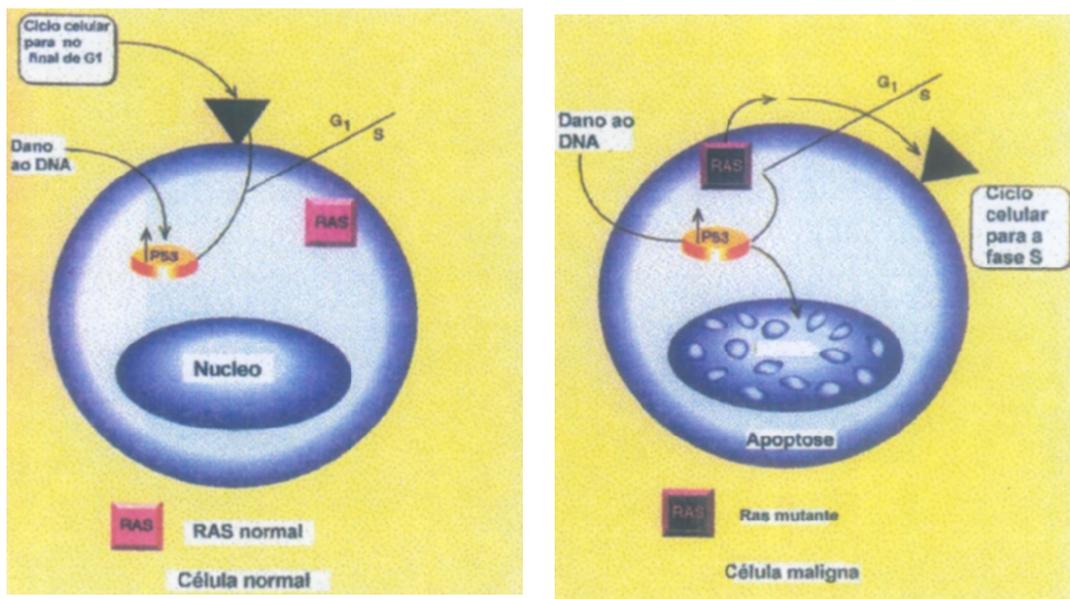


Figura 49. Função do *p53* na sensibilidade à quimioterapia em células normais e neoplásicas. Exposição das células normais, à esquerda, a agentes que causam dano ao DNA resulta no aumento do nível de *p53* que induz a parada na fase G1 do ciclo celular. Exposição das células cancerosas, à direita, ao agente que causa dano ao DNA aumenta o *p53*, mas o ciclo celular continua da fase G1 para S por ter o gene *ras* mutante. O resultado é a apoptose (adaptado de DeVita *et al.*, 1997).

1.6.2.3. Modulação da resposta da proteína p53 norma

Recentemente, foi verificado que a proteína p53 normal induz a expressão de *mdm2*, que seria um oncogene. A proteína *mdm2* é uma fosfoproteína nuclear e contém um domínio que se liga à proteína p53 na região amino-terminal, formando um complexo p53-*mdm2*. Essa interação bloqueia a ação do p53, talvez por inibir a ligação de fatores de transcrição ao domínio amino-terminal. Isso quer dizer que no controle da proteína p53 em células normais, o complexo formado entre esta e a *mdm2* sinaliza para que a p53 seja degradada mediada por ubiquitina. Em células com DNA danificado não ocorre a formação do complexo e o p53 acumulado exerce a sua função biológica, Figura 50 (Lane & Hall, 1997).

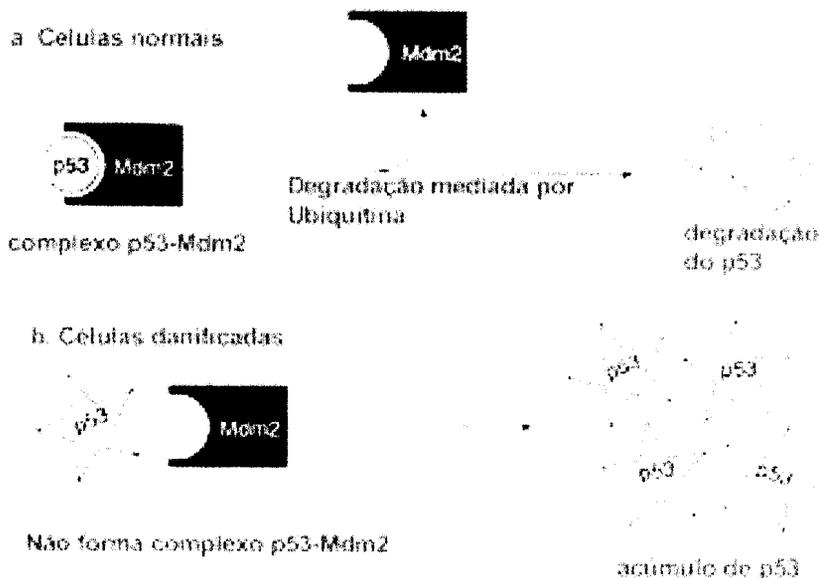


Figura 50. Controle da função de p53 pela proteína *mdm2* em células normais e em células danificadas (adaptado de Lane & Hall, 1997).

Alguns tumores, como sarcomas, expressam em demasia a proteína mdm2, que se liga ao p53 e aumenta a sua degradação. Esta descoberta abre novas possibilidades terapêuticas para modular a resposta da proteína p53. Outros tumores inativam a função do p53 através de moléculas inibidoras. Uma infecção com o vírus do papiloma humano proporciona a expressão da proteína E6, que se liga à proteína p53 e ativa sua degradação dependente de ubiquitina, podendo levar ao carcinoma cervical (Lane & Hall, 1997).

1.6.3. Genes reguladores da transdução de sinal por p53

Estudos recentes elucidaram parte da ação do gene *p53*, atuando como mediadora da ação de outros genes, como o gene *p21* (DeVita *et al.*, 1997). A proteína p53 ao se ligar à sítios de ligação nas regiões de transcrição do DNA do gene *p21* induz a expressão da proteína p21 (Figura 51). A proteína p21, pode formar complexo com o antígeno nuclear proliferante da célula (PCNA), ou inibir a ativação das cinases dependentes de ciclínas da fase G1/S. Quando estão ativas, as cinases agem em outro gene supressor de tumor, o *Rb*, que tem como produto a fosfoproteína nuclear pRb. A pRb quando hipofosforilada torna-se ativa ao se ligar aos fatores de transcrição, como a proteína E2F, e inibe a progressão das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular impedindo a replicação celular (Figura 51). Quando as células são estimuladas por sinais mitogênicos, as cinases dependentes de ciclina fosforilam a pRb que se torna inativa no final da fase G1, liberando os fatores de transcrição, como E2F, que são essenciais para a proliferação celular. Esses fatores de transcrição se ligam então às regiões reguladoras de outros genes como a ribonucleotídeo

redutase e a dihidrofolato redutase que participam da síntese de DNA (Figura 51), promovendo a entrada da célula na fase S do ciclo celular.

Nas células que têm o p53 normal, após o dano ao DNA, o nível de p53 aumenta, podendo ocorrer a ativação do gene *p21* que inibe a ativação do complexo de ciclínas dependentes de cinases, não ocorrendo a fosforilação de pRb. A pRb não fosforilada liga-se ao fator de transcrição e não ocorre a síntese de DNA, Figuras 51 e 52 (DeVita *et al.*, 1997; Lewin, 1997).

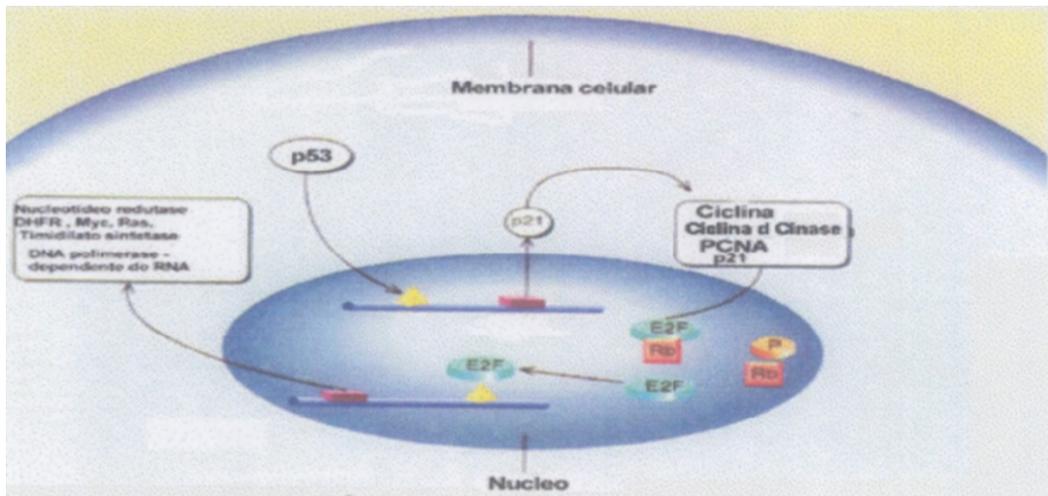


Figura 51. Célula apresentando nível alto de p53 (adaptado de DeVita *et al.*, 1997). DHFR = dihidrofolato redutase; PCNA = antígeno nuclear proliferante da célula.

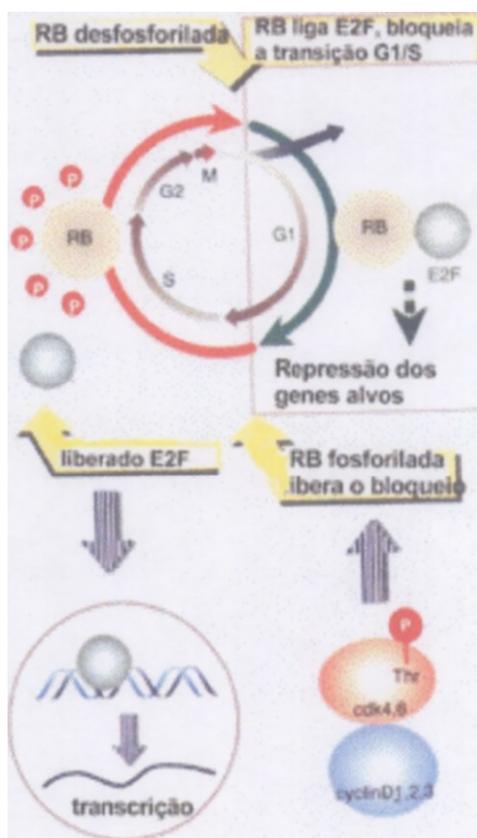


Figura 52. Fosforilação da proteína Rb é controlada no ciclo celular (adaptado de Lewin, 1997).

1.7. DNA Topoisomerases

As DNA topoisomerases são necessárias para a viabilidade de todos os organismos desde as bactérias até o homem, devido ao seu papel vital em vários processos no metabolismo do DNA, como transcrição, replicação, recombinação e segregação dos cromossomos durante a divisão celular. As topoisomerases estão envolvidas no controle e na interconversão de diferentes formas topológicas do DNA, por catalisar a quebra concertada de uma ou de ambas as fitas. Elas alteram o estado topológico do DNA circular, mas não a sua estrutura covalente (Liu, 1989, Schneider *et al.*, 1990; Liu, 1994; Gupta *et al.*, 1995; Wang, 1996).

O interesse nas topoisomerases se deve a que, muitas drogas, intercalantes e não do DNA com atividades antitumorais, antifúngicas, antivirais e antibacterianas têm como alvo tais enzimas e influenciam etapas chaves do seu ciclo catalítico (Chen & Liu, 1994; Capranico & Zunino, 1995; Capranico *et al.*, 1997).

1.7.1. Classificação

Desde a descoberta da primeira topoisomerase, a DNA topoisomerase I de *Escherichia coli* (ou proteína ω), outras enzimas foram isoladas de células procarióticas e eucarióticas (Wang, 1985). Com base na função catalítica, as DNA topoisomerases são classificadas em três famílias: tipo I, podendo ser do tipo I-A e I-B, tipo II (Capranico *et al.*, 1997).

a. Tipo I age por catalisar uma quebra transitória em uma das fitas do DNA de hélice dupla, passando uma fita intacta do DNA através da fita quebrada e então refazendo a ligação sem necessitar de energia. As topoisomerases do tipo I-A incluem a proteína ω de bactérias,

topoisomerasas III e a DNA girase reversa. A família do tipo I-B inclui topoisomerasas I de eucariontes e topoisomerasas do vírus vaccínia.

b. Tipo II age por catalisar uma quebra transitória na fita dupla de DNA de um dos segmentos do DNA e passa a outra hélice dupla de DNA sobre a fita quebrada após o que refaz a ligação, havendo necessidade de ATP. Incluem a DNA girase e a topoisomerase IV de procariontes e as topoisomerasas II α e II β de mamíferos.

1.7.2. DNA topoisomerasas I

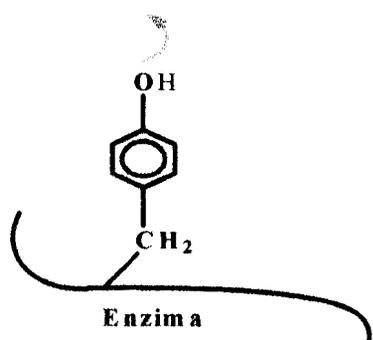
As DNA topoisomerasas I de células eucafióticas são enzimas nucleares monoméricas de 100 kD. O gene humano foi clonado e está localizado no cromossomo 20 q12-13.2 (Asimakopoulos *et al.*, 1994; Wang, 1994). A topoisomerase I relaxa o DNA superhelicoidal positivo e negativo, e se liga preferencialmente ao DNA de hélice dupla. A enzima catalisa reversivelmente a quebra e religação da ligação fosfodiéster do DNA via duas reações sucessivas de transesterificação, Figura 53 (Wang, 1994, Berger *et al.*, 1996):

1a. reação: Um grupo hidroxila do resíduo de tirosina localizada no sítio ativo da enzima ataca a ligação fosfodiéster no final 3' fosfato do DNA, formando uma ligação covalente éster DNA-enzima e deixando um grupo hidroxila livre no açúcar do DNA.

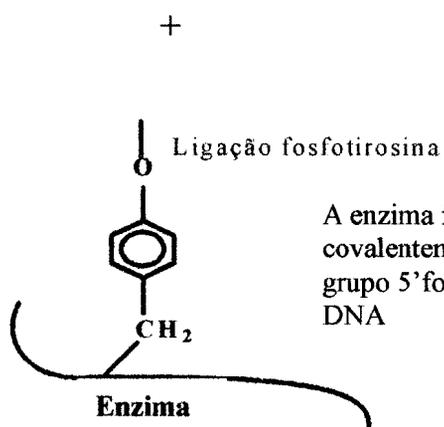
2a. reação: O grupo hidroxila na desoxirribose no final do DNA rompido vai atacar a ligação enzima-DNA, refazendo a ligação fosfodiéster do DNA e liberando a enzima para outras reações.

1a. reação de transesterificação

Rutura transitória de uma fita de DNA por topoisomerase I



Ataque nucleofílico do grupo OH da tirosina da topoisomerase I à ligação fosfodiéster do DNA



A enzima fica ligada covalentemente ao grupo 5' fosforil do DNA

2a. reação de transesterificação

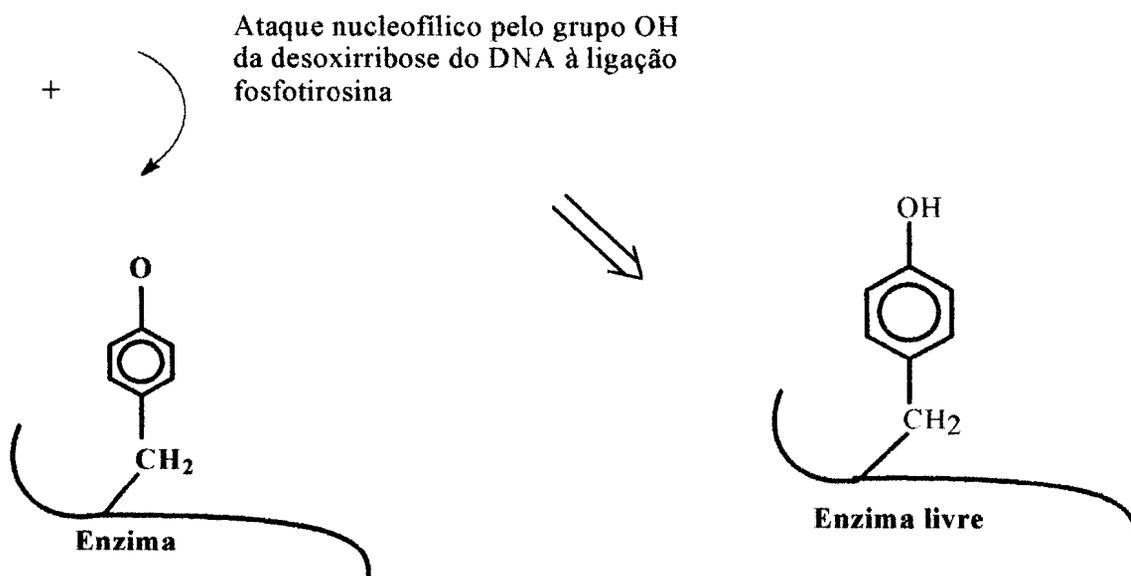


Figura 53. Reação de transesterificação entre a DNA topoisomerase I e o DNA (adaptado de Wang, 1994; Pommier *et al.*, 1998).

Recentemente, Stewart *et al.*, em 1998, apresentaram um modelo para o relaxamento do DNA por topoisomerase I que envolve um mecanismo de rotação controlada, no qual a interação iônica entre o DNA e o domínio de ligação com a proteína regulam o processo de enrolamento. A regulação da topoisomerase I é feita ao nível da transcrição e tradução. A fosforilação e desfosforilação da enzima é um mecanismo importante *in vitro* mas, a sua implicação *in vivo* ainda é desconhecida (DeVita *et al.*, 1997; Berger, 1998).

Alguns trabalhos mostram que câncer de ovário, de cólon e leucemia linfocítica contém altos níveis de topoisomerase I e II (Van der Zee *et al.*, 1991).

1.7.3. DNA topoisomerases II

Eucariontes inferiores, tais como a *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae* têm só uma forma de topoisomerase II, enquanto que células humanas e de outros mamíferos apresentam duas diferentes isoformas, a forma α de 170 kD dimérica localizada no cromossomo 17, e a forma β de 180 kD localizada no cromossomo 3 (Wang, 1996; DeVita *et al.*, 1997). A análise da seqüência de aminoácidos mostrou que as topoisomerases II são evolucionariamente e estruturalmente relacionadas. Elas exibem diferenças na localização celular, na especificidade do tecido e são expressas diferentemente em vários estágios do ciclo celular e durante o desenvolvimento. A reação da topoisomerase II com o DNA é dependente de ATP e de magnésio (Schomburg & Grosse, 1986). A reação de transesterificação catalizada pela topoisomerase II sobre o DNA é semelhante à reação catalisada pela topoisomerase I (Chen *et al.*, 1984; Chen & Liu, 1994; Wang, 1994).

1.7. 4. Drogas antitumorais inibidoras de DNA topoisomerases

Os inibidores das DNA topoisomerases compreende um grande número de substâncias de diferentes estruturas. A maioria desses agentes têm em comum a ligação ao intermediário covalente da reação, chamado de complexo de quebra (cleavable complex) da primeira reação de transesterificação, na reação das DNA topoisomerase I ou II. Este complexo covalente estabilizado pela droga pode ser visto como uma lesão do DNA, que por tratamento com um desnaturante de proteína como SDS, resulta na quebra do DNA que estava ligado à enzima (Chen & Liu, 1994; Liu, 1994). Foi sugerido que a droga interage com a interface proteína-DNA para formar complexo estável enzima-droga-DNA (Capranico *et al.*, 1997).

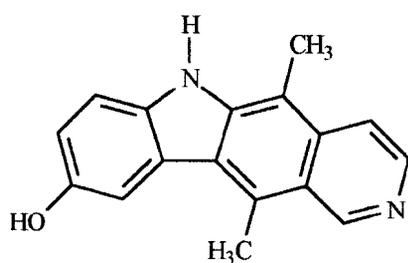
1.7.4.1. Agentes químicos inibidores de DNA topoisomerases

Agentes químicos de diferentes naturezas, sintéticos e naturais produzidos por bactérias e fungos, inibem a atividade das DNA topoisomerases e alguns deles têm atividade terapêutica em cânceres humanos, como a adriamicina, etoposida, teniposida e derivados da campotecina como topotecan e irinotecan. Muitas drogas estabilizam o complexo DNA- topoisomerase em eucariontes. De acordo com Capranico *et al.*, 1997, os agentes que estabilizam o complexo covalente DNA-enzíma podem ser chamados de venenos. Os agentes que não formam o complexo de quebra podem ser chamados de inibidores. Na Tabela 2 apresenta-se o modo de ligação de alguns venenos para as topoisomerases.

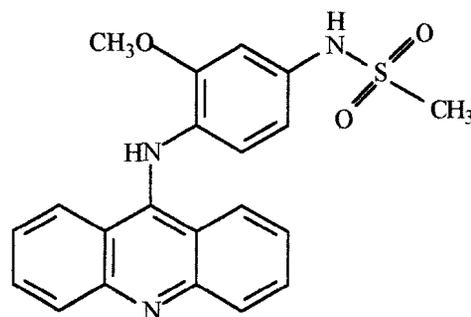
Tabela 2. Ligação ao DNA de venenos de DNA topoisomerasas de células eucarióticas (adaptado de Capranico *et al.*, 1997).

Ligação ao DNA	Topoisomerase I-b	Topoisomerase II	Topoisomerase I e II
Intercalante puro		Elipticinas Flavonas	Saintoipina Protoberberinas Intopicina Fagaronina
Ligação ao sulco	Bulgareina Hoechst 33258	Estreptonigrina	
Intercalantes e ligação ao sulco	Indolecarbazóis	Antraciclina m-AMSA Bisantreno Mitoxantrona Amonafida Quinolonas	Actinomicina D
Nenhuma ligação conhecida	Campotecina	Demetilpodofilotoxina Terpenóides Isoflavonas Azatoxina	Indoloquinolinadiona

Muitos inibidores das topoisomerasas II são agentes intercalantes do DNA, como a antraciclina, adriamicina, o alcalóide elíptico e o derivado da acridina, m-AMSA, Figura 54 (Chen & Liu, 1994).



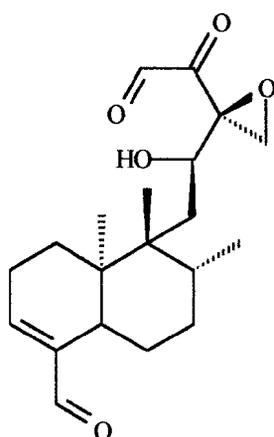
Elicipticina



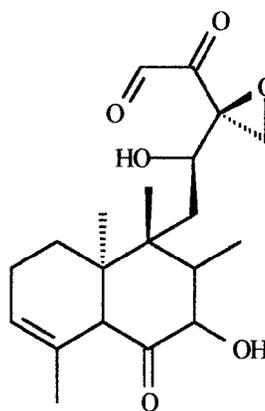
m-AMSA

Figura 54. Estruturas da elipticina e da m-AMSA.

Outros inibidores que agem sobre a topoisomerase II não são drogas intercalantes do DNA, como os derivados da podofilotoxina, teniposida e etoposida (Figura 13), os diterpenos, clerocidina e terpentecina (Figura 55), e a isoflavona genisteína (Figura 36).



Clerocidina



Terpentecina

Figura 55. Estruturas da clerocidina e da terpentecina.

Entre os inibidores da topoisomerase I que não são intercalantes do DNA, pode-se citar o alcalóide campotecina e derivados como o irinotecan e topotecan (Figura 15). Outros exemplos de compostos que são venenos de topoisomerasas I e se ligam ao sulco menor do DNA relacionou-se o derivado bisbenzimidazol, Hoechst 33258, Figura 56.

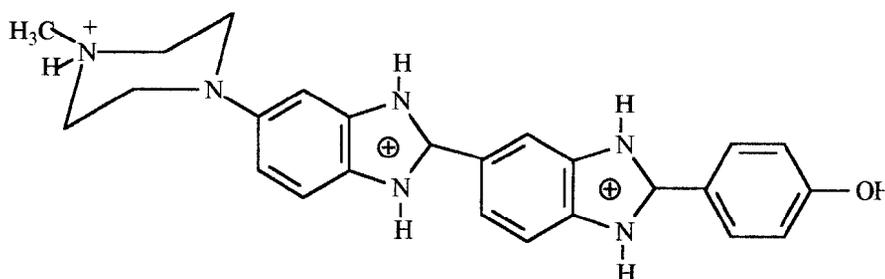


Figura 56. Estrutura do Hoechst 33258.

1.7.4.2. Mecanismo de morte celular pelos inibidores das DNA topoisomerasas

O mecanismo molecular da morte celular pelas drogas que atuam sobre as topoisomerasas não é totalmente conhecido. Presumivelmente, o dano causado por essas drogas leva à morte celular por apoptose ou por necrose através de vários mecanismos como deficiência no reparo do DNA e ação no ciclo celular envolvendo ciclinas levando à inibição da síntese de DNA e de proteínas (DeVita *et al.*, 1997).

A morte celular após exposição à droga e a natureza reversível do complexo sugere que a interação pode ser devido também a outros processos celulares (Schneider *et al.*, 1990; Chen & Liu, 1994). A citotoxicidade de agentes que interagem com a topoisomerase I é dependente da síntese de DNA (Chen & Liu, 1994; Gupta *et al.*, 1995).

2. OBJETIVOS

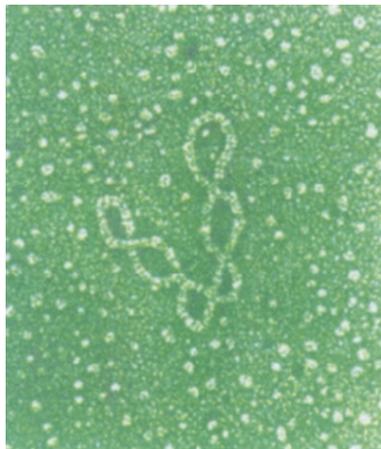
Os principais objetivos deste trabalho são:

- I. Verificar a atividade citotóxica *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo* de produtos mesoiônicos das classes 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida e 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e substâncias naturais flavonoídicas e diterpênicas sobre tumores murinos.

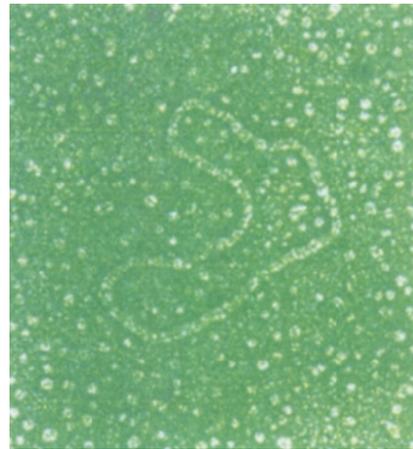
- II. Estudar o provável mecanismo de ação desses compostos utilizando técnicas modernas, envolvendo a comparação de resultados obtidos pelo tratamento com drogas e controles, tais como:
 1. Crescimento celular em cultura de células tumorais por dosagem de desidrogenases e síntese de DNA e de proteínas;
 2. Isolamento do DNA das células para análise de apoptose;
 3. Tentativa de amplificação por reação de cadeia da polimerase (PCR) do DNA isolado das células tumorais utilizando oligonucleotídeos iniciadores para um fragmento do *gene p53*;

4. Ação das drogas sobre a atividade de relaxamento e formação do complexo de quebra do DNA sobre a DNA topoisomerase I;
5. Análise por espectrofotometria de ultravioleta e fluorescência da ligação de DNA do timo de bezerro com os produtos mesoiônicos e flavonóides.

MATERIAL E MÉTODOS



Forma I



Forma II

SV40

LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPUSKY, S. L., MATSUDAIRA, P.,
DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**, 3^d ed., Scientific American Books,
New York, 1995.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Aparelhos

Todas as medidas de absorção na região UV/VIS foram obtidas no espectrofotômetro da VARIAN modelo DMS 80.

Os espectros de fluorescência foram obtidos em espectrofluorímetro HITACHI modelo F4500.

Centrífuga refrigerada - ALC modelo PK121R.

Estufa FANEM.

Aparelho para eletroforese em gel de agarose - Pharmacia.

Aparelho para PCR termociclo programável "PTC-100"(MJ Research).

Transiluminador UV e óculos de proteção para UV (SIGMA).

As fotografias dos géis de agarose contendo brometo de etídio, foram obtidas em aparelho fotográfico digital, Cassio, colocando filtro laranja após revelação em luz ultravioleta.

Microscópio ótico - Zeiss.

Contador de cintilação líquida (Beckman Instruments).

3.1.2. Drogas

3.1.2.1. Derivados mesoiônicos

Os compostos cloreto de 4-fenil-5[4'-X-estiril]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, onde **X**= H (**MI-A**), OCH₃ (**MI-C**), NO₂ (**MI-D**) e OH (**MI-J**), Figura 57, e 4-fenil-5-(4-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (**BMI-D**), Figura 58, foram obtidos sinteticamente e caracterizados por Áurea Echevarria e seu grupo (Santos, 1992; Da Silva, 1998).

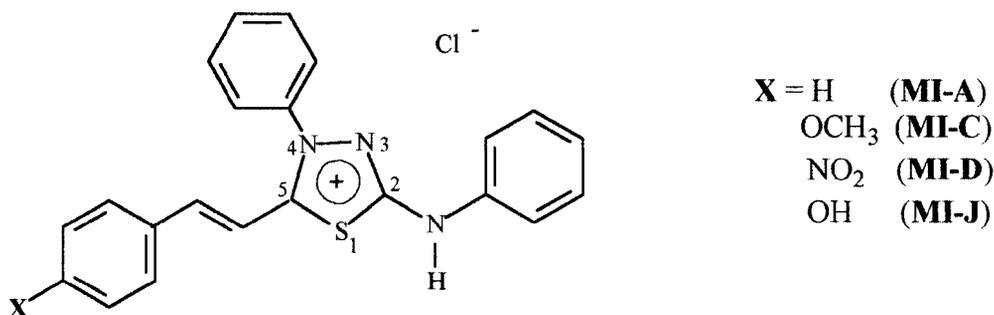


Figura 57. Estrutura dos derivados de cloreto de 4-fenil-5[4'-X-estiril]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J**).

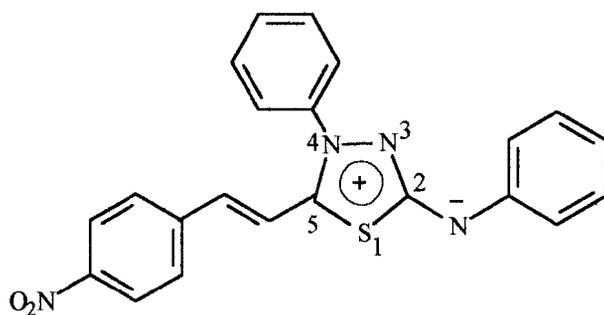


Figura 58. Estrutura do 4-fenil-5-(4-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-aminida (**BMI-D**).

3.1.2.2. Flavonóides

Isoflavonóide genisteína e flavonol quercetina - SIGMA.

A biflavona amentoflavona e o flavonoide glicosilado rutina, Figura 59, foram isolados da planta *Ouratea semiserrata* Mart. (Engl), classe Angiospermae, família Ochnaceae por Javier R. Velandia (1997). Foi utilizada também a amentoflavona acetilada.

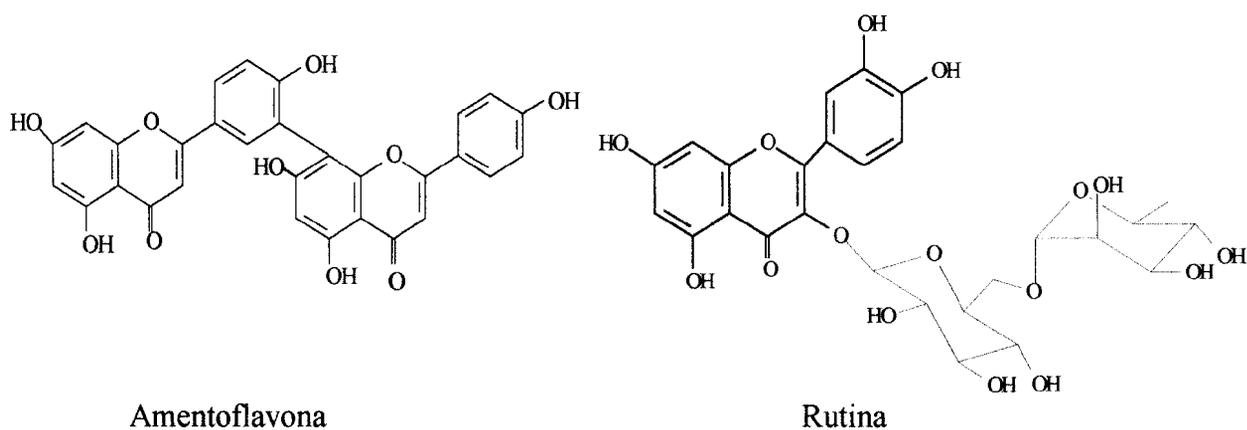


Figura 59. Estruturas da amentoflavona e da rutina.

A 7"-O-metilagatisflavona (Figura 60), é uma nova biflavona isolada da planta *Ouratea hexasperma* (St. Hill) Bail, classe Angiospermae, família Ochnaceae, por Moreira *et al.*, (1999).

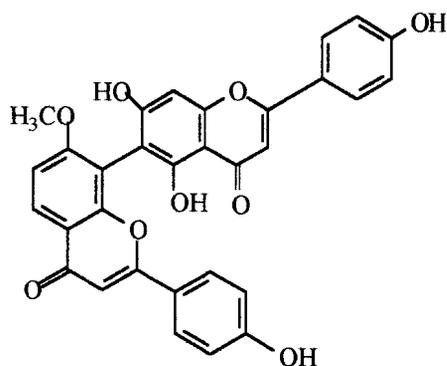


Figura 60. Estrutura da 7"-O-metilagatisflavona.

3.1.2.3. Diterpenos

Os derivados *trans-crotonina* (CTN) e *trans-desidrocrotonina* (DCTN), Figura 61, diterpenos do tipo 19-nor-neo-clerodano, foram isolados, da planta da região amazônica, *Croton cajucara*, família Euphorbiaceae, por Maria Aparecida Maciel (1997).

Os *trans-cis* clerodanos são derivados do esqueleto labdano derivados do pirofosfato de geranil geranila.

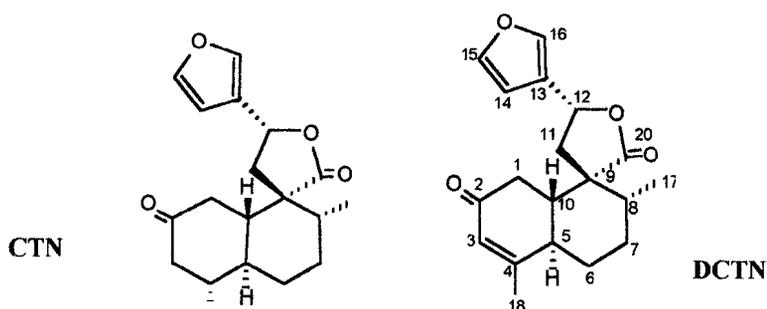


Figura 61. Estruturas da CTN e da DCTN.

As estruturas das substâncias naturais foram estabelecidas por espectroscopia de RMN 1D e 2D, EM, IV e UV.

3.1.3. DNA

DNA "ladder" padrão λ . DNA/*Hind* III - SIGMA e DNA "ladder" de 1 kb - GIBCO.

DNA do timo de bezerro - SIGMA.

DNA de fago ϕ X174(RF-1) - SIGMA.

DNA de plasmídeo pBR322 - Pharmacia.

3.1.4. Outros reagentes e solventes

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Aldrich; Fenol e trishidroxiaminometilmetano (Tris) - Merck.

Albumina bovina acetilada, albumina bovina fração V, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), brometo de etídio, dodecilsulfato de sódio (SDS), fluoreto de fenil-metil - sulfonila (PMSF), óleo mineral, proteinase K e triton X-100 - SIGMA.

Etoposida e campotecina - SIGMA

Todos os outros reagentes usados neste trabalho são de grau analítico Merck e Vetec.

3.1.5. Enzimas

- *Taq* DNA polimerase - CENBIOT/RS.

Kit de DNA topoisomerase I da topoGen, Inc., Columbus, Ohio.

Ribonuclease A (Pharmacia).

3.1.6. Isótopos radioativos

Metil -³[H]-timidina - atividade específica 5 Ci/mmol - Amersham.

Metil - ³[H]-leucina- atividade específica 5 Ci/mmol - Amersham.

3.1.7. Meio de cultura

RPMI 1640, estreptomicina e penicilina da SIGMA, soro fetal bovino (SFB) da BIO RIO.

Meio RPMI completo: RPMI contendo β-mercaptoetanol 50 μM, penicilina 60 μg/mL, estreptomicina 100 μg/mL e SFB 5-10 %.

3.1.8. Animais

Camundongos suíços (SW) e camundongos singênicos C₃H, DBA/2 ou C57 B1/10 de ambos os sexos, foram obtidos do Biotério do Instituto Nacional do Câncer e do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente ventilado. A ração e a água filtrada foram fornecidas *ad libitum*.

3.1.9. Soluções Tampão

- PBS: Fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 contendo NaCl 0,15 M.

Preparo do tampão: Dissolver 8,8 g de NaCl, 0,262 g de fosfato monossódico hidratado (NaH₂PO₄ H₂O) e 1,15 g de fosfato dissódico anidro (Na₂HPO₄) em cerca de 800 ml de água tridestilada. Ajustar o pH a 7,2. Completar a 1 litro com água tridestilada.

Tampão TAE para eletroforese:

Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M pH 8,5 (Ramachandra & Studzinski, 1995).

Tampão PE para titulações espectrofotométricas:

NaH_2PO_4 0,0162 M, Na_2HPO_4 0,0416 M, EDTA 0,025 M, pH 7,2 (Sen & Maiti, 1994).

Tampão para PCR 10 x concentrado:

100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2 e 0,01% (p/v) gelatina.

Tampão TE:

Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM. (Sambrook *et al.*, 1987).

Tampão de digestão para extração de DNA:

Tampão pH = 8,0 contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, 0,5 % de SDS (Ramachandra & Studzinski, 1995).

Tampão NB:

2mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM ditioneitol, 0,1 mM PMSF pH 6,5 (Rubin *et al.*, 1994).

Tampão para relaxamento de DNA superlaehcoldal (TR):

Tris 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 0,5 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, ditioneitol 0,5 mM, albumina acetilada 0,003 % (Liu & Miller, 1981).

3.1.10 Tumores

Carcinoma de Ehrlich

As células de Ehrlich são derivadas de um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongo e adaptado à forma ascítica (Song *et al.*, 1993). Estas células crescem em suspensão, não aderem às superfícies *in vitro*, e desenvolvem tumor em uma semana em camundongos. Quando injetadas superficialmente desenvolvem tumor sólido no sítio primário de injeção. Os tumores foram transplantados após sete a dez dias de crescimento no peritônio de camundongos SW ou singênicos C₃H, DBA/2 ou C57 Bl/10.

Sarcoma 180

As células crescem em cultura em suspensão e desenvolvem tumor em uma semana em camundongos. Os tumores foram transplantados após sete a dez dias de crescimento no peritônio de camundongos SW ou singênicos C₃H, DBA/2 ou C57 Bl/10.

Os tumores de Ehrlich e S180, foram cedidos por Emilio Faustino de Paula, Instituto Nacional do Câncer, Setor de Pesquisa Básica, RJ.

3.1.11. Linhagem celular WEHI 164

Células WEHI 164 clone 13

A linhagem celular murina aderente fibrosarcoma WEHI-164 clone 13, que é sensível aos efeitos citotóxicos de TNF- α , foi mantida à - 75° C. Estas células foram mantidas por Juliana Lima na Universidade Estadual do Rio de Janeiro (Lima *et al.*, 1999).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de células

Células de Ehrlich e Sarcoma 180

As células tumorais foram cultivadas em meio RPMI completo. As células foram mantidas em estufa à 37 °C em atmosfera de cerca de 5 % de CO₂.

Células WEHI 164 clone 13

Após descongelamento, as células WEHI-164 clone 13, foram cultivadas em meio RPMI completo e mantidas em estufa à 37° C em atmosfera de 5 % de CO₂ (Lima *et al.*, 1999).

3.2.2. Ensaio de citotoxicidade

3.2.2.1. Medida da síntese de DNA e de proteínas

Células de S180 foram retiradas de camundongos DBA/2 e mantidas em meio RPMI completo em cultura prévia de 24 horas a 37° C com 5 % de CO₂. Após esse tempo, em microplacas foram adicionadas 1 x 10⁵ células tumorais/poço em 200 µL de meio RPMI completo na ausência ou na presença de drogas em 0,3 % de DMSO em concentrações variando de 0 a 100 µg/mL. As células foram cultivadas por 24 e 48 horas em triplicam. Adicionou-se radioisótopo ³[H]-timidina ou ³[H]-leucina (0,125 µCi/poço) cinco horas antes do término da cultura. Após o término da cultura, procedeu-se ao tratamento das células, adicionando-se as células de cada poço em papel de filtro (1 cm x 1 cm) e submetendo-as a secagem em estufa. Lavou-se os papéis contendo as células com água destilada. Foi medida a incorporação de ³[H]-timidina ou de ³[H]-leucina em proteínas e

DNA respectivamente, nas células, em aparelho de cintilação. A partir dos valores de percentagem de incorporação dos isótopos radioativos nas células tratadas com drogas em relação às células tratadas com o solvente foram obtidos os valores de IC_{50} (a concentração da droga que inibe em 50 % a incorporação de isótopo radioativo).

3.2.2.2. Ensaio do MTT

As células de Ehrlich foram retiradas de camundongo portador de tumor de oito a dez dias de crescimento e foram cultivadas por uma a duas horas antes de iniciar a cultura. As células (5×10^5 células/mL) foram adicionadas em 300 μ L de meio RPMI completo. As drogas em concentração final de DMSO 0,3 % foram adicionadas em doses crescentes, obtidas por diluições sucessivas até 100 μ g/mL a poços em quadriplicata. Foram realizados ensaios "branco" contendo meio RPMI completo e "branco" contendo meio RPMI completo e drogas em DMSO 0,3 % na concentração final. Após cultura de 24 ou 48 horas adicionou-se 20 μ L de solução de MTT (5mg/mL em PBS) por poço. Incubou-se por três horas em estufa à 37° C. Após esse período, adicionou-se 300 μ L de isopropanol acidificado/poço e a mistura foi analisada em espectrofotômetro a 570 nm (Mossman, 1983). A partir dos valores de percentagem de inibição de desidrogenases nas células tratadas com drogas em relação às células tratadas com o solvente foram obtidos os valores de IC_{50} (a concentração da droga que inibe em 50 % a atividade enzimática).

3.2.3. Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* de tumores ascíticos

5×10^5 células tumorais foram inoculadas via ip em camundongos singênicos C₃H, DBA/2 ou C57 B1/10. Após 24 horas da inoculação do tumor nos animais, iniciou-se o

tratamento com as drogas. Injetou-se por via ip em cada animal 0,06 mL da droga em DMSO a 80 % em salina (v/v), nos esquemas indicados nas tabelas. A dose máxima tolerada foi escolhida para iniciar o teste. Em cada animal controle foi injetado 0,06 mL de DMSO a 80 % em salina, via ip, no mesmo esquema de tratamento. Foi utilizado um total de 15 animais por grupo. O efeito máximo das drogas foi obtido anotando-se a sobrevida, em dias, dos animais mortos e sobreviventes no tempo total de dois meses de observação. A eficiência do tratamento com o tumor ascítico *in vivo* foi verificada pela análise do aumento da sobrevida dos animais tratados (T) em comparação com a sobrevida dos animais controles (C) usando-se a expressão:

$$T/C \% = [\text{sobrevida em dias dos animais tratados (T) com drogas} / \text{sobrevida em dias dos animais controles (C)}] \times 100$$

A atividade antitumoral é considerada significativa quando o valor de T/C % é maior do que 125 (Geran *et al.*, 1972).

3.2.4. Análise morfológica

A morfologia das células tumorais e dos leucócitos foi analisada através de microscopia ótica, usando-se a coloração de Giemsa (Lima *et al.*, 1992).

3.2.5. Dosagem do fator de necrose de tumor- α (TNF- α)

Animais portadores de carcinoma de Ehrlich usados como controles tratados com o solvente ou tratados com as drogas **MI-D**, **CTN** ou **DCTN** dissolvidas em solvente segundo o esquema apresentado nas Tabelas 5 e 7. Sete dias após a última dose, as células do peritônio dos animais foram retiradas e a suspensão foi centrifugada a 300 x g por cinco

minutos; o sobrenadante de cada ensaio foi separado e centrifugado a 1000 x g por dez minutos, obtendo-se o sobrenadante que foi conservado a - 20° C até o momento da dosagem de TNF- α , como descrito na literatura (Espevik & Nissen-Meyer, 1986; Meager *et al.*, 1989): em placa de cultura de 96 poços foram adicionadas 2×10^3 células WEHI em meio RPMI completo e a amostra a dosar. Como padrão positivo de inibição de crescimento celular foi adicionado 30 ng/mL de TNF- α . Incubou-se a 37° C por 20 horas em atmosfera de 5 % de CO₂. O ensaio colorimétrico com MTT foi aplicado para análise do crescimento celular (Mossman, 1983). A média da absorbância de três amostras foi usada para calcular a viabilidade em relação ao padrão de TNF- α (em % do controle).

3.2.6. Extração de DNA

2×10^6 células foram lavadas em PBS por centrifugação a 500 x g por 5 minutos e rompidas com tampão de digestão e adicionou-se no momento de uso 0,1 mg/mL de proteinase K (Sambrook *et al.*, 1987; Ramachandra & Studzinski, 1995). O material obtido foi extraído duas vezes com mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e uma a duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi separada, precipitada com 2 volumes de solução etanólica contendo acetato de sódio 0,3 M e mantida em repouso pelo menos dezoito horas à - 20° C. Após esse período, centrifugou-se por 10 minutos a 1000 x g na temperatura ambiente e secou-se ao ar e a 4° C; o centrifugado foi dissolvido em tampão TE e o DNA foi mantido a - 20° C. A absorbância de cada alíquota foi lida no λ de 260 e a 280 nm, usando-se DNA com a relação de absorbância nos λ 260/280 \geq a 1,8. As amostras com absorbância menor que 1,8 foram consideradas contaminadas com proteína (Ramachandra & Studzinski, 1995).

3.2.7. Análise de fragmentos nucleossômicos por eletroforese em gel de agarose

A quebra internucleossômica do DNA foi analisada através de eletroforese em gel convencional após isolamento do DNA (Sambrook *et al.*, 1987). A amostra contendo DNA (10 µg) foi incubada com 0,1 µg de ribonuclease por trinta minutos à 37 °C, sendo em seguida adicionado 1/10 de volume de solução contendo 0,2 % de azul de bromofenol e 20 % de sacarose. Comparou-se com o DNA padrão de massa molecular, λ DNA/*Hind* III. Adicionaram-se as amostras em poços de gel de agarose a 1% em tampão TAE contendo brometo de etídio (1 µg/mL). A eletroforese foi desenvolvida por cerca de uma hora a 10 V/ cm; o gel foi lavado por alguns minutos em água destilada e visualizado sob iluminação UV com transiluminador e fotografou-se. A presença de bandas com periodicidade de 180 pares de base foi usada como indicativa que parte das células da população sofreu apoptose (Sambrook *et al.*, 1987).

3.2.8. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

No presente trabalho foi feita a extração de DNA de células de Ehrlich em cultura controle e tratadas por drogas. O DNA foi preparado por extração com fenol e clorofórmio conforme a técnica do item 3.2.6. Para a amplificação do DNA por PCR, foram utilizados oligonucleotídeos (GIBCO), *sense* e *antisense*, referentes aos exons 5 e 8 do gene *p53* (Mayr *et al.*, 1995), tendo a seguinte composição:

oligonucleotídeo *sense* (5'- TCTGGGCTTCTTGCATTCTG-3').

oligonucleotídeo *antisense* (5'- GTTGGGCAGTGCTCGCTTAG-3').

Aos tubos de propileno de 0,5 mL foram adicionados:

200 ng de DNA dos materiais extraídos de células de Ehrlich tratadas com a mistura solvente controle ou os diferentes produtos naturais.

1 ml de desoxirribonucleotídeos dNTP (5 mM dATP, 5 mM dCTP, 5 mM dGTP, 5 mM TTP em Tris-HCl 0,1 M) e 54 pmoles de oligonucleotídeos *sense* e *antisense*.

3 μ L de solução 50 mM de $MgCl_2$, 10 μ L de tampão PCR 10 vezes concentrado e água destilada estéril para volume final de 100 μ L.

Em seguida, foi adicionada à mistura 2,5 μ L de *Taq* DNA polimerase e 20 μ L de óleo mineral.

Os tubos foram colocados no aparelho de PCR, realizando um ciclo inicial de 95° C / 45 segundos, 55° C / 45 segundos, 72° C / 10 minutos, completando um total de 30 ciclos. As reações foram terminadas em temperatura de 4° C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % (p/v) contendo brometo de etídio 1 μ g/mL em tampão TAE e, visualizados sob iluminação UV com transiluminador, sendo fotografados a seguir.

3.2.9. Preparo de extrato contendo DNA topoisomerase I

O extrato nuclear foi preparado a partir de 108 células de tumor de Ehrlich (Rubin *et al.*, 1994). As células foram retiradas de camundongos portadores de tumor de oito a doze dias. A seguir todas as etapas foram realizadas a 4° C. As células foram lavadas em PBS e em tampão NB, sendo depois ressuspenso em 1 mL de tampão NB e 9 mL de tampão NB contendo 0,35% de triton X-100. Agitou-se cuidadosamente por dez minutos e centrifugou-se a 1000 x g por dez minutos. O sedimento nuclear foi lavado com NB e ressuspenso em tampão NB contendo NaCl 0,35 M. A suspensão foi agitada

cuidadosamente por trinta minutos. Centrifugou-se por dez minutos a 14.000 x g e adicionou-se 40% de glicerol ao sobrenadante que foi conservado a - 20° C.

3.2.10. Análise da ação da Topoisomerase sobre o DNA superhelicoidal de plasmídeos

3.2.10.1. Ensaio de relaxamento do DNA de plasmídeo superhelicoidal (Liu & Miller, 1981)

- Foi incubado trinta minutos à 37° C: 0,2 µg de DNA plasmídeo superhelicoidal + 1 U topoisomerase I da topoGen ou extrato nuclear contendo topoisomerase em tampão para relaxamento (TR) + diluições da droga.
- Adicionou-se às amostras 1/10 de volume de tampão TE contendo 0,2 % de azul de bromofenol, 20 % de sacarose e 1% SDS para desenvolvimento da eletroforese em gel de agarose com 1% em tampão TAE por cerca de quatro horas a 3,5 V/cm. Corou-se com 1 µg/mL de solução de brometo de etídio por trinta minutos e lavou-se por alguns minutos em água destilada.
- Visualizou-se o gel em transiluminador UV fotografando-se utilizando filtro laranja.

3.2.10.2. Ensaio para verificar o complexo de quebra ("cleavable complex")

O DNA de plasmídeo superhelicoidal (0,2 µg) foi incubado por trinta minutos à 37° C, adicionou-se 2 U da topoisomerase ou extrato nuclear em tampão TR e diluições, em concentrações diferentes da droga; a seguir adicionou-se SDS a 1% e proteinase K 0,1mg/mL e incubou-se por trinta minutos à 37° C. Foi adicionado azul de bromofenol 0,025 %, extraiu-se uma vez com mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se por dois minutos a 300 x g. Fez-se eletroforese em gel de agarose do sobrenadante como no item 3.2.7.

3.2.11. Espectro de absorção das drogas na região do Ultravioleta

O espectro de absorção das drogas sem ou com quantidades variadas de DNA em tampão PE, foram registrados em espectrofotômetro na região do UV/VIS, utilizando-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. A concentração de DNA em termos de nucleotídeo fosfato foi determinada usando o valor do coeficiente de extinção molar $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a λ 260 nm (Nandi & Maiti, 1985; Sen & Maiti, 1994). As titulações espectrofotométricas para a medida da ligação das drogas ao DNA foram realizadas com concentração constante da droga enquanto variava-se a concentração do DNA. O gráfico da titulação foi obtido através da relação r/c x r na absorbância máxima indicada para cada droga pela relação droga/DNA. O equilíbrio entre moléculas livres e ligadas foi obtido pela equação de Scatchard, 1949,

$$r/C = Kr,$$

onde r é o número de moles de droga ligada por mol de nucleotídeo e C é a concentração de droga livre; K é a constante de ligação intrínseca para sítio de ligação ao DNA e n é a quantidade de droga máxima que se liga especificamente ao nucleotídeo, mol de droga/mol de nucleotídeo.

Os valores obtidos da titulação foram colocados na forma de gráfico de Scatchard com r/C contra r , como demonstra a Figura 62.

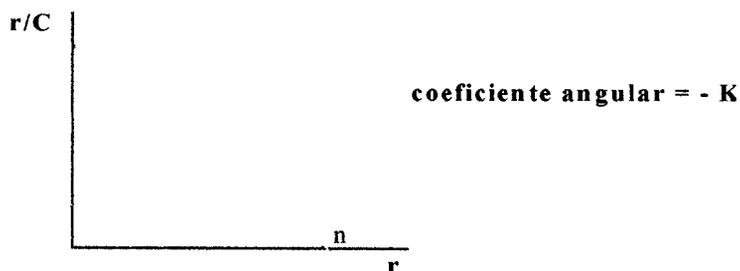


Figura 62. Gráfico de Scatchard, r contra r/C , onde r é o número de moles de droga ligada por mol de nucleotídeo e C é a concentração de droga livre.

3.2.12. Espectros de fluorescência das drogas

As medidas de fluorescência foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho ótico de: 1 cm. Foi utilizada uma concentração fixa de droga e sem ou com concentrações aumentadas de DNA. A excitação foi realizada no máximo de absorção na região UV para cada droga e medida a emissão. Os parâmetros de ligação foram obtidos por gráfico de Scatchard como descrito no item anterior. Nas experiências de supressão (quenching) da fluorescência, utilizou-se a equação de Stern-Volmer,

$$I_0/I_t = 1 - K_{sv} [DNA]$$

onde I_0 e I_t são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de DNA, respectivamente; K_{sv} é a constante de supressão, que é a medida da eficiência da supressão do DNA (LePecq & Paoletti, 1967; Sen & Maiti, 1994; Suppan, 1994).

3.2.13. Análise estatística

Foi utilizado o teste t , de Student, para as amostras controle em relação ao experimental. Todos os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo (Mitidieri & Mitidieri, 1978).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Citotoxicidade das drogas *in vitro*

Neste trabalho investigamos a sensibilidade *in vitro* de células de tumores murinos, carcinoma de Ehrlich e S180, submetidas a bioensaios com substâncias sintéticas e naturais.

Os métodos selecionados para esta investigação foram:

- a) O método colorimétrico de Mossman com o sal de tetrazólio, MTT, foi escolhido por ser um ensaio rápido e sensível além de possibilitar a análise de grande número de amostras (Mossman, 1983). Neste método as enzimas desidrogenases encontradas nas células viáveis reduzem o substrato MTT, de cor amarela, para o produto formazana insolúvel, de cor púrpura, que é solubilizado em isopropanol acidificado (Figura 63). A concentração de formazana é proporcional à quantidade de desidrogenases presente nas células vivas, respeitando-se o limite estabelecido na reação experimental (Mossman), sendo determinada através da absorbância medida em $\lambda = 570 \text{ nm}$

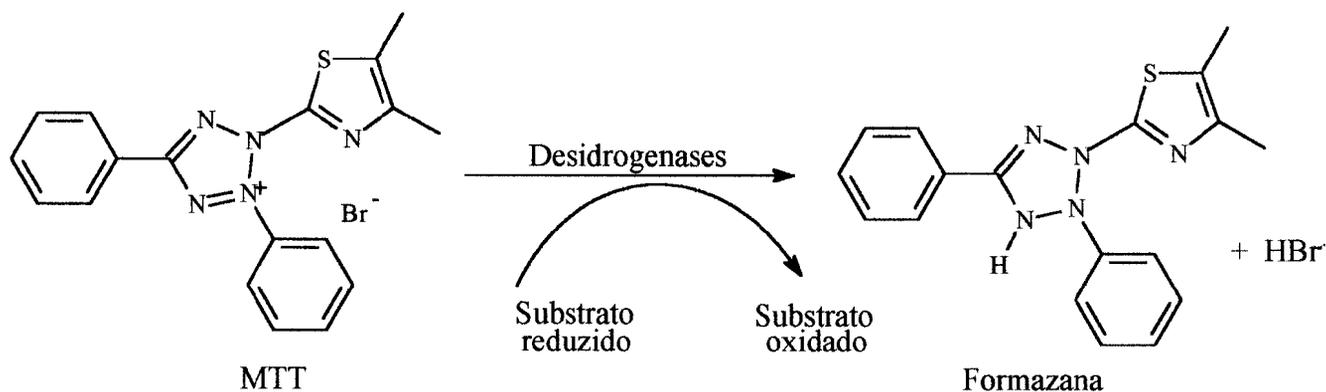


Figura 63. Bioredução do MTT na presença das enzimas desidrogenases para produzir a formazana. Nesta reação é representada a alteração molecular do aceptor de elétrons MTT.

b) Inibição da incorporação de precursores com o uso de nucleotídeos radiomarcados após a exposição das células à ação das drogas. Após um tempo relativamente curto de exposição dos precursores [³H]-timidina e [³H]-leucina mediou-se em aparelho de cintilação líquida a radioatividade incorporada em contagem por minuto (cpm) em cada uma das experiências em macromoléculas, DNA e proteínas, respectivamente (Grynberg *et al.*, 1992).

4.1.1. Ensaio colorimétrico com MTT

4.1.1.1. Derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina

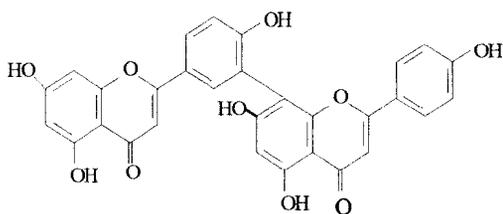
Os resultados da atividade *in vitro* observados nos bioensaios com os novos agentes foram relatados anteriormente por nosso grupo (Amoras, 1997; Da Silva, 1998). Os cloretos de 4-fenil-5-(4'-X-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, [X= H (**MI-A**), OCH₃ (**MI-C**) e NO₂ (**MI-D**)] apresentaram atividade *in vitro* contra o carcinoma de Ehrlich, em cultura de 24 horas, através do ensaio da redução do MTT por desidrogenases (Mossman, 1983). Os valores obtidos de IC₅₀ em μM (μg/mL) para **MI-A**, **MI-C** e **MI-D** foram 17,9 μM (7,0 μg/mL), 34,1 μM (14,4 μg/mL) e 7,8 μM (3,4 μg/mL), respectivamente, Tabela 3.

Os ensaios contendo derivados mesoiônicos na presença de MTT em meio RPMI completo contendo DMSO 0,3% (brancos) não apresentaram reação.

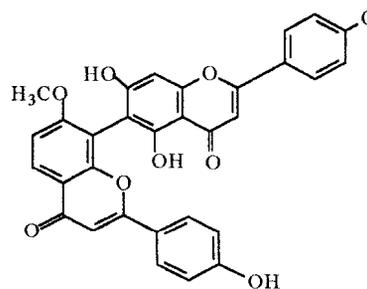
Os sistemas mesoiônicos presentes em numerosos compostos revelaram atividade biológica (Kier & Roche, 1967; Newton & Ramsden, 1982; Hiremath *et al*, 1994; Vilpo *et al.*, 1997). Em trabalhos anteriores demonstramos a atividade antitumoral significativa, observada *in vitro* e *in vivo*, do cloreto de 1,3-difenil-2-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,3,4-triazólio-5-tiolato (Shinzato *et al*, 1989) e dos derivados de aril-sidnonas 3-[4-X-3-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olatos (X = Cl e pirrolidino, Grynberg *et al*, 1992). Recentemente, Cadena *et al*, 1998, relacionaram a atividade citotóxica do mesoiônico **MI-D** à sua ação como desacoplador da fosforilação oxidativa.

4.1.1.2. Flavonóides

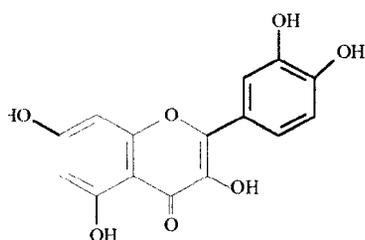
A atividade citotóxica dos flavonóides 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada, quercetina e rutina sobre as células de Ehrlich, em cultura de 48 horas, foi medida pelo ensaio do MTT.



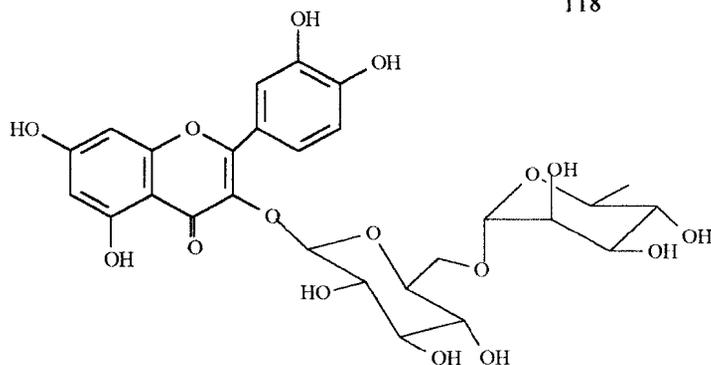
Amentoflavona



7''-O-metilagatisflavona



Quercetina



Rutina

Verificou-se que o efeito inibidor dos diferentes flavonóides sobre o crescimento de células de Ehrlich é dose-dependente (Figura 64). A comparação dos valores percentuais de inibição da atividade de desidrogenases nas células tratadas com estas substâncias e do controle (100%) permitiu calcular a concentração da droga, em μM ou $\mu\text{g/mL}$, que inibe em 50% a atividade da enzima (IC_{50}). Os valores de IC_{50} foram obtidos a partir do gráfico de % de inibição da atividade das desidrogenases contra o logaritmo das concentrações da droga ensaiada. Esta análise forneceu IC_{50} de 5,1 $\mu\text{g/mL}$ (10 μM) para a 7"-O-metilagatisflavona, de 13,4 $\mu\text{g/mL}$ (23,9 μM) para a amentoflavona, de 21,4 $\mu\text{g/mL}$ (26,3 μM) para a amentoflavona acetilada, 15 $\mu\text{g/mL}$ (29,6 μM) para a quercetina e > 70 $\mu\text{g/mL}$ (115 μM) para a rutina.

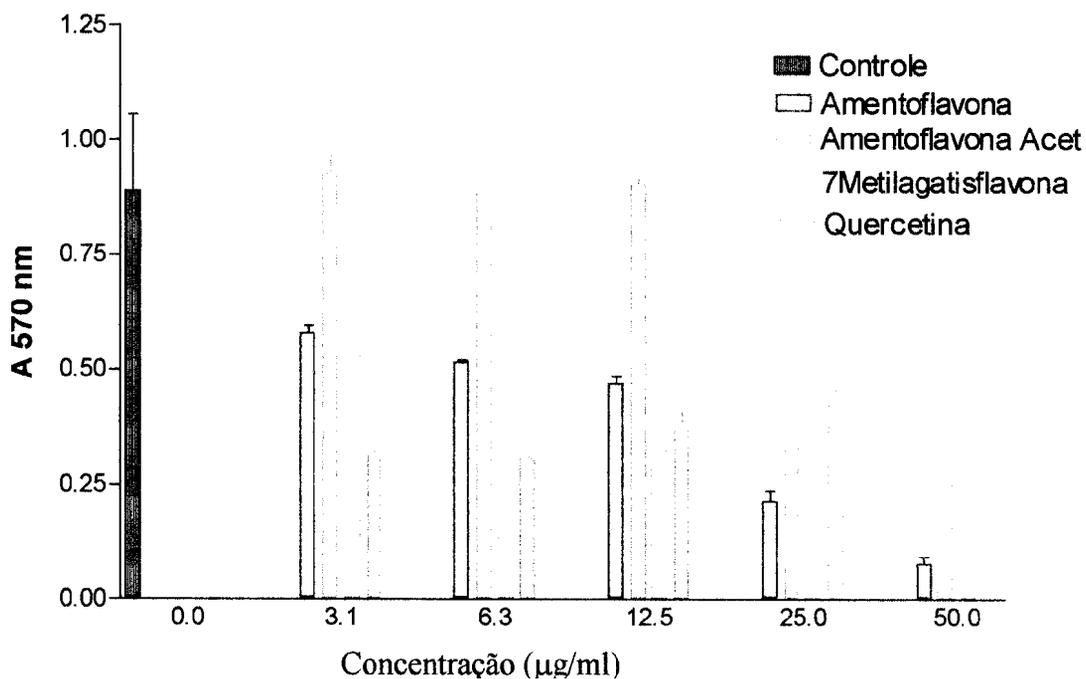


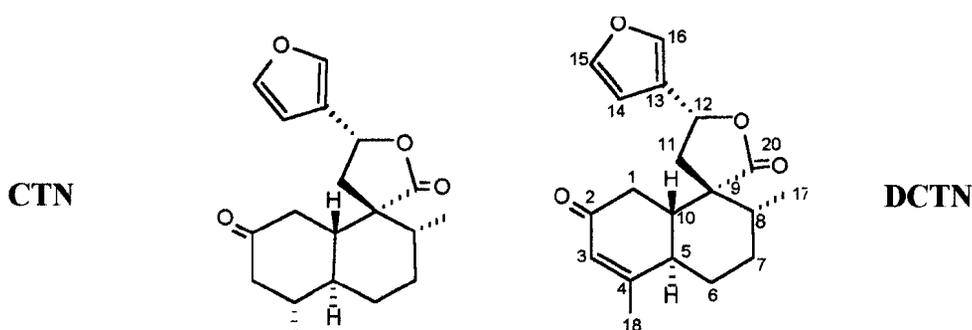
Figura 64. Efeito de várias concentrações dos flavonóides 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada e quercetina em cultura de células de Ehrlich, durante 48 horas na inibição das desidrogenases.

A biflavona 7"-O-metilagatisflavona apresentou-se como a droga mais potente nas condições deste ensaio e a rutina não foi citotóxica. A amentoflavona apresentou resultado semelhante à amentoflavona acetilada. Já havia sido relatado que alguns flavonóides hidroxilados inibem a proliferação de várias células tumorais, como as células de Ehrlich, L1210, HeLa, de mama e de cólon (Kandaswami *et al.*, 1992). Flavonóides naturais, incluindo-se a quercetina, têm ampla atividade biológica. A quercetina tem atividade contra HIV integrase o que não ocorre com a rutina (Fesen *et al.*, 1994). A biflavona amentoflavona, (e.g.), constituinte do *Ginko biloba*, (Joyeux *et al.*, 1995), e a quercetina têm atividade antilipoperoxidante, aparecendo significativamente reduzida na rutina. Esses resultados evidenciam a necessidade de grupo OH livre no carbono 3 do anel C da

quercetina para essas atividades. Além do mais, os flavonóides com hidroxilas vicinais no anel B podem ser transformadas por reações de autooxidação, produzindo quinonas correspondentes e gerar radicais de oxigênio capazes de provocar dano no DNA, interferindo na replicação (Kandaswami *et al.*, 1992).

4.1.1.3. Diterpenos DCTN e CTN

A atividade citotóxica dos diterpenos crotonina (**CTN**) e desidrocrotonina (**DCTN**) sobre as células de Ehrlich, em cultura de 48 horas, foi deduzida através de resultados obtidos por dosagem de desidrogenases.



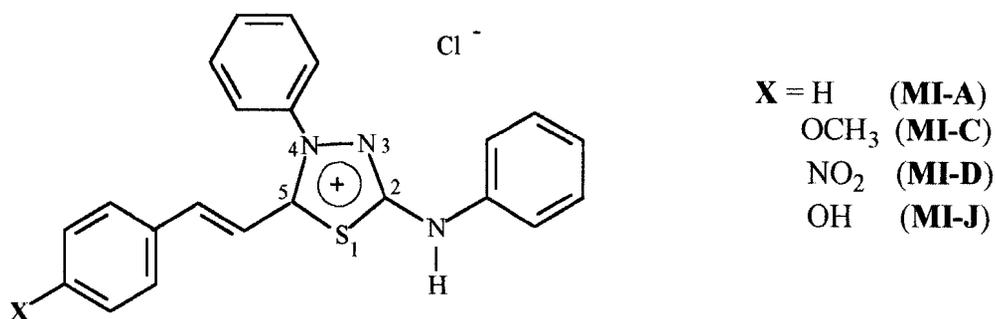
Obteve-se os valores de IC_{50} de 51,8 $\mu\text{g/mL}$ (16 μM) para o **CTN** e de 52,2 $\mu\text{g/mL}$ (16 μM) para o **DCTN**. No ensaio usando as células de Ehrlich, os diterpenos **CTN** e **DCTN** revelaram citotoxicidade similar.

4.1.2. Inibição da incorporação de precursores de isótopos radioativos

4.1.2.1. Derivados mesoiônicos

A atividade citotóxica dos produtos sintéticos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** foi estudada através da incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina e de $[^3\text{H}]$ -leucina na síntese de DNA (Figura 65) e de proteínas em células de S180 (Figura 66), após o período de 48 horas. Os

resultados de incorporação de precursores radioativos obtidos na verificação da síntese de DNA e de proteínas mostraram atividade citotóxica dependente da dose dos quatro produtos contra o S180. Esta inibição apresentou-se dependente da dose. Os valores obtidos de IC₅₀ em µM para **MI-A**, **MI-C**, **MI-J** e **MI-D** para a síntese de proteínas e de DNA, em cultura de 48 horas, estão apresentados na Tabela 3.



Cloreto de 4-fenil-5-[4'-X-fenil]1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina

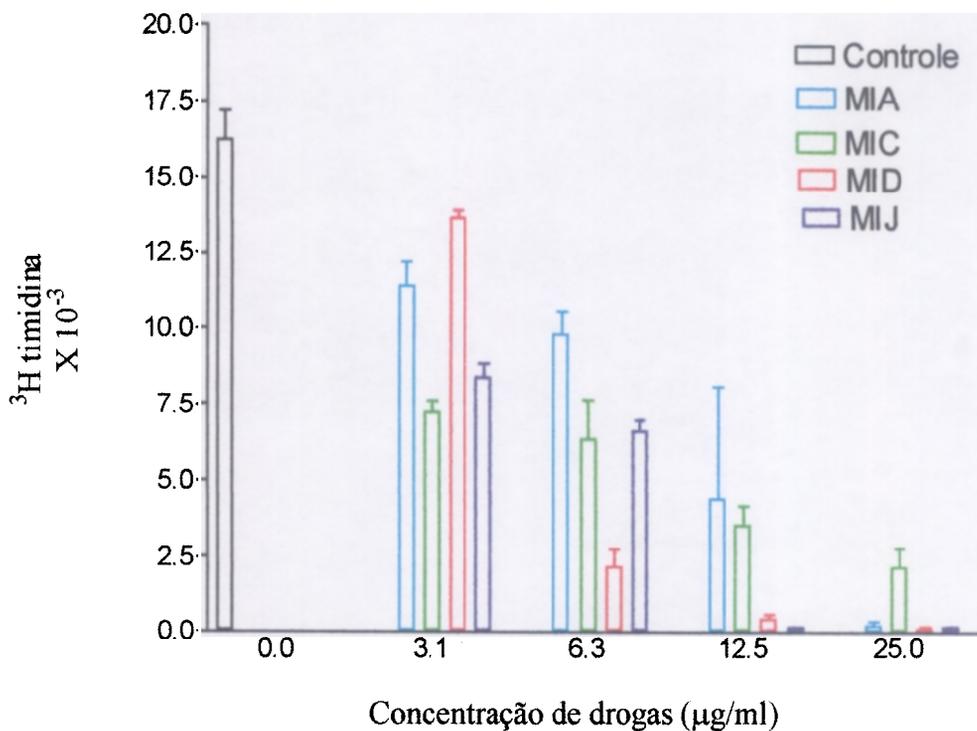


Figura 65. Efeito de produtos mesoiônicos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** na síntese de DNA de células de S180 durante 48 horas em comparação com o controle.

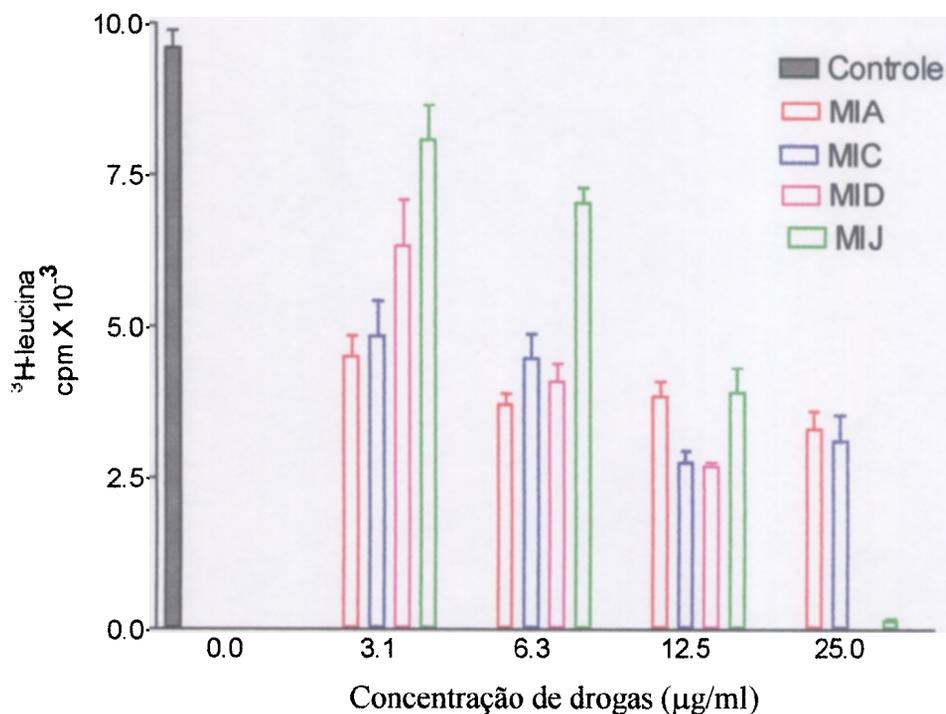
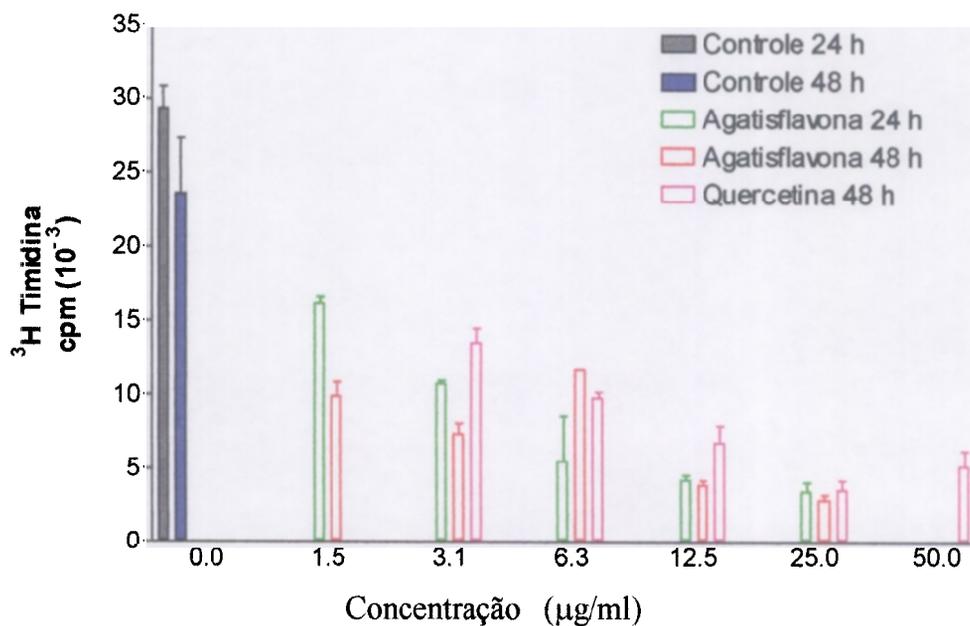


Figura 66. Efeito de produtos mesoiônicos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** na síntese de proteínas em de células de S180 durante 48 horas em comparação com o controle.

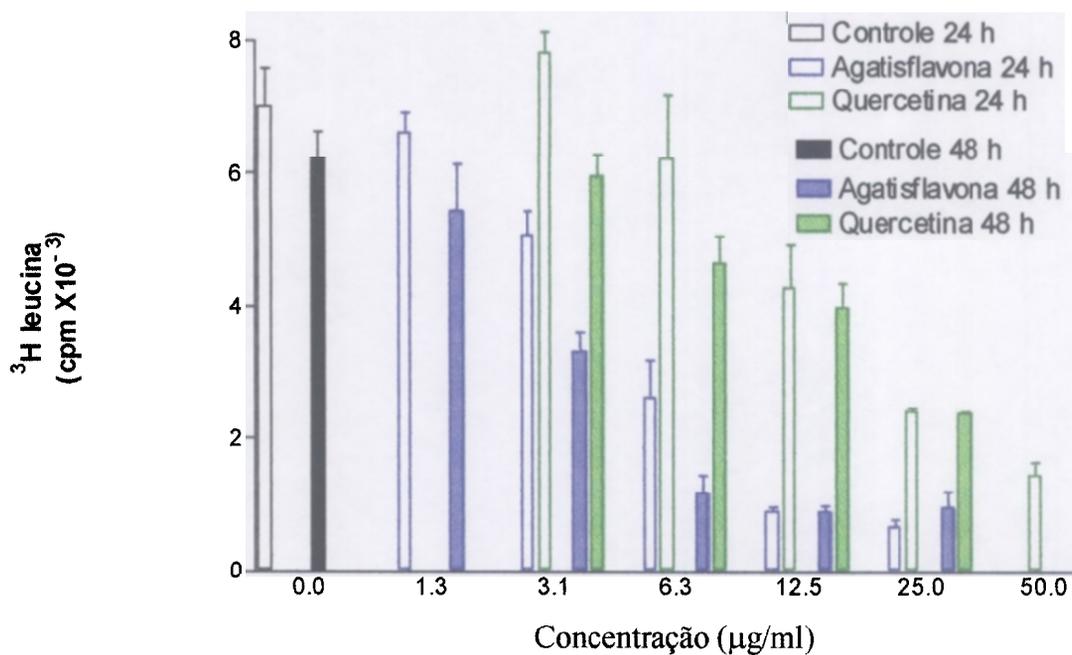
4.1.2.2. Flavonóides

Os flavonóides 7"-O-metilagatisflavona e quercetina inibem a síntese de DNA (Figura 67 a) e de proteínas (Figura 67 b) em cultura de células de S180 por 24 e 48 horas em comparação com células controle. Esta inibição apresentou-se dependente da dose. Os valores de IC_{50} , em $\mu\text{g/mL}$ (μM), para a síntese de proteínas e de DNA, em cultura de 48 horas: de 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (6,8 μM) e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (2,9 μM) para a 7"-O-metilagatisflavona e de 24 $\mu\text{g/mL}$ (47,4 μM) e 11,5 $\mu\text{g/mL}$ (22,6 μM) para a quercetina, respectivamente. Assim, a 7"-O-metilagatisflavona mostrou-se um inibidor mais potente da síntese de proteínas e de DNA do que a quercetina.

Vários mecanismos podem estar envolvidos na atividade citotóxica na ação dos flavonóides poli-hidroxilados. Eles são inibidores de proteínas tirosina cinases, como já se verificou para a quercetina e a genisteína (Cody *et al.*, 1987; Traganos *et al.*, 1992; Dewick, 1998; Theodorescu *et al.*, 1998), podendo interagir com os sítios de ligação para o estrogênio do tipo II, competindo com o estradiol, inibir deste modo o crescimento de células de câncer de mama humanas (Scambia *et al.*, 1990; Kandaswami *et al.*, 1992).



(a)



(b)

Figura 67. Efeito de flavonóides 7''-O-metilagatisflavona e quercetina na síntese de DNA (a) e de proteínas (b) em células de S180 durante 24 e 48 horas em comparação com o controle.

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os valores de IC_{50} obtidos para os produtos sintéticos e os flavonóides naturais utilizando os dois métodos de análise citotóxica, ensaio do MTT e incorporação de isótopos radioativos. Esses resultados permitem concluir que o flavonóide quercetina foi a droga menos citotóxica em comparação aos outros produtos naturais ensaiados.

Tabela 3. Valores de IC_{50} para os derivados mesoiônicos em cultura de células de tumores S180 e Carcinoma de Ehrlich.

Derivados mesoiônicos	IC_{50} (μM)*		IC_{50} (μM)
	Síntese de proteínas S180 (cultura de 48 horas)	DNA	Dosagem de desidrogenases Carcinoma de Ehrlich (cultura de 24 horas)**
MI-A	7,1	19,9	17,9
MI-C	9,5	5,9	34,1
MI-D	12,6	10,3	7,8
MI-J	28,2	8,8	-

* IC_{50} = representa a concentração de droga em μM que inibe em 50% o crescimento de células em pelo menos 2 experiências. Esses valores apresentam uma variação de desvio padrão de 5 a 15% entre as experiências.

** Valores de IC_{50} para as desidrogenases tratadas com mesoiônicos em cultura de 24 horas obtidos dos trabalhos de Amóras, 1997; Da Silva *et al.*, 1997.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ para os flavonóides em cultura de células de tumores S180 e Carcinoma de Ehrlich.

Flavonóides	IC ₅₀ (μM)*		IC ₅₀ (μM) Dosagem de desidrogenases Carcinoma de Ehrlich (cultura de 48 horas)
	Síntese de Proteínas S180 (cultura de 48 horas)	DNA	
Agatisflavona	6,8	2,9	10
Amentoflavona	-	-	23,9
Amentoflavona acetilada	-	-	26,3
Quercetina	47,4	22,6	29,6
Rutina	-	-	> 115

*IC₅₀= representa a concentração de droga em μM que inibe em 50% o crescimento células em cultura de 48 horas em pelo menos duas experiência. Esse valores apresentam uma variação de desvio padrão de 5 a 15% entre as experiências.

4.2. Atividade antitumoral *in vivo*

4.2.1. Derivados mesoiônicos

A atividade antitumoral dos derivados **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** foi avaliada nos tumores S180 e carcinoma de Ehrlich, via ip (Tabela 5), iniciando-se com a dose máxima tolerada. Os derivados X= H (**MI-A**) e OCH₃ (**MI-C**) não apresentaram atividade contra os tumores ensaiados nas doses de 20 e 30 mg/kg. Em contraste, os derivados onde X= OH (**MI-J**) nas doses de 30, 46 e 60 mg/kg e X-NO₂ (**MI-D**) nas doses de 10 e 30 mg/kg mostraram atividade significativa contra S180.

Após estes resultados, os derivados **MI-D** e **MI-J** foram ensaiados contra o carcinoma de Ehrlich via ip na dose 25 mg/kg nos dias 1 e 5, revelando resultados comparáveis aos de S180.

A análise dos parâmetros hematológicos, hematócrito, contagem global e específica de leucócitos, envolvendo a comparação com os animais controle, mostrou que não houve alteração significativa nos animais tratados com as substâncias **MI-D** e **MI-J** na dose total de 30 mg/kg via ip (Tabela 6). Os resultados mostraram que **MI-D** e **MI-J** não são tóxicos nas doses ensaiadas, estando os valores hematológicos encontrados para neutrófilos e linfócitos para a substância **MI-D** dentro dos valores normais relatados na literatura (Williams, 1976; Ferreira *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos nas doses e esquemas de tratamento utilizados mostraram que **MI-A** (X=H) não apresentou atividade antitumoral. No entanto, a substituição de H por NO₂ (**MI-D**) e OH (**MI-J**), que são substituintes mais hidrofílicos, resultou em aumento da atividade antitumoral. Com base nestes resultados pode-se sugerir que as cargas existentes no mesoiônico se tomam mais deslocalizadas devido a presença de substituintes mais polares (Echevarria & Miller, 1989) aumentando a atividade pelas interações eletrostáticas com biomoléculas como DNA e proteínas. A substituição do grupo OH no derivado mesoiônico (**MI-J**) por OMe (**MI-C**), um grupo mais lipofílico, produziu diminuição no efeito sobre o tumor de Ehrlich e S180, corroborando com a proposta de que um grupo mais hidrofílico contribuiu para a atividade antitumoral nos derivados 1,3,4-tiadiazólios-2-aminida. Os resultados da atividade antitumoral *in vivo* desses compostos já foram publicados (Grynberg *et al.*, 1997).

Tabela 5. Efeito do tratamento com derivados mesoiônicos no crescimento *in vivo* de tumores ascíticos S180 e Carcinoma de Ehrlich.

Tumor ^a	Derivados	X	Esquema ^b (dias)	Dose total (mg/kg)	%T/C ^c
S180	MI-A	H	1 e 6	20	103
				30	100
	MI-C	OCH ₃	1 e 6	20	100
				30	115
	MI-D	NO ₂	1 e 6	10	208
				30	160
	MI-J	OH	1,2 e 6	30	155
46				170	
60				170	
			1 e 5	30	130
Carcinoma de Ehrlich	MI-A	H	1 e 6	30	100
	MI-C	OCH ₃	1 e 6	30	100
	MI-D	NO ₂	1 e 5	25	176
	MI-J	OH	1 e 5	25	135

^a Células tumorais (5×10^5) foram implantadas via ip em camundongos singênicos C₃H e C57 Bl/10 no dia zero.

^b As drogas foram administradas em 0,06 mL de 80 % de DMSO em salina, via ip, nos animais tratados ou só a mistura solvente nos animais controles.

^c % T/C > 125 indica atividade significativa.

Tabela 6. Valores hematológicos dos animais sem tumor tratados com **MI-D**, **MI-J**, salina e solvente.

Valores hematológicos	Salina	DMSO	MI-D	MI-J
Hematócrito (%)	50,5 (± 2,1)	49,7 (± 1,2)	51,5 (± 0,5)	50,0 (± 1,4)
Leucócitos (X10³/mm³)	10 (± 5,8)	8 (± 1,9)	9 (± 0)	9,5 (± 5,0)
Basófilos (%)	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	14,0 (± 4,1)	11,5 (± 7,5)	30,3 (± 5,2)	17,5 (± 12,0)
Linfócitos (%)	78,5 (± 5,1)	75,0 (± 16,1)	61,0 (± 4,1)	76,0 (± 9,0)
Monócitos (%)	6,0 (± 3,0)	12,1 (± 0,8)	7,3 (± 4,4)	5,0 (± 2,0)
Eosinófilos (%)	1,5 (± 0,9)	1,4 (± 0,8)	1,4 (± 1,0)	1,0 (± 1,0)
Metamielócitos (%)	0	0	0	0
Mielócitos (%)	0	0	0	0

Os valores hematológicos são a média (± DP) da análise do sangue de 3 camundongos injetados com salina, mistura solvente ou com as drogas **MI-D** e **MI-J** no esquema de tratamento com 2 doses (total de 25 mg/kg) para cada grupo.

4.2.1.1. Análise de fator de necrose de tumor (TNF- α)

O sobrenadante de ascite de animais portadores do tumor de Ehrlich tratados com **MI-D** nos dias 1 e 5, na dose de 25 mg/kg, apresentou atividade significativa no TNF- α usando comparação o controle de camundongos portadores de tumor tratados só com o solvente (Figura 68). O efeito produzido por 30 ng/mL de TNF recombinante de camundongo que matou 85% das células WEHI foi utilizado como controle. Estes resultados sugerem que, parte da atividade antitumoral do **MI-D** pode ser atribuída a ação moduladora da resposta biológica.

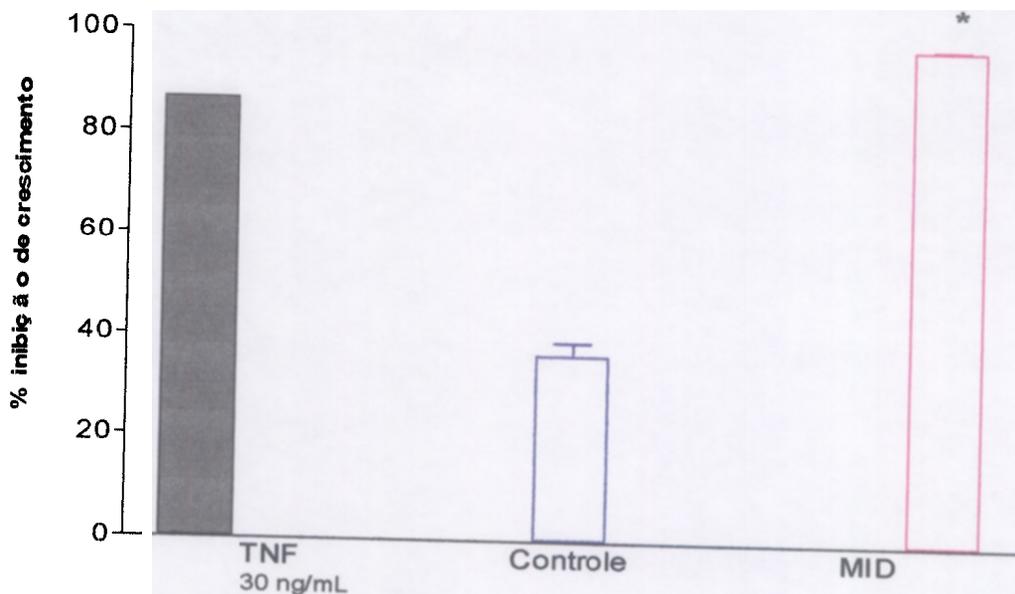


Figura 68. Inibição do crescimento de células WEHI 164 por sobrenadante de tumor de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ip tratados com **MI-D** e solvente (controle) em comparação com o padrão de TNF- α .

Padrão de TNF- α 30 ng/mL

* $p < 0,05$

Macrófagos ativados podem secretar TNF que mata células tumorais (North & Havell, 1988; Abbas *et al.*, 1994). Um dos mecanismos propõe que o TNF pode causar necrose de tumor por mobilizar a resposta do hospedeiro agindo sobre tumores vascularizados. Alguns fatores angiogênicos potenciam a resposta do TNF (Abbas *et al.*, 1994). Recentemente, Zhai *et al.*, 1999, demonstraram que uma nova citocina da família do TNF, secretada em células de tumor de cólon, inibe *in vivo* o crescimento do tumor sólido em camundongos e é um inibidor de angiogênese. Além disso, o TNF ativa macrófagos podendo liberar óxido nítrico por ativação de óxido nítrico sintase. O óxido nítrico é citotóxico para células tumorais (Klostergaard *et al.*, 1991).

Em nosso trabalho, verificamos a liberação de óxido nítrico no sobrenadante de ascite tumoral nos animais tratados com **MI-D** (resultados não mostrados). Em trabalho anterior,

usando-se derivados 1,3,4-triazólio-tiolato, observou-se a necrose dos tumores carcinoma de Ehrlich e S180, após tratamento intratumoral (Echevarria *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos com os derivados mesoiônicos, entre eles o **MI-D**, estimulam a procura de novos alvos para investigar a ação desses compostos.

4.2.2. Terpenóides CTN e DCTN

4.2.2.1. Atividade antitumoral

A atividade antitumoral dos diterpenos **CTN** e **DCTN** em comparação com o 5-FU em animais portadores de tumor de Ehrlich e de S180, foi analisada em diferentes esquemas de tratamento (Tabela 7) Verificou-se que somente o derivado **DCTN** apresentou atividade antitumoral significativa na dose de 84 mg/kg para o S180 (T/C% 137) e de 120 mg/kg para o tumor de Ehrlich (T/C % 128). O 5-FU utilizado como controle positivo apresentou atividade antitumoral significativa de T/C 140% para o S180, semelhante ao derivado **DCTN** na mesma faixa de concentração, ou seja 0,292 μ M para o 5-FU e 0,257 μ M para o **DCTN** (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do tratamento com **CTN**, **DCTN** e 5-FU no crescimento *in vivo* de tumor ascítico S180 e Carcinoma de Ehrlich.

Drogas	Tumor^a	Tratamento^b (dias)	Dose total		%T/C^c
			(mg/kg)	(mmol/kg)	
5-FU	S180	1 e 2	38	0,292.10 ⁻³	140
DCTN**	S180	1 e 2	84	0,257	137
		1 e 6	33,3	0,102	91
CTN	S180	1 e 2	80	0,244	121
DCTN	Ehrlich	1,2 e 3	120	0,368. 10 ⁻³	128
CTN	Ehrlich	1,2 e 3	120	0,365, 10 ⁻³	110
5-FU	Ehrlich	1,2 3 e 6	80	0,615.10 ⁻³	144

^a Células tumorais (5×10^5) foram implantadas via ip em camundongos singênicos DBA/2 no dia zero.

^b As drogas foram administradas em DMSO/salina, via ip, nos animais tratados ou só a mistura solvente nos animais controles. ^c % T/C > 125 indica atividade significativa.

4.2.2.2. Análise de fator de necrose de tumor TNF- α

Realizou-se o ensaio da atividade de TNF- α no sobrenadante de ascite de animais portadores de tumor de Ehrlich tratados com os diterpenos **DCTN** e **CTN**. Os animais tratados com o diterpeno **DCTN** na dose de 120 mg/kg apresentaram atividade significativa para TNF- α em comparação com o controle do sobrenadante de camundongos portadores de tumor tratados só com o solvente (Figura 69).

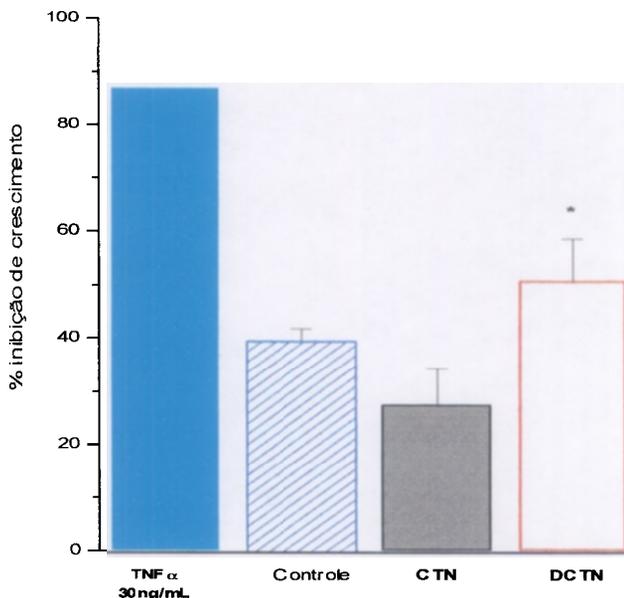


Figura 69. Inibição do crescimento de células WEHI 164 por sobrenadante de tumor de animais portadores de carcinoma de Ehrlich ip tratados com os diterpenos CTN e DCTN e solvente (controle) em comparação com o padrão de TNF- α .

Padrão de TNF- α 30 ng/mL

* $p < 0,05$

O aumento da sobrevivência de animais portadores de tumor de Ehrlich e de S180 tratados com DCTN pode ser devido à morte celular pelo aumento de TNF- α , secretado na área do tumor. Os macrófagos aparecem como a fonte primária de TNF e estão presentes em tumores murinos em grande número (Havell *et al.*, 1988; North & Havell, 1988; Hasday *et al.*, 1990). Outros diterpenos, como o taxol, aumentam a produção de TNF (Mullins *et al.*, 1997). Diversos fatores podem estar envolvidos na resposta biológica de diterpenos, inclusive os estruturais. O diterpeno DCTN apresenta um sistema carbonílico α,β insaturado capaz de funcionar como centro de atividade eletrofílica para reagir com sítios nucleofílicos de outras biomoléculas (Wattenberg, 1995), podendo responder pela atividade antitumoral significativa. Assim, a ausência deste centro reativo no diterpeno CTN, pode ser usada para justificar o seu comportamento diferente, já que não apresentou esta

atividade. Em trabalho recente (Costa *et al.*, 1999), verificou-se que o diterpeno DCTN tem efeito anti-estrogênico em ratos. Os anti-estrogênios são importantes no tratamento de cânceres de mama humanos dependentes de estrogênio (DeVita *et al.*, 1997). A atividade anti-estrogênica e o aumento de TNF- α podem estar envolvidos na atividade antitumoral do diterpeno **DCTN** contra carcinoma de Ehrlich, que é um tumor derivado de carcinoma de mama espontâneo de camundongo (Song *et al.*, 1993). Este trabalho, envolvendo os diterpenos **CTN** e **DCTN** foi aceito recentemente para publicação (Grynberg *et al.*, *in press*).

4.2.3. Flavonóides: 7"-O-metilagatisflavona e Quercetina

4.2.3.1 Atividade antitumoral

A atividade antitumoral dos flavonóides 7"-O-metilagatisflavona e quercetina foi avaliada em animais portadores de tumor S180 ip, após tratamento dos animais nos dias 1 e 2, usando-se o 5-FU para comparação no mesmo esquema de tratamento. Verificou-se a 7"-O-metilagatisflavona injetada nos dias 1, 2, 7 e 8 após a inoculação ip de S180 na dose total de 38 mg/kg não apresentou atividade antitumoral. Quando injetou-se maior quantidade de 7"-O-metilagatisflavona 140 mg/kg no mesmo esquema de tratamento, verificou-se que a droga foi tóxica para os animais. Os flavonóides apresentaram atividade antitumoral significativa na dose de 80 mg/kg injetados nos dias 1 e 2 para a agatisflavona (T/C % 140) e de 120 mg/kg para a quercetina (T/C % 128). O 5-FU utilizado como controle positivo na dose total de 75mg/kg apresentou atividade antitumoral significativa (T/C % 140). Os produtos naturais amentoflavona e rutina nos esquemas ensaiados com

doses totais de 30 mg/kg não revelaram atividade contra o tumor S180. Os resultados obtidos para a atividade antitumoral *in vivo* dos flavonóides está resumida na Tabela 8.

Esses resultados estão de acordo com observações anteriores, indicando que a quercetina apresenta atividade antitumoral em alguns tumores como o de Ehrlich (Suolina *et al.*, 1975; Kandaswami *et al.*, 1992) e carcinoma da cabeça (Castillo *et al.*, 1989). Outros flavonóides, como o derivado sintético flavonil(5→ α)acético, e o ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético, estão sendo ensaiados em clínica devido a atividade em tumores sólidos (Bibby *et al.*, 1991; Thomsen *et al.*, 1991). Essa atividade antitumoral é atribuída, à indução de TNF e ao aumento da liberação de nitrito nos tumores (Thomsen *et al.*, 1991).

Tabela 8. Efeito do tratamento com 7"-O-metilagatisflavona, quercetina e 5 -FU no crescimento *in vivo* de tumor ascítico S180.

Drogas	Tumor^a	Tratamento (dias)	Dose total^b (mg/kg)	%T/C^c
5-FU	S180	1 e 2	38	140
7"-O-metil agatisflavona	S180	1, 2, 7, e 8	38	100
		1 e 2	80	140
Quercetina		1 e 2	120	128

^a Células tumorais (5×10^5) foram implantadas via ip em camundongos singênicos DBA/2 no dia zero.

^b As drogas foram administradas em 0,06 mL de DMSO 80% em salina, via ip, nos animais tratados ou só a mistura solvente nos animais controles.

^c % T/C > 125 indica atividade significativa.

4.3. Interação de drogas com o DNA do timo e de fago

No estágio atual, o tratamento do câncer encontra-se ainda cheio de paradoxos, como consequência das drogas ocorrendo inclusive o aparecimento da própria doença em circunstâncias apropriadas. O alvo principal de muitas drogas anti-câncer é a inativação da replicação do DNA, processo necessário para a divisão celular. Essas drogas, portanto, são na maioria das vezes inibidoras da síntese de ácidos nucleicos e podem interagir com o DNA, distorcendo sua estrutura e, conseqüentemente inviabilizando sua função.

Devido a possibilidade da ação das drogas ser através da interação com o DNA, estudamos o comportamento desta biomolécula sob a ação de alguns derivados mesoiônicos e flavonóides usando inclusive a espectrofotometria no UV, fluorescência e eletroforese em gel de agarose para avaliar a especificidade de ação destes produtos sintéticos e naturais.

4.3.1. Absorção no UV e fluorescência

Os derivados mesoiônicos e os flavonóides em solução apropriada comportam-se como monômeros, como pode ser deduzido pela análise dos espectros de RMN ^1H (Santos, 1992; Velandia, 1997; Moreira *et al.*, 1999). Os espectros de absorção das substâncias submetidas à investigação foram comparados com os das drogas padrões intercalante, o brometo de etídio e não intercalante, a campotecina (Bloomfield *et al.*, 1974; Liu, 1989).

4.3.1.1. Derivados mesoiônicos

Dos derivados mesoiônicos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** analisados por titulação espectrofotométrica no UV, somente o **MI-D** apresentou propriedades de interação com o DNA do timo. Sabe-se que a diminuição da absorção por interação de substâncias com o DNA é dependente da seqüência de bases no DNA e essa absorção é significativamente menor para s seqüências ricas em GC. O DNA do rimo apresenta 42% de seqüência GC (Nandi & Maiti, 1985). A Figura 70 mostra os espectros de absorção na região entre λ 200 a 500 nm de solução de 17,3 μM de **MI-D** em tampão TPE e após a adição de concentrações crescentes de DNA do timo.

A análise comparativa dos espectros de absorção envolvem um efeito hipocrômico na região de 406 nm, região de absorção característica do anel heterocíclico do **MI-D**, nas concentrações 17,3, 51,9, 121 e 141,9 μM de DNA. Este resultado indica interação do **MI-D** com o DNA. Para caracterizar esta interação, calculamos a constante de ligação K. Obteve-se pelo gráfico de Scatchard (Material e Métodos, item 3.2.11) a constante de associação $K = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Scatchard, 1949).

O espectro de absorção no UV do brometo de etídio (Figura 71) apresentou efeito hipocrômico e hipsocrômico da banda em λ 288 nm. Na maior concentração de DNA, 117 μM , o brometo de etídio apresentou uma banda larga na região entre 260 e 280 nm. O valor de $K = 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o brometo de etídio foi calculado pelo gráfico de Scatchard.

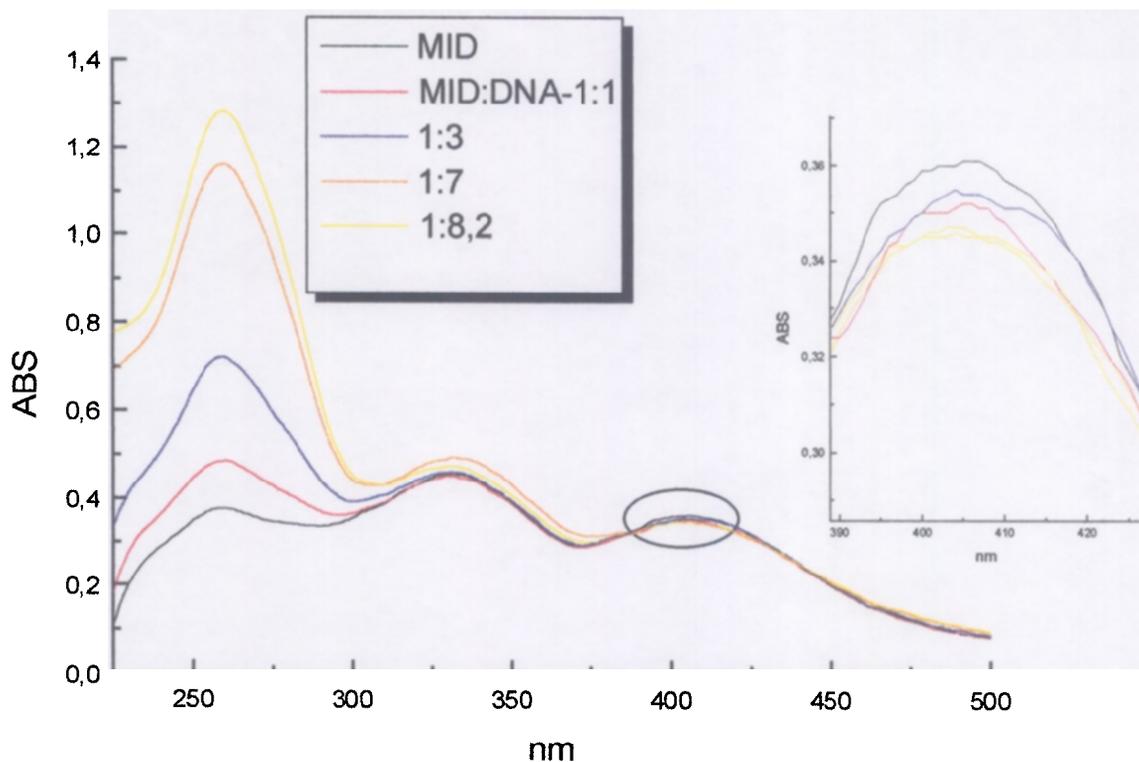


Figura 70. Espectros de absorção no UV da substância **MI-D** em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo. Ao lado, o espectro aumentado na região de absorção máxima de **MI-D**.

Relação **MI-D**:DNA 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:8,2 correspondendo respectivamente a 17,3, 51,9, 121 e 141,9 μM de DNA do timo.

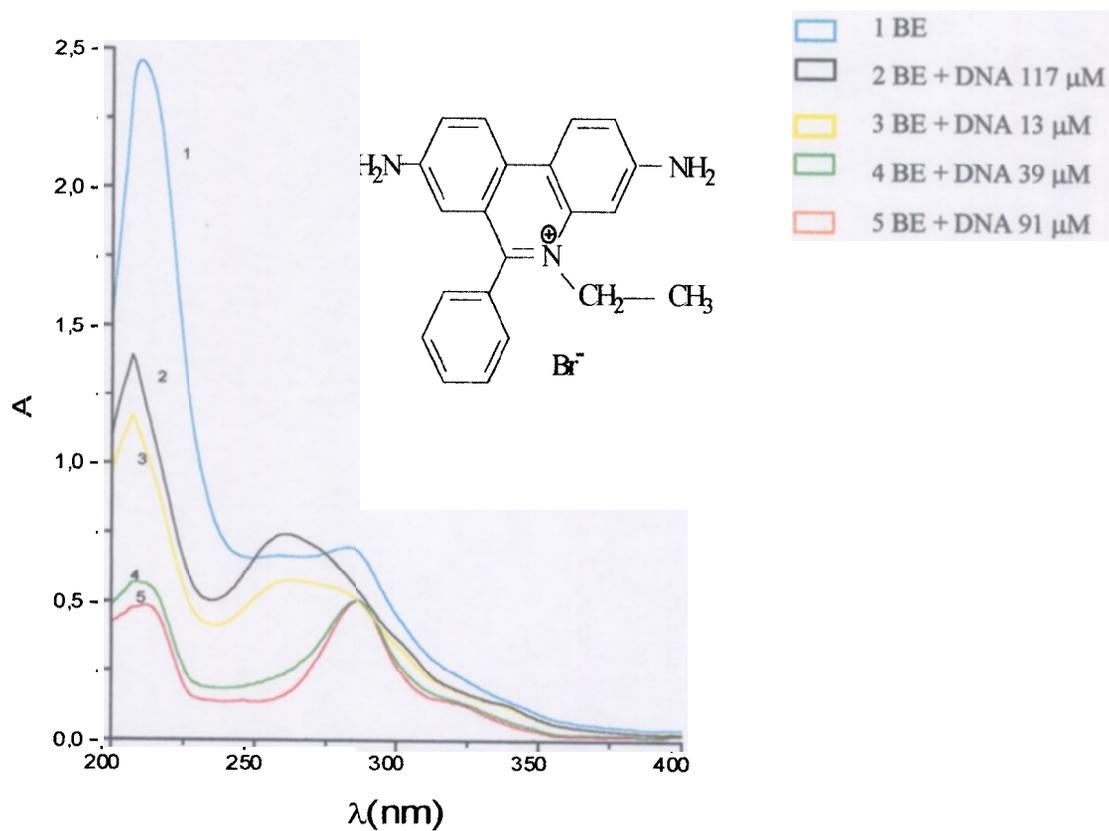


Figura 71. Espectro de absorção no UV do brometo de etídio em tampão TPE (1) e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo, 13, 39, 91 (3-5) e 117 μM (2).

Em trabalho recente, verificamos por espectrofotometria no UV que, a acridina laranja, agente intercalante do DNA, apresentou efeito hipocrômico e batocrômico com $K = 3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Da Silva *et al*, 1999).

A titulação espectrofotométrica no UV da campotecina em concentrações crescentes de DNA, apresentou efeito hipercrômico na região característica do anel heterocíclico (Figura 72).

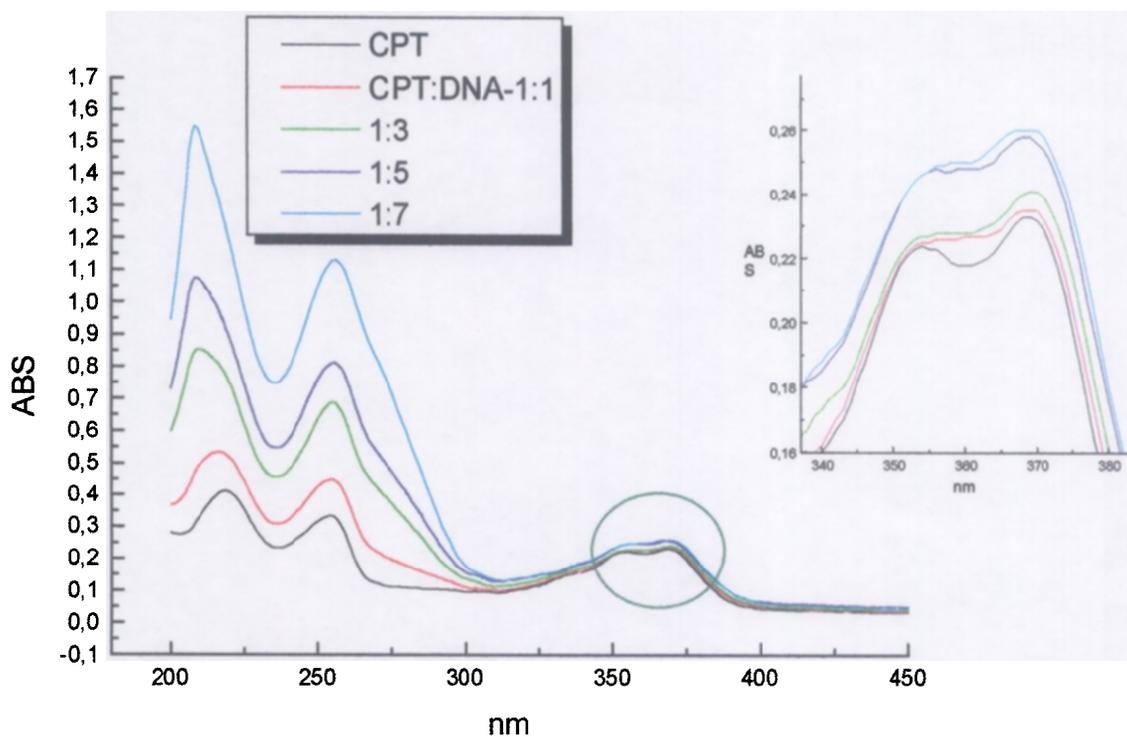


Figura 72. Espectros de absorção no UV da campotecina em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo. Ao lado, o espectro aumentado na região de absorção máxima da campotecina. Relação campotecina:DNA 1:1, 1:3, 1:5 e 1:7, correspondendo respectivamente a 17,3, 51,9, 86,5 e 121 μM de DNA do timo.

O efeito de interação dos derivados mesoiônicos com o DNA foi avaliado por análise do espectro de emissão de fluorescência da droga envolvendo também a presença de concentrações crescentes de DNA. O **MI-J** apresentou espectro com características de interação com o DNA após excitação em λ 424 nm e emissão máxima em λ 500-550 nm. No entanto, as características observadas revelaram o aumento de fluorescência na presença de concentrações crescentes de DNA (Figura 73), como observado para outras drogas intercalantes (Bloomfield *et al*, 1974).

O derivado **MI-D** apresentou espectro de fluorescência com características de interação com o DNA após excitação em λ 406 nm e a emissão máxima em λ 470 nm (Figura 74). A emissão característica do anel heterocíclico, apresentou efeito hipocrômico e batocrômico, na presença de concentrações crescentes de DNA. Nas concentrações de 13 e 39 μ M de DNA observou-se supressão de mais de 50% da fluorescência na ligação ao DNA, Figura 74, verificando-se deslocamento para a região do vermelho. No entanto, na concentração de 117 μ M de DNA observou-se um aumento da fluorescência, provavelmente devido a um efeito saturante da droga com excesso de DNA (Barton *et al*, 1986; Urano *et al*, 1991).

A análise da titulação por fluorescência do **MI-D** através do gráfico de Scatchard, permitiu deduzir a constante de ligação $K = 5,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Usando a medida de eficiência da supressão da fluorescência do **MI-D** em presença de concentrações crescentes de DNA através da equação de Stern-Volmer (Material e Métodos, item 3.2.12), obteve-se o valor de $K_{sv} = 6,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

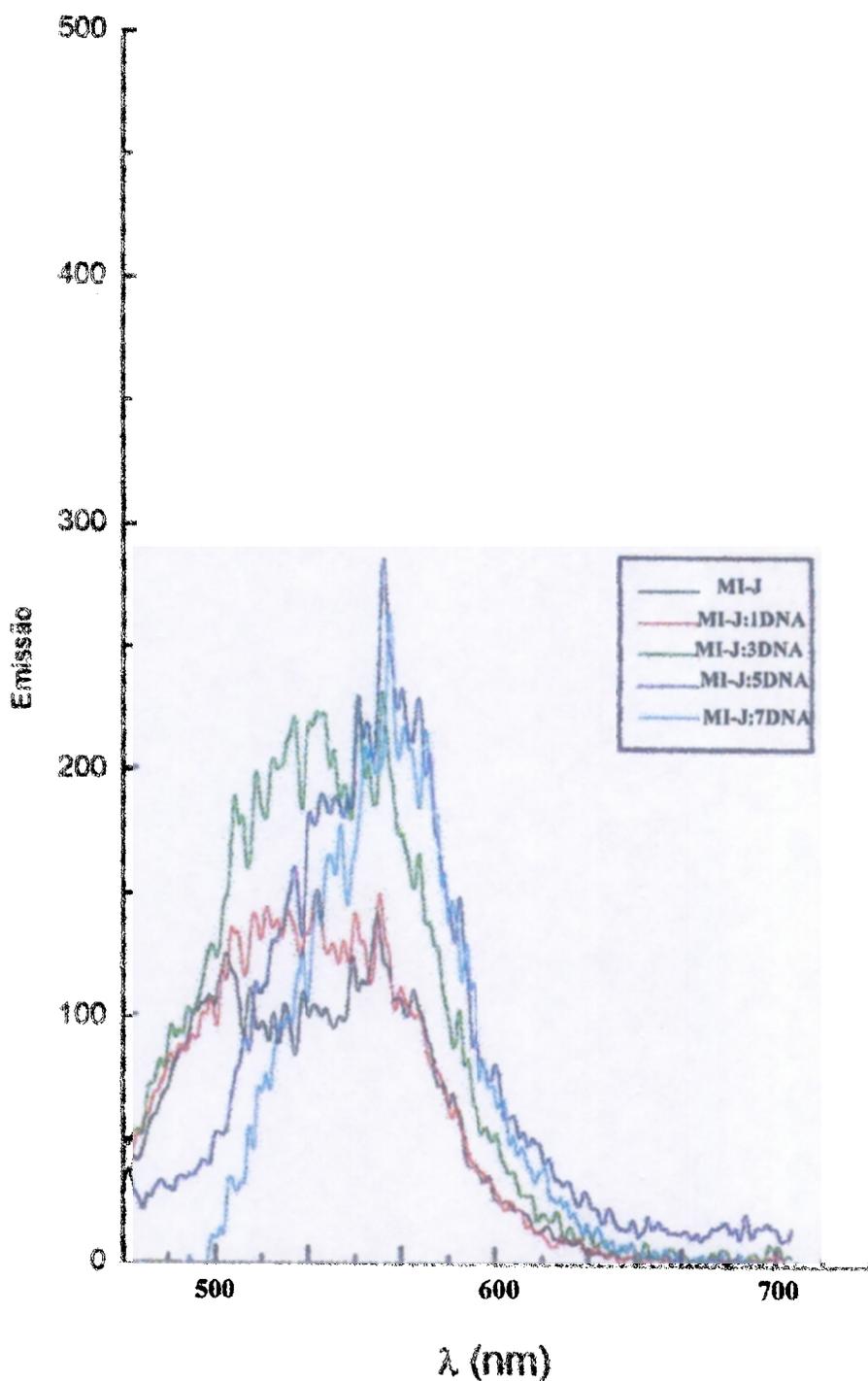


Figura 73. Espectro de fluorescência do MI-J em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do tимо.

Relação MI-J:DNA 1:1, 1:3, 1:5 e 1:7, correspondendo respectivamente a 13, 39, 65 e 91 μM de DNA do tимо.

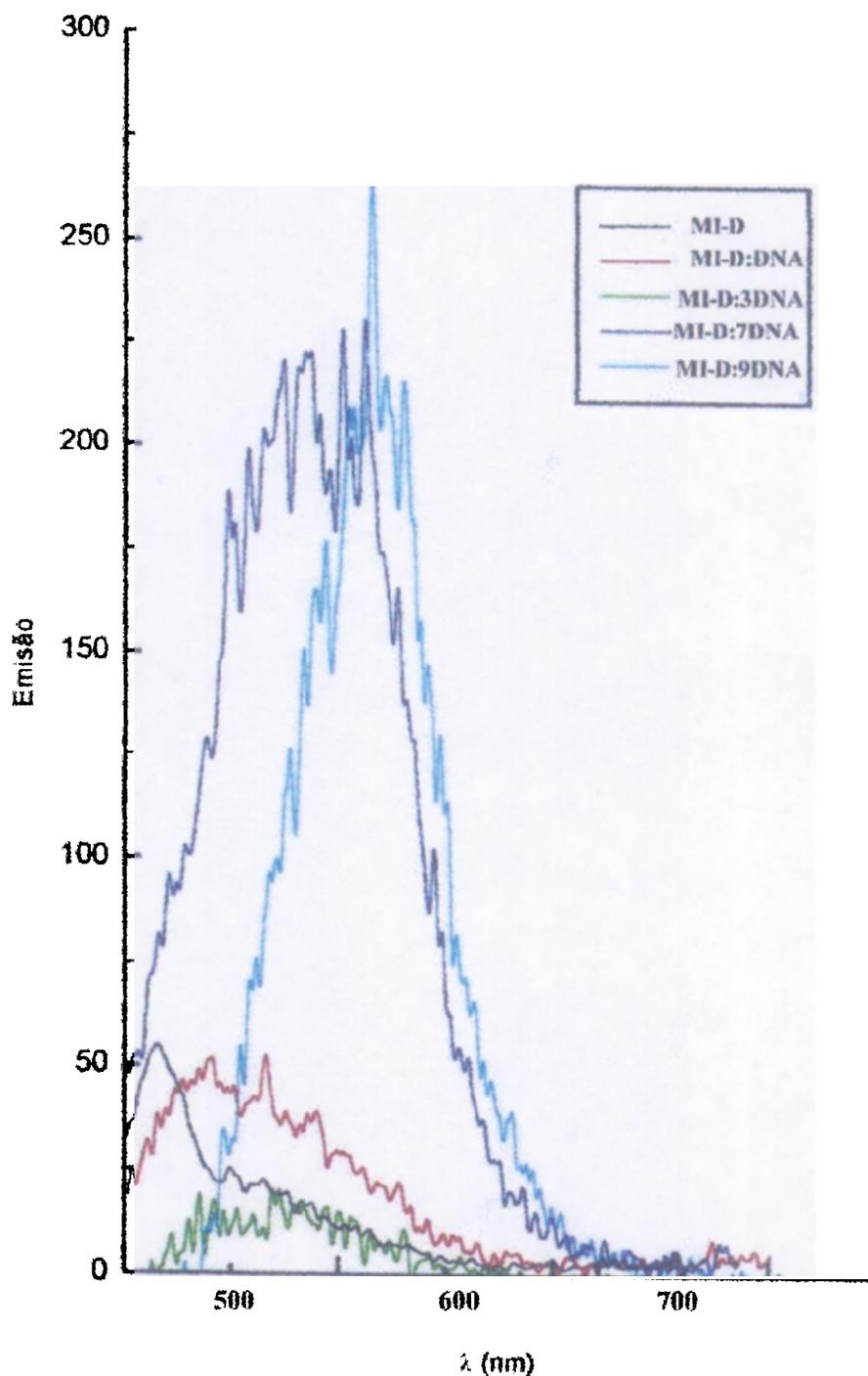


Figura 74. Espectro de fluorescência do **MI-D** em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do tимо e excitação a 406 nm.

Relação **MI-D**:DNA 1:1, 1:3, 1:7 e 1:9, correspondendo respectivamente a 13, 39, 91 e 117 μM de DNA do tимо.

No entanto, o efeito no espectro de fluorescência após excitação em λ 286 nm a emissão máxima em λ , 590 nm do brometo de etídio (droga intercalante) como controle positivo (Figura 75), revelou um aumento da fluorescência na presença de concentrações crescentes de DNA, 13, 39 e 65 μ M, o que está de acordo com os resultados de LePecq & Paoletti, 1967. A campotecina, outra droga analisada não apresentou alteração no espectro de fluorescência na presença de concentrações crescentes de DNA após excitação em λ 368 nm de acordo com o comportamento de drogas não intercalantes (Bloomfield *et al.*, 1974; Nandi *et al.*, 1990).

Em geral, o espectro de emissão de moléculas que interagem com o DNA apresenta valores de intensidade de fluorescência menores na região de emissão máxima, como os obtidos para as acridinas e hidrocarbonetos policíclicos (Bloomfield *et al.*, 1974), podendo ainda apresentar-se como uma banda larga (Kumar & Asuncion, 1993). No entanto, para o brometo de etídio, a ligação ao DNA aumenta a fluorescência (LePecq & Paoletti, 1967; Bloomfield *et al.*, 1974). Não se sabe ainda a base deste fato.

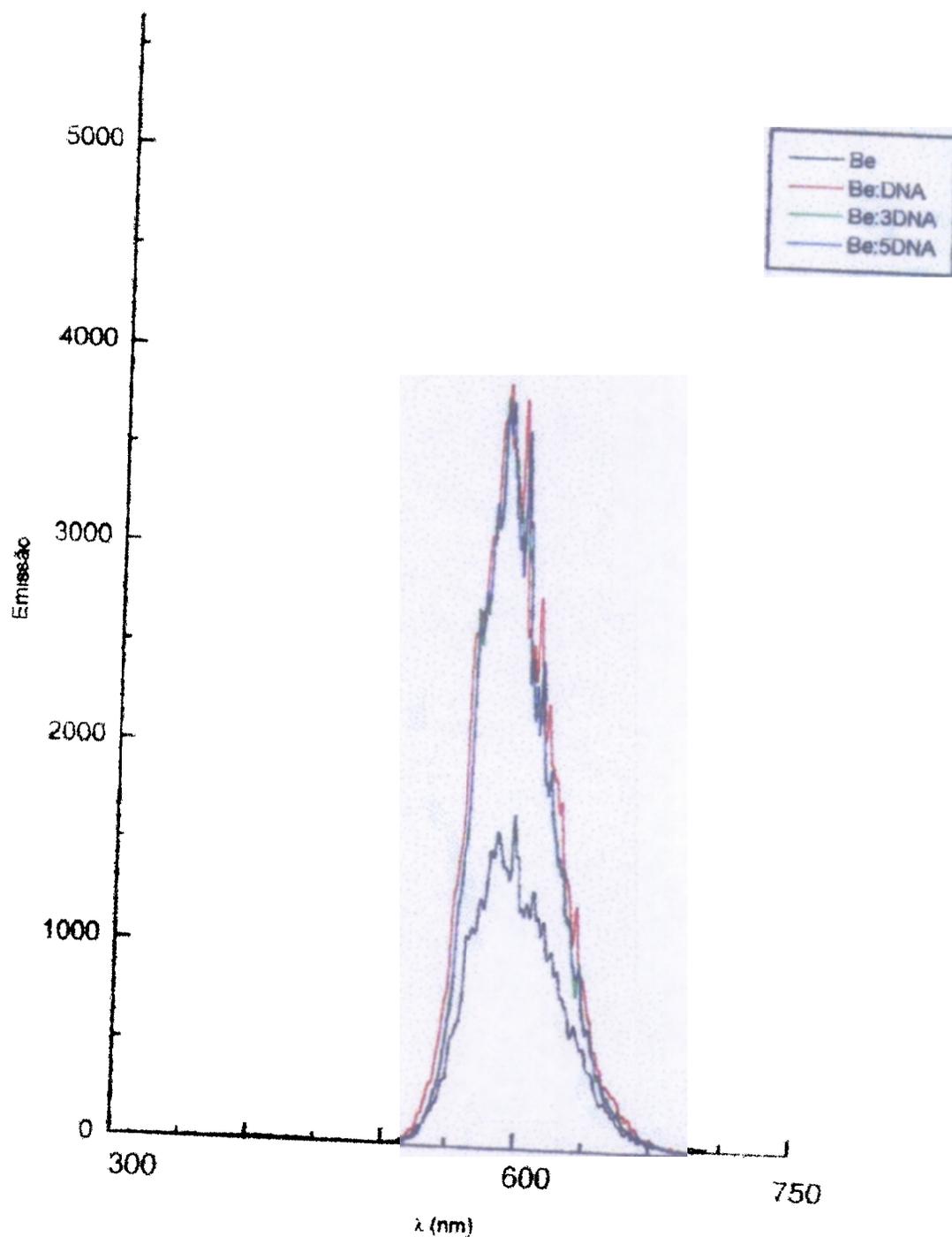


Figura 75. Espectro de fluorescência do brometo de etídio em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo e excitação a 286 nm.

Relação brometo de etídio:DNA 1:1, 1:3, 1:5 correspondendo respectivamente a 13, 39 e 65 μM de DNA do timo.

4.3.1.2. Flavonóides

A titulação espectrofotométrica dos flavonóides amentoflavona, 7"-O-metilagatisflavona e quercetina no UV, não apresentou evidências de interação quando usando-se concentrações crescentes de DNA em relação com o controle só de droga.

Na análise da titulação por fluorescência dos flavonóides, apenas a amentoflavona apresentou espectro característico de interação com o DNA do timo. A amentoflavona (13 μM) quando excitada em λ , 332 nm e na presença de concentrações de 13, 39, 65, 91 e 117 μM de DNA, revelou espectro com supressão da fluorescência na ligação com o DNA na emissão máxima em λ 720 nm. Porém, somente na concentração de 39 μM de DNA observou-se um aumento da emissão da fluorescência (Figura 76). A análise dos resultados obtidos para a amentoflavona por emissão de fluorescência na presença de concentrações crescentes de DNA não permitiu o cálculo da constante de ligação. A análise do espectro de fluorescência sugere que a biflavona interage com o DNA.

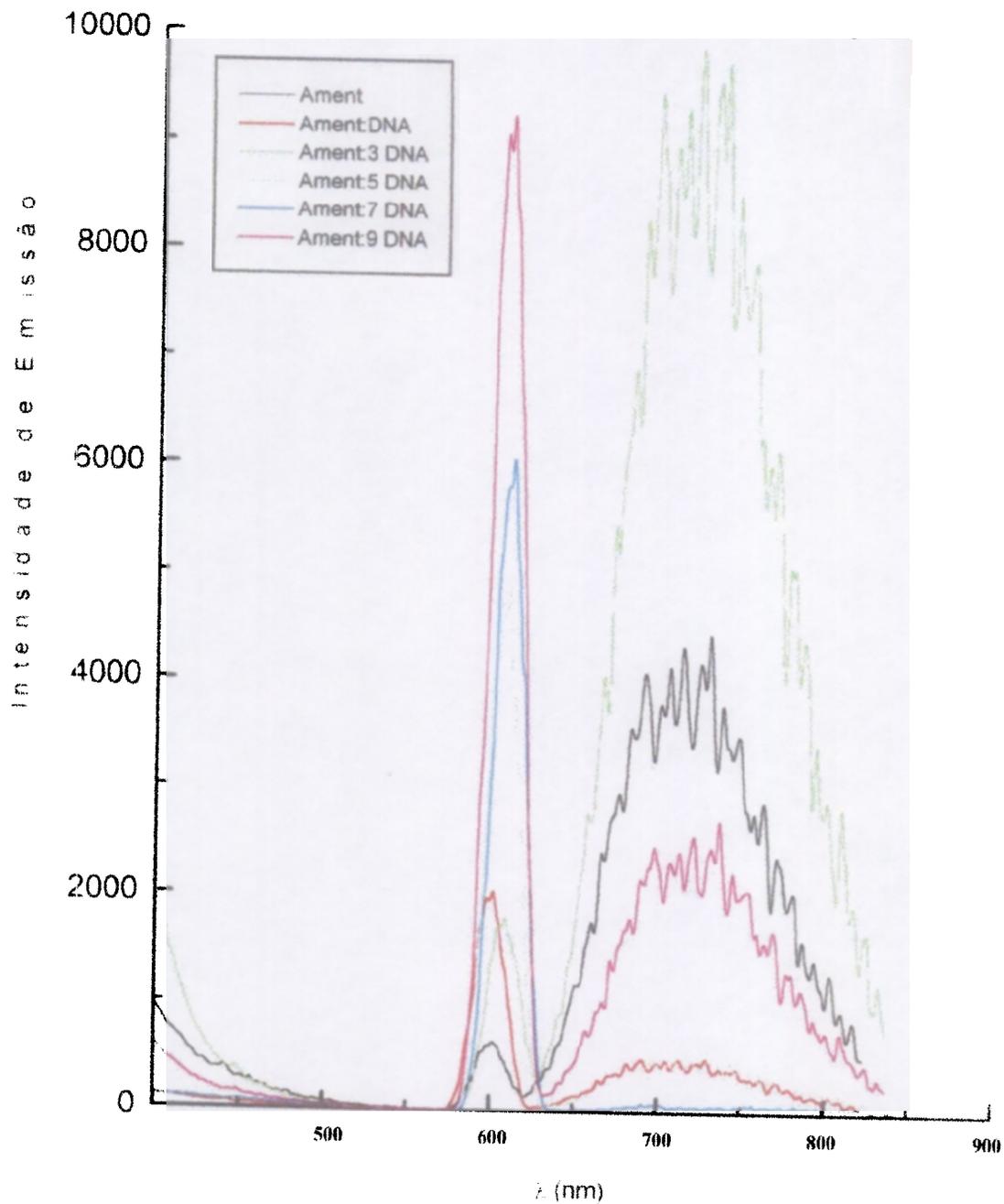


Figura 76. Espectro de fluorescência da amentoflavona em tampão TPE e na presença de concentrações crescentes de DNA do timo e excitação a 332 nm.

Relação amentoflavona:DNA 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:9 correspondendo respectivamente a 13, 39, 65, 91 e 117 μM de DNA do timo.

4.3.2. Eletroforese em gel de agarose com DNA do fago super-helicoidal

A análise por eletroforese em gel de agarose de 0,2 µg do DNA de fago super-helicoidal φX174 na presença de derivados mesoiônicos **MI-A**, **MI-D** e **MI-J**, em três concentrações, 100, 10 e 1 µg/mL correspondendo a 310, 31 e 3,1 µM (**MI-A**); 220, 22 e 2,2 µM (**MI-D**) e 245, 24,5 e 2,45 µM (**MI-J**) em comparação com 25 µM de brometo de etidium mostrou que nenhum dos derivados afetou o processo de migração do DNA (Figura 77). O complexo brometo de etídio-DNA apresenta o DNA alterado para forma desenrolada devido à intercalação, a forma desenrolada do DNA migra mais lentamente na eletroforese do que a forma compacta de fago superhelicoidal nativo (Waring, 1970).

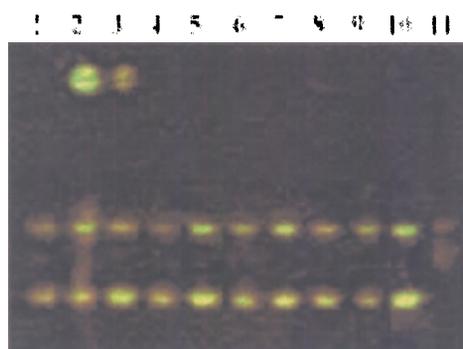


Figura 77. Eletroforese em gel de agarose de DNA de fago super-helicoidal φX174 na presença de derivados mesoiônicos e de brometo de etídio.

1. DNA de fago; 2. DNA + **MI-A** 310 µM; 3. DNA + **MI-A** 31 µM; 4. DNA + **MI-A** 3,1 µM; 5. DNA + **MI-D** 220 µM 6. DNA+ **MI-D** 22 µM; 7. DNA+ **MI-D** 2,2 µM 8. DNA + **MI-J** 245 µM. 9. DNA + **MI-J** 24,5 µM; 10. DNA + **MI-J** 2,45 µM; 11. BE 25 µM.

O tratamento do DNA do fago com três concentrações dos flavonóides 7''-O-metilagatisflavona, 100, 10 e 1 µg/mL (187, 18,7 e 1,87 µM respectivamente) e amentoflavona (186, 18,6 e 1,86 µM, respectivamente), também não apresentou diferença na migração eletroforética (Figura 78), o mesmo ocorrendo com a biflavona denominada R98.

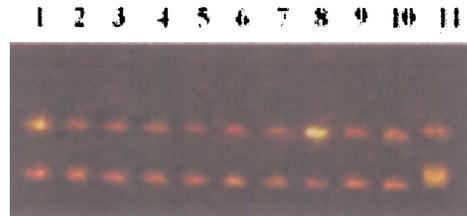


Figura 78. Eletroforese em gel de agarose de DNA de fago ϕ X174 super-helicoidal na presença de flavonóides e de brometo de etídio.

1. DNA de fago; 2. DNA + 7^{''}-O-metil agatisflavona 187 μ M; 3. DNA + 7^{''}-O-metil agatisflavona 18,7 μ M; 4. DNA + 7^{''}-O-metil agatisflavona 1,87 μ M; 5. DNA + amentoflavona 186 μ M; 6. DNA+ amentoflavona 18,6 μ M; 7. DNA+ amentoflavona 1,86 μ M; 8. DNA + R98 145 μ M. 9. DNA + R98 14,5 μ M; 10. DNA + R98 1,45 μ M; 11. BE 25 μ M.

A habilidade de uma substância para se ligar a biomoléculas de várias maneiras pode ser requerida para expressar atividade antitumoral significativa. A atividade biológica revelada pelo derivado **MI-D**, substância contendo um sistema planar aromático heterocíclico, pode ser justificada pela habilidade de interagir com os pares de bases empilhadas na hélice dupla provavelmente através de interações eletrostáticas (Cheng *et al*, 1993; Echevarria *et al*, 1995). Possivelmente, a presença do grupo nitro no sistema heterocíclico contribui para a deslocalização eletrônica através de seus efeitos indutivo e de ressonância, influenciando na polarização da molécula do DNA (Korokolvas & Burckhalter, 1988; Cheng *et al.*,1993).

A biflavona amentoflavona contendo duas unidades flavonoídicas com anéis aromáticos policíclicos, também interage com o DNA, verificado pela emissão da fluorescência, que é um método mais sensível que a absorção no UV.

Os resultados obtidos indicam que os derivados mesoiônicos **MI-D** e **MI-J** e a biflavona amentoflavona apresentam características de substâncias que interagem com o DNA.

4. 4. Apoptose

4.4.1. Derivados mesoiônicos

O método bioquímico clássico para demonstrar a apoptose é a presença de fragmentos de cerca de 180 pares de bases de comprimento que indica a clivagem do DNA nas regiões entre os nucleossomos (Wyllie *et al.*, 1980; Ramachandra & Studzinski, 1995). Para estudar a fragmentação do DNA em células de Ehrlich tratadas por derivados mesoiônicos **MI-D**, **MI-J** e o **BMI-D** em concentrações na faixa de 11-62 μM foi realizada a análise por eletroforese em gel de agarose do DNA extraído das células de Ehrlich em cultura de 4 e 24 horas. A banda de DNA permaneceu próximo do topo do gel, tanto das células tratadas com o solvente DMSO 0,3 % (Figura 79, linha 1) como o das tratadas por 24 horas com 5 $\mu\text{g/mL}$ (11 μM) de **MI-D** e (12,5 μM) de **BMI-D** (Figura 79, linha 2 e 3). A linha L da Figura 79, apresenta várias bandas que servem como marcadores de tamanho do DNA.

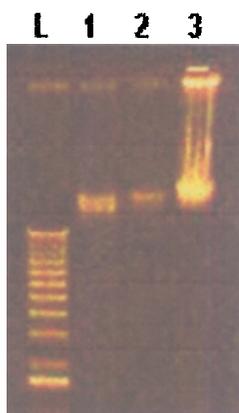
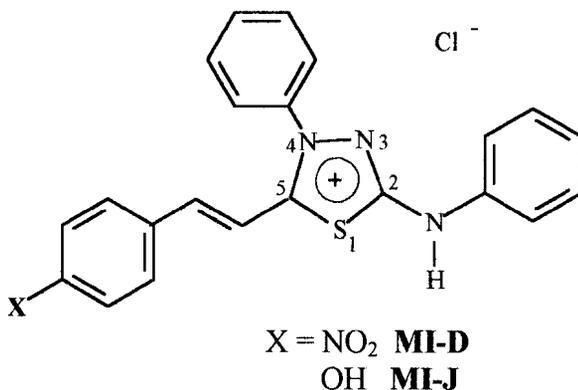
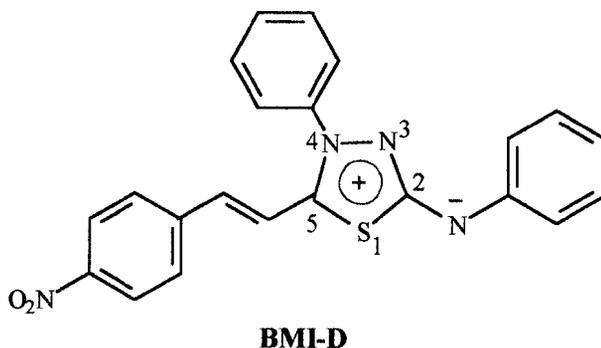


Figura 79. Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído de células de Ehrlich tratadas com **MI-D** e **BMI-D** por 24 horas. L: Padrão de massa molecular de 1 kb do DNA *ladder*; 1: Células controle tratadas com o solvente; 2: Células tratadas com **MI-D** a 11 μM ; 3: Células tratadas com **BMI-D** a 12,5 μM .

Para avaliar a influência do aumento da concentração das drogas e do tempo de exposição sobre o DNA das células de Ehrlich, usou-se o tratamento das células de Ehrlich por 4 e 24 horas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de **MI-D** (55 μM), **BMI-D** (62,5 μM) e **MI-J** (61,2 μM) e etoposida a 40 $\mu\text{g/mL}$ (68 μM), como um inibidor da DNA topoisomerase II. Observou-se por eletroforese que o DNA das células controles (tratadas por 24 horas com salina e DMSO 0,3 %), apresentou banda de massa molecular elevado próxima do topo do gel (Figura 80, linhas 1 e 2) semelhante aos das tratadas com **MI-D** por 4 e 24 horas (Figura 80, linhas 3 e 4). O DNA das células tratadas por **BMI-D** por 4 horas não apresentou alteração da migração do DNA em relação ao DNA do controle, mas ocorreu fragmentação do DNA das células tratadas por 24 horas (Figura 80, linha 5 e 6). Por outro lado, foi observada fragmentação do DNA nas células tratadas com **MI-J**, iniciando-se em 4 horas e evidenciada no gel após 24 horas de tratamento, verificando-se o aumento de fragmentos de DNA (Figura 80, linhas 7 e 8). A etoposida, não induziu fragmentação do DNA da células tumorais tratadas na concentração de 68 μM em 4 e 24 horas de tratamento (Figura 80, linhas 9 e 10). A linha L da Figura 80, apresenta várias bandas que servem como marcadores de tamanho do DNA.





L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

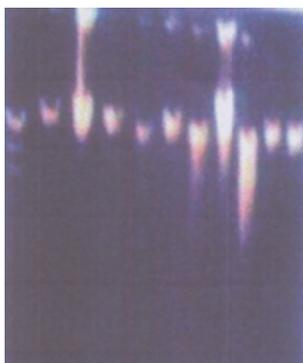


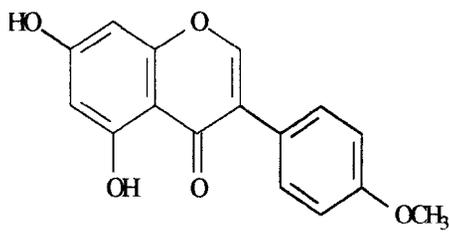
Figura 80. Eletroforese em gel de agarose do DNA extraído de células de Ehrlich tratadas com **MI-D**, **BMI-D**, **MI-J** e etoposida por 4 e 24 horas. L: Padrão de massa molecular do DNA λ /*Hind* III. 1: Células controle tratadas com salina; 2: Células controle tratadas com o solvente; 3: Células tratadas com **MI-D** a 55 μ M por 4 horas; 4: Células tratadas com **MI-D** a 55 μ M por 24 horas; 5: Células tratadas com **BMI-D** a 62,5 μ M por 4 horas; 6: Células tratadas com **BMI-D** (62,5 μ M) por 24 horas; 7: Células tratadas com **MI-J** a 61,2 μ M por 4 horas; 8: Células tratadas com **MI-J** a 61,2 μ M por 24 horas; 9: Células tratadas com etoposida a 68 μ M por 4 horas; 10: Células tratadas com etoposida a 68 μ M por 24 horas

Os resultados obtidos mostraram que não ocorreu indução na formação de fragmentos oligonucleossômicos do DNA em escada característico da apoptose, no DNA nas células tratadas com o derivado **MI-D** mesmo com a dose mais elevada (55 μ M). Por outro lado a resposta para a indução do DNA *ladder* revelou-se dependente do tempo e da dose para os derivados **BMI-D** e **MI-J**.

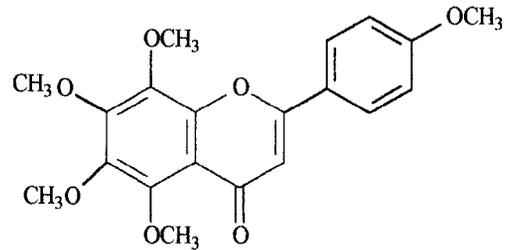
Embora o critério da verificação da fragmentação internucleossômica do DNA seja clássico para demonstrar a apoptose, este processo pode não ser observado quando ocorrem vários estímulos como a presença de drogas citotóxicas. Recentemente, verificaram-se que algumas drogas induzem nas células fragmentos maiores de DNA, entre 50 a 150 kb observados por eletroforese, como ocorre com a etoposida em células linfoblastóides MOLT-4 e com a idarrubicina, uma antraciclina usada no tratamento de leucemias e no câncer de mama (Sielman *et al.*, 1998). A presença de fragmentos maiores de DNA pode ser analisada também por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Sendo a técnica por PFGE mais sensível para estabelecer a morte celular, poderia ser detectada a apoptose, nas células de carcinoma de Ehrlich, após o tratamento com os derivados mesoiônicos e com a etoposida. Recentemente, foi evidenciada a presença de fragmentos de DNA de elevada massa molecular em morte celular por necrose após tratamento com campotecina (Sané & Bertrand, 1999).

4.4.2. Flavonóides

Trabalhos descritos na literatura mostraram que flavonóides naturais têm efeito inibidor do crescimento de vários tipos de células cancerosas, como o carcinoma de Ehrlich e a linhagem de células humanas de câncer do trato gastrointestinal (Suolina *et al.*, 1975; Yanagyhara *et al.*, 1993). As isoflavonas genisteína (Figura 36), a biochanina A e a flavona polimetoxilada tangeretina (Figura 81), podem induzir apoptose nas células de leucemia humana HL-60 (Hirano *et al.*, 1995).



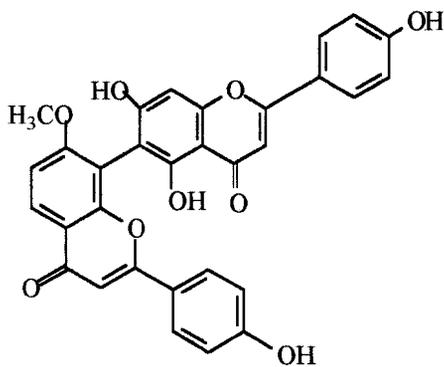
biochanina A



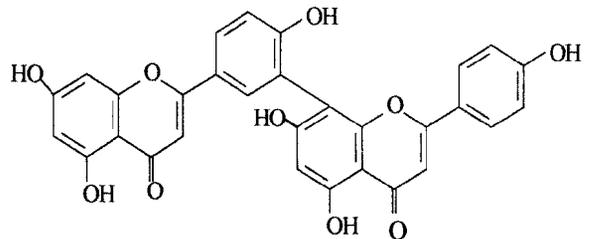
tangeretina

Figura 81. Estruturas da biochanina A e da tangeretina.

Neste trabalho, verificamos que os biflavonóides 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada e o flavonol quercetina inibem o crescimento de células de Ehrlich, em 48 horas de cultura (Grynberg *et al*, 1998).



7''-O-metilagatisflavona



amentoflavona

Para verificar se a citotoxicidade desses flavonóides pode ser atribuída à indução de apoptose, investigamos por eletroforese em gel de agarose o DNA das células de Ehrlich tratadas com 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada, quercetina e genisteína por 4, 24 e 48 horas de crescimento. Os resultados indicaram que ocorreram fragmentação oligonucleossômica do DNA, sendo o processo reacional dependente do

tempo e da dose (Figuras 82). Com 4 horas de tratamento não foi observado fragmentação do DNA. Após 24 e 48 horas de tratamento com amentoflavona, a 15 µg/mL (28 µM), amentoflavona acetilada, a 15 µg/mL (19 µM), a quercetina, a 15 µg/mL (29,6 µM) (Figura 82a, linhas 4 a 9) foi observado fragmentação do DNA comparadas com as linhas 1 e 2 de células controle expostas ao solvente DMSO a 0,3% por 24 e 48 horas. Além disso, não se observou degradação de DNA nas células tratadas com etoposida a 10 µg/mL (17 µM) por 24 horas (Figura 82a, linha 3). Encontra-se relatado que, endonucleases dependentes de cálcio estimulam a apoptose, enquanto que íons zinco inibem a atividade enzimática e bloqueiam a apoptose (Hirano *et al.*, 1995). Em nossas experiências, células de Ehrlich tratadas por 48 horas com amentoflavona, amentoflavona acetilada e quercetina na presença de 25 µM Zn²⁺, em comparação com células controle tratadas com Zn²⁺ a 25 µM não apresentaram fragmentação do DNA, como revela a Figura 82b (linhas 2, 3 e 4), indicando que possivelmente endonucleases dependentes de Ca²⁺ estão envolvidas na apoptose das células tratadas com os flavonóides amentoflavona e quercetina (Kaufmann, 1989; Hirano *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1998). Além do mais, verificamos que as células de Ehrlich tratadas com as biflavonas, 7"-O-metilagatisflavona e amentoflavona, apresentaram alterações morfológicas características da apoptose como a condensação da cromatina.

Não houve alteração no DNA de células de Ehrlich tratados com 17 µM de etoposida por 20 horas (Figura 82a, linha 3). A ação da etoposida varia com o tipo de célula em estudo, sendo que algumas vezes produz o aparecimento de DNA em escada em células linfoblastóides CEM e de leucemia HL-60 (Kaufmann, 1989), em outras, como as células MOLT-4, não ocorre alteração do DNA (Sielman *et al.*, 1998).

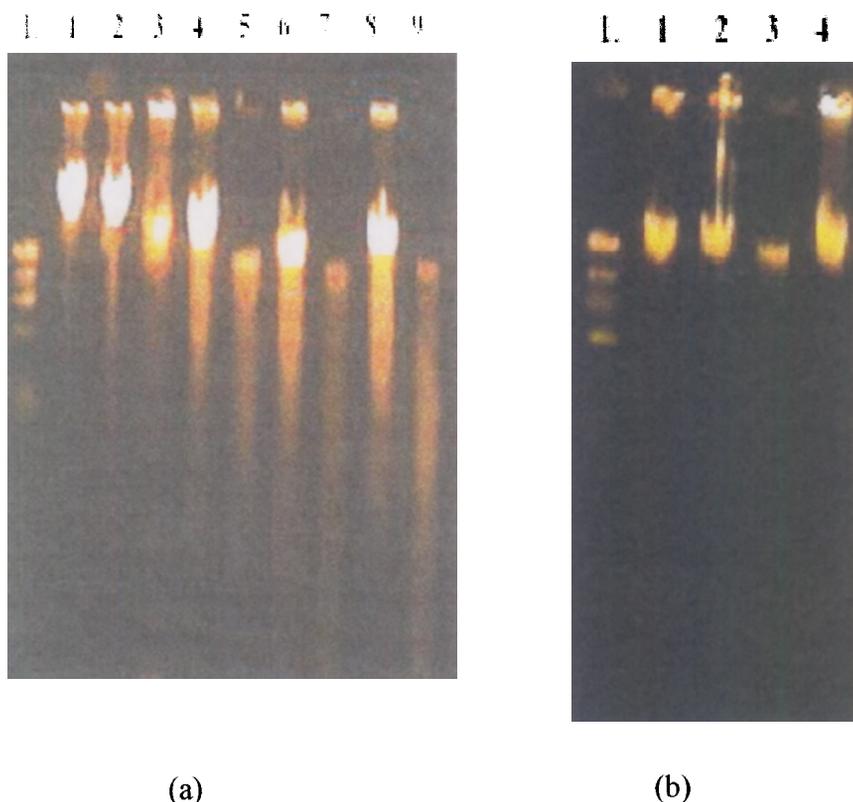
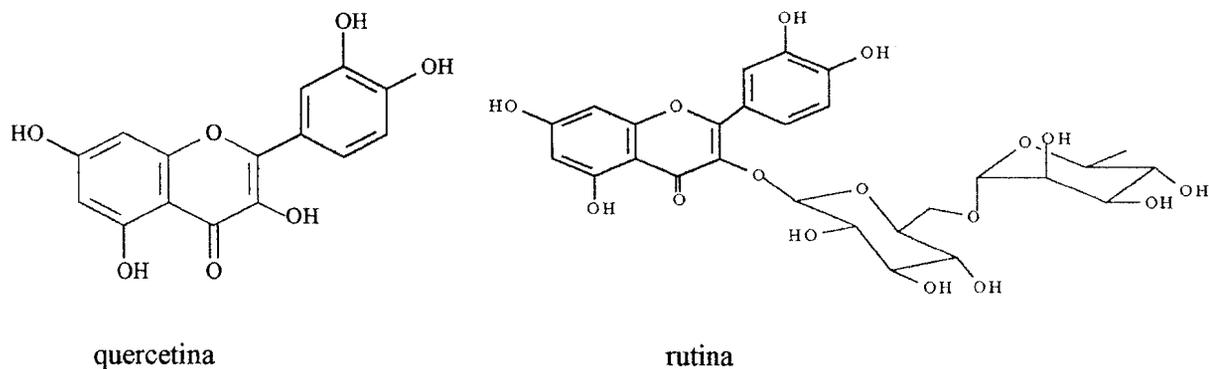


Figura 82. Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células de Ehrlich após 24 e 48 horas de tratamento com amentoflavona, amentoflavona acetilada, quercetina e etoposida, na ausência (a) e na presença de $ZnSO_4$ (b).

(a): L: Padrão de massa molecular do DNA $\lambda/Hind$ III; 1 e 2: células controle expostas a DMSO 0,3 % por 24 e 48 horas; 3: células tratadas com etoposida a 17 μM por 24 horas; 4 e 5: células tratadas com amentoflavona a 28 μM por 24 e 48 horas; 6 e 7: células tratadas com amentoflavona-acetilada a 19 μM por 24 e 48 horas; 8 e 9: células tratadas com quercetina a 29,6 μM por 24 e 48 horas.

(b): células tratadas com drogas por 48 horas na presença de 25 μM Zn^{2+} . L: Padrão de massa molecular do DNA $\lambda/Hind$ III; 1: células controle + Zn^{2+} ; 2: células tratadas com amentoflavona a 28 μM + Zn^{2+} ; 3: Células tratadas com amentoflavona acetilada a 19 μM + Zn^{2+} ; 4: células tratadas com quercetina a 30 μM + Zn^{2+} .

O tratamento das células de Ehrlich com a rutina, um flavonóide glicosilado, derivado da quercetina, não apresentou evidências de apoptose e nem citotoxicidade, demonstrando que a presença de hidroxila livre no átomo de C-3 do anel C, é necessária para a atividade, como ocorre com a quercetina.



As células de Ehrlich tratadas por 24 horas com a biflavona 7''-O-metilagatisflavona, a 15 $\mu\text{g/mL}$ (28 μM), apresentou banda de massa molecular elevada próxima do topo do gel (Figura 83, linhas 2), mas ocorreu fragmentação do DNA, bem evidente após tratamento por 48 horas (Figura 83, linha 3). As células tratadas por 48 horas com a isoflavona genisteína (15 $\mu\text{g/mL}$ = 55,5 μM), usada como controle positivo apresentou fragmentação do DNA (Figura 83, linha 4), revelada pela comparação com células tumorais tratadas por 48 horas com o solvente das drogas (DMSO a 0,3 %), que apresentou banda próxima do topo do gel.



Figura 83. Eletroforese em gel de agarose de DNA extraído de células de Ehrlich após 24-48 horas de tratamento com 7''-O-metilagatisflavona e genisteína. L: Padrão de massa molecular do DNA λ Hind III; 1: células tratadas com DMSO 0,3 % por 48 horas; 2: células tratadas com 7''-O-metilagatisflavona a 28 μM por 24 horas ; 3: células tratadas com 7''-O-metilagatisflavona a 28 μM por 48 horas; 4. células tratadas com genisteína a 55 μM por 48 horas.

Não foi observada a quebra de DNA em timócitos tratados por 20 horas com os flavonóides usados para estudo. Em contraste, observou-se a quebra do DNA em escada com 17 μM de etoposida, usado como controle positivo, por tratamento de 20 horas.

Embora o mecanismo de ação das enzimas caspases na apoptose esteja sendo muito estudado nos últimos anos (DeVita *et al.*, 1997; Yu & Littel, 1998), o envolvimento de endonucleases ainda não está claro. Em trabalho recente (Yoshida *et al.*, 1998), foi isolada uma endonuclease dependente de Mg^{2+} , possivelmente ativada por caspases, com alta atividade em células de leucemia em processo de apoptose. Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, pode-se sugerir que as caspases estariam envolvidas no mecanismo de apoptose induzida por flavonóides através da ativação de nucleases.

4.5. Amplificação do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR)

4.5.1. Derivados mesoiônicos e flavonóides

A técnica idealizada por Kary Mullis na década de 1980 para a reação de polimerase em cadeia (PCR) revolucionou a genética molecular (Watson *et al.*, 1997), possibilitando, inclusive, a produção de cópias de seqüências específicas de DNA de célula em análise. O DNA total da célula contendo o possível fragmento de cromossomo para o gene em estudo, pode ser usado para a amplificação por PCR. A especificidade da reação é dada por dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência do DNA em análise que limitam o gene em cada cromossomo. A seqüência do DNA em análise será amplificada se os oligonucleotídeos iniciadores, que estão situados em direções opostas se

posicionarem na seqüência do gene. A amplificação do DNA em cultura de células pode ser indicada pelo aumento de cópias do fragmento gênico em estudo.

Neste trabalho tentamos a amplificação da expressão de um fragmento do gene *p53* presente em células de Ehrlich (Lu *et al.*, 1988) utilizando a reação em cadeia da polimerase para o DNA extraído de células tumorais tratadas com os flavonóides e os derivados **MI-D** e **MI-J**. Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados, *sense* e *antisense*, correspondem aos exons 5 e 8 do gene *p53*, tendo a seguinte composição:

Oligonucleotídeo *sense* (5'- TCTGGGCTTCTTGCATTCTG-3'),

Oligonucleotídeo *antisense* (5'- GTTGGGCAGTGCTCGCTTAG-3').

Os resultados obtidos por eletroforese indicaram a amplificação do fragmento do gene com produto de aproximadamente 374 bp (Figura 84, linhas 2 a 5) de células de carcinoma de Ehrlich tratadas por 48 horas com 15 µg/mL dos flavonóides 7"-O-metilagatisflavona, amentoflavona, amentoflavona acetilada e quercetina (28, 28, 19 e 29,6 µM, respectivamente), que correspondem aos encontrados por Okuda *et al.*, em 1994. O biflavonóide, denominado R98, também apresentou amplificação do DNA (Figura 84, linha 6). As células tumorais usadas como controles, tratadas com o solvente das drogas (DMSO 0,3 %) não apresentaram amplificação do DNA (Figura 84, linha 1). O derivado **MI-D** não apresentou evidências de amplificação do DNA.

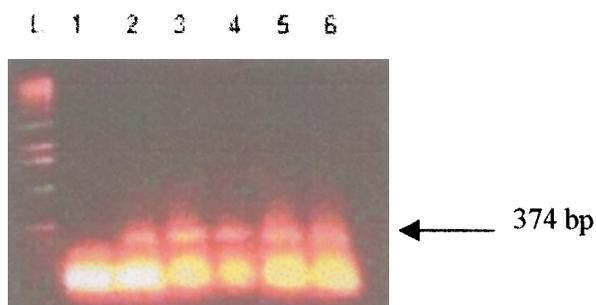


Figura 84. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos da amplificação de DNA por PCR de células de Ehrlich tratadas com flavonóides. L: Padrão de massa molecular de 1 kb do DNA *ladder*; 1: células controle tratadas com DMSO 0,3 %; 2: células tratadas com 7''-O-metilagatisflavona; 3. DNA de células tratadas com amentoflavona; 4: células tratadas com amentoflavona acetilada; 5: células tratadas com quercetina; 6. células tratadas com biflavona R98. A seta indica o fragmento do gene alvo amplificado.

Diversos estudos demonstraram que, uma mutação no gene *p53* em tumores malignos pode produzir a diminuição da sobrevivência do paciente (Soong *et al.*, 1997). Assim, o *p53* normal efetivamente previne a proliferação do DNA danificado pela ativação da via que leva à apoptose. A célula cancerosa com *p53* normal é mais sensível à quimioterapia do que a célula normal (DeVita *et al.*, 1997).

A avaliação de linhagens celulares de tumores no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos mostrou correlação entre a inibição do crescimento para 123 agentes anticancerígenos contendo o gene *p53* normal. As células contendo *p53* mutante tendem a ter menor inibição do crescimento (O'Connor *et al.*, 1997). Um outro trabalho verificou que, o flavonol quercetina inibe o crescimento e a expressão da proteína *p53* mutante, sem afetar o nível de mRNA do *p53* mutante em linhagem de células de câncer de mama humano (Avila *et al.*, 1994). Verificou-se ainda que, o mRNA para o *p53* aparece aumentado na transição da fase G1/S em células de carcinoma de Ehrlich em camundongos (Lu *et al.*, 1988).

Os resultados de amplificação do DNA, obtidos com os flavonóides para o presumível fragmento do gene *p53* (Okuda *et al.*, 1994; Hagesawa *et al.*, 1995), podem ser atribuídos à participação do acesso de nucleases à cromatina como acontece com a bromodesoxiuridina. Esta droga atua como um sensibilizador da radiação e aumenta a suscetibilidade para fragmentação do DNA em muitas células, proporcionando a indução do gene *p53* (Rieber & Rieber, 1998). Os resultados deste trabalho ainda necessitam da análise da sequência do DNA amplificado por PCR, para confirmar que o gene *p53* está associado à resposta dos flavonóides utilizados neste trabalho.

4.6. DNA topoisomerasas

A topoisomerase I é expressa durante o ciclo celular e está envolvida na transcrição, replicação e recombinação do DNA, mantendo a estabilidade do genoma (Wang, 1985 e 1996; Chen & Liu, 1994). Recentemente, verificou-se que a proteína p53 aumenta a atividade da topoisomerase I, sugerindo o seu envolvimento no dano ao DNA mediado pela p53 (Gobert *et al.*, 1996).

A topoisomerase I aparece elevada em muitos cânceres humanos, tornando-se o alvo de vários agentes anti-câncer, como a campotecina, a morfolinodoxorrubicina e a actinomicina D (Pommier *et al.*, 1998; Wuerzberger *et al.*, 1998). Outros agentes têm mostrado atividade inibidora da enzima, as benzofenantridinas incluindo a série das fagaroninas e benzoantracenos (e.g. saintoipina), alcalóides, como a coralina e as indenoisoquinolinas (Pommier *et al.*, 1998), os indolcarbazóis com atividade contra vários tumores de camundongos sendo que o derivado semi-sintético, a ED-749, está sendo analisado em estágio clínico (Yoshinari *et al.*, 1993; Strumberg *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 1999). Outros potentes inibidores da atividade da enzima são os flavonóides, como as flavonas naturais, velutina (Zahir *et al.*, 1996), quercetina, miricetina e fisetina, e as sintéticas como 3',5'-dibromo-4'-hidroxi-3-metilflavonas (Boege *et al.*, 1996).

Neste trabalho, estudamos flavonóides, produtos naturais, e derivados mesoiônicos, produtos sintéticos, como agentes modelo para as reações mediadas por topoisomerasas.

4.6.1. Derivados mesoiônicos

Foram avaliados por eletroforese quatro derivados mesoiônicos (**MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J**) na atividade de relaxamento da topoisomerase I sobre o DNA superhelicoidal de plasmídeo.

Os resultados na concentração de 100 μ g/mL mostraram que as substâncias **MI-C** (237 μ M), **MI-D** (220 μ M) e **MI-J** (245 μ M) inibiram a atividade da topoisomerase I, [Figura 85, linhas 6, 8 e 10, comparadas com a campotecina (100 μ M), linha 11]. O derivado **MI-A** não inibiu a atividade da topoisomerase I, Figura 85 (linhas 3 e 4). As linhas 1 e 2 da Figura 85, correspondem ao DNA superhelicoidal e ao DNA na presença da topoisomerase I, respectivamente.

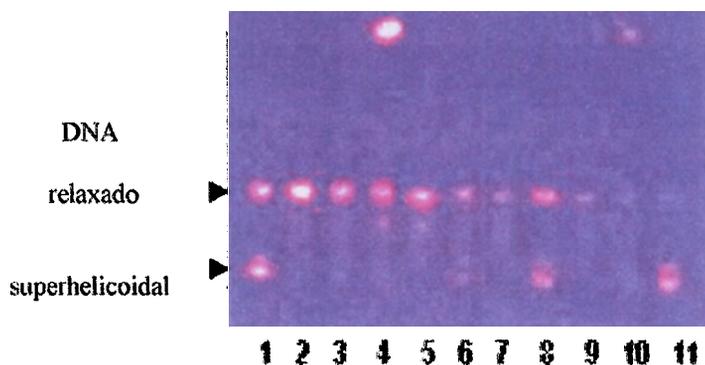


Figura 85. Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos derivados mesoiônicos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** no relaxamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I. DNA de plasmídeo pBR322 0,2 μ g (1) foi incubado com 2 unidades de topoisomerase I na ausência (2) ou na presença de drogas: **MI-A** 31 e 310 μ M (3 e 4), **MI-C** 23,7 e 237 μ M (5 e 6), **MI-D** 22 e 220 μ M (7 e 8), **MI-J** 24,5 e 245 μ M (9 e 10) e campotecina 100 μ M (11). As amostras de DNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose.

Para obter informações adicionais sobre o efeito do **MI-D** e **MI-J** no desenrolamento do DNA superhelicoidal de plasmídeo por topoisomerase I, adicionamos a proteinase K e SDS à reação para desnaturar e separar o DNA da proteína. Após este procedimento, extraiu-se o DNA com clorofórmio-álcool isoamílico para análise por eletroforese em agarose contendo brometo de etídio. Esta droga induz efeitos de desenrolamento e o DNA relaxado migra com mais rapidez do que o DNA superhelicoidal. O resultado foi comparado com uma droga não intercalante, a etoposida como um inibidor de topoisomerase II, e a campotecina como um inibidor de topoisomerase I, e o brometo de etídio, como droga intercalante. Como verificado na Figura 86, os efeitos produzidos por MI-D e MI-J no deslocamento do DNA em três concentrações, 100, 20 e 4 $\mu\text{g/mL}$, aparecem como dependente da dose sendo mais intensa em maior concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ **MI-D** (229 μM), linha 5 e **MI-J** (245 μM), linha 8. O aumento observado na mobilidade do DNA de plasmídeo superhelicoidal com a maior concentração indica que as substâncias **MI-D** e **MI-J** devem ser intercalantes, confirmando os resultados obtidos com estes derivados utilizando o método de espectrofluorimetria. A etoposida em concentração de 14,7 $\mu\text{g/mL}$ (25 μM), não produziu inibição (Figura 86, linha 1) mas na presença de campotecina a 17,4 $\mu\text{g/mL}$ (50 μM) ocorreu inibição da enzima, revelada pela banda de DNA superhelicoidal com migração mais lenta (Figura 86, linha 11). Na presença de brometo de etídio a 10 $\mu\text{g/mL}$ (25 μM) observou-se migração mais lenta do DNA, como era esperado para uma droga intercalante (Figura 86, linha 4).

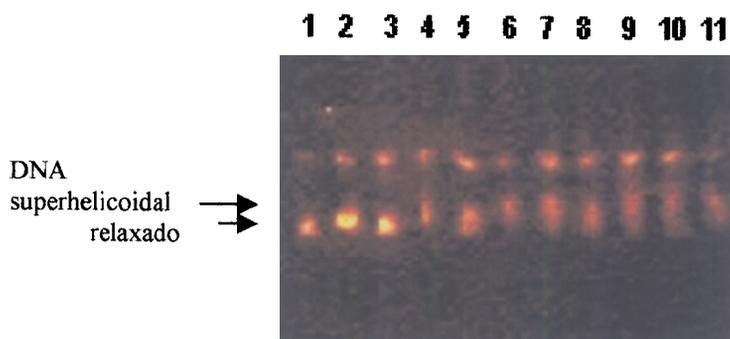


Figura 86. Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos derivados mesoiônicos **MI-D** e **MI-J** no desenrolamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I, na presença de brometo de etídio.

DNA de plasmídeo pBR322 0,2 μg (2) foi incubado com 4 unidades de topoisomerase I na ausência (3) ou na presença de drogas: etoposida 25 μM (1); brometo de etídio 25 μM (4); **MI-D** 220, 44 e 8,8 μM (5,6 e 7); **MI-J** 245, 49 e 9,8 μM (8, 9 e 10); campotecina 100 μM (11). As reações foram interrompidas por tratamento com SDS e tratamento com proteinase K. O DNA foi extraído por mistura de clorofórmio-álcool isoamílico. As amostras de DNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio.

Para a verificação do complexo de quebra mediada por topoisomerase I na presença de derivados mesoiônicos sobre o DNA superhelicoidal pBR322, avaliamos a reação na ausência e na presença destes derivados nas concentrações, 10 e 100 $\mu\text{g.mL}$, [**MI-A** [31 e 310 μM), **MI-C** (23,7 e 237 μM), **MI-D** (22 e 220 μM) e **MI-J** (24,5 e 245 μM)], usando controle positivo campotecina na concentração de 35 $\mu\text{g/mL}$ (100 μM). Efetuamos a separação do DNA quebrado por adição de proteinase K e SDS à reação, e a análise por eletroforese em gel foi realizada na presença de brometo de etídio. A Figura 87 mostra uma fotografia da eletroforese, que permite a comparação das atividades das substâncias **MI-A**, **MIC**, **MI-D**, **MI-J** e a campotecina. Observou-se que, as substâncias sintéticas **MI-D** e

MI-J apresentaram a banda correspondente ao DNA quebrado em maior quantidade na menor concentração (Figura 87: linhas 7 e 9), na mesma intensidade que a campotecina (Figura 87: linha 11). Foi observada uma banda pequena nos derivados **MI-A** e **MI-C** na maior dose (Figura 87: linhas 4 e 6). Na linha 1 observa-se a banda de DNA superhelicoidal e na linha 2 com migração mais rápida o DNA relaxado pela enzima.

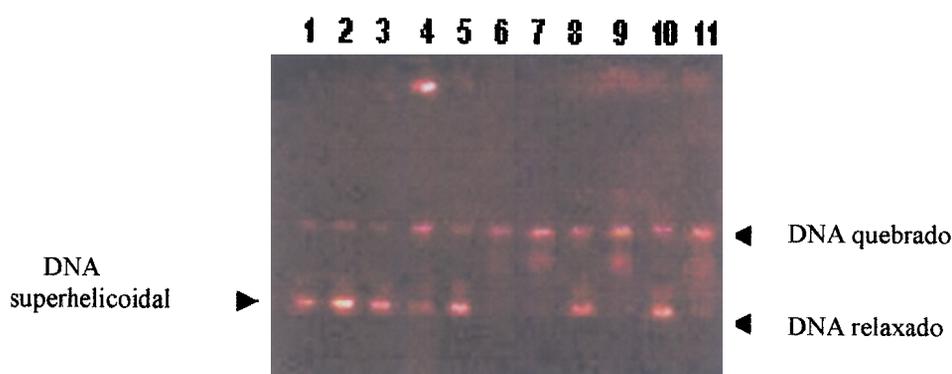
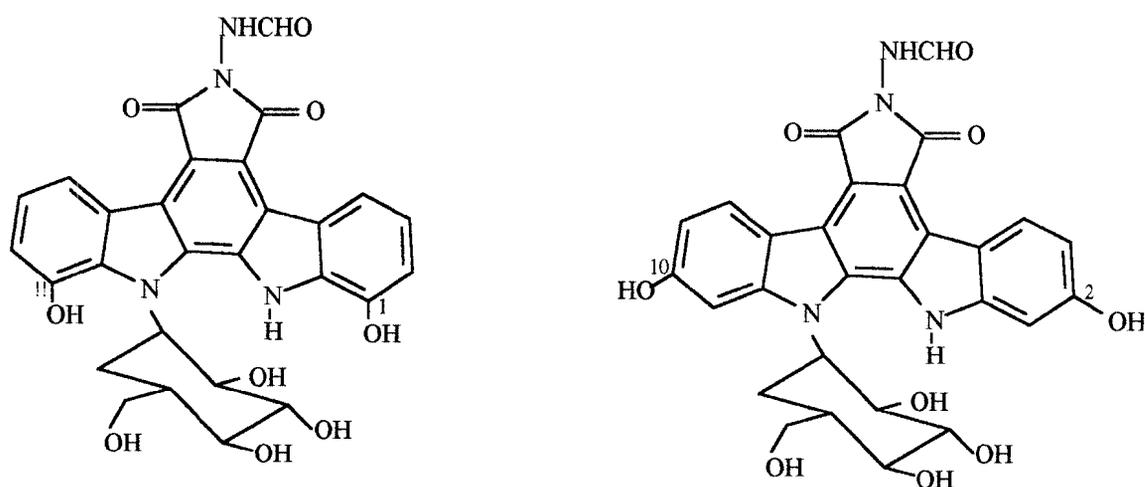


Figura 87. Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos derivados mesoiônicos **MI-A**, **MI-C**, **MI-D** e **MI-J** na formação do complexo de quebra, na presença de DNA de plasmídeo por topoisomerase I.

DNA de plasmídeo pBR322 0,2 µg (1) foi incubado com 4 unidades de topoisomerase I na ausência (2) ou na presença de drogas: **MI-A** 31 e 310 µM (3 e 4); **MI-C** 23,7 e 237 µM (5 e 6); **MI-D** 22 e 220 µM (7 e 8); **MI-J** 24,5 e 245 µM (9 e 10); campotecina 100 µM (11). As reações foram interrompidas por tratamento com SDS e proteinase K. As amostras de DNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio.

Os resultados obtidos da atividade intercalante com os derivados **MI-D** e **MI-J** na eletroforese em gel na presença de brometo de etídio, revelaram-se semelhantes aos fornecidos com o derivado glicosilado do indolcarbazol NB-506 (Figura 88) por Bailly *et al.*, 1999, que mostraram a ação inibidora sobre a topoisomerase I e a atividade intercalante

de DNA utilizando a técnica de desenrolamento do DNA de plasmídeo. A atividade de topoisomerase pode ser separada da ação intercalante do DNA por alteração da estrutura do NB-506. O regioisômero do NB-506 (Figura 88) contendo grupos hidroxílicos nos átomos de carbono C-2 e C-10, posições diferentes dos encontrados no NB-506 (1,11 hidroxilado), têm atividade contra a topoisomerase I porém sem ação intercalante no DNA.



NB-506

Regioisômero de NB-506

Figura 88. Estruturas dos derivados indolcarbazóis NB-506 e do regioisômero de NB-506.

4. 6.2. Flavonóides

Um grande número de flavonóides responde pela inibição de topoisomerasas I e II (Boege *et al.*, 1996; Zahir *et al.*, 1996). Como inibidores de topoisomerase I, pode-se citar os flavonóis quercetina e canferol e a flavona velutina (Boege *et al.*, 1996), que formam também o intermediário covalente com a enzima e o DNA. A quercetina é também intercalante do DNA no ensaio de desenrolamento do DNA (Yamashita *et al.*, 1990a

&1990b). Em nosso trabalho, foi avaliado o efeito dos flavonóides 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e rutina sobre o relaxamento da topoisomerase I, em comparação com a campotecina. Os biflavonóides amentoflavona e 7''-O-metilagatisflavona inibiram a atividade da topoisomerase I na concentração de 186 μM (Figura 89, linhas 4 e 6) como revela a comparação com a campotecina, que na concentração de 50 μM inibiu a atividade da enzima (Figura 89, linha 7) e na de 200 μM não inibiu a atividade da enzima (Figura 89, linha 1). A rutina não inibiu a atividade da topoisomerase I na concentração de 163 μM (Figura 89, linha 5). Na concentração de 18,6 μM nenhum flavonóide estudado inibiu a atividade da topoisomerase I.

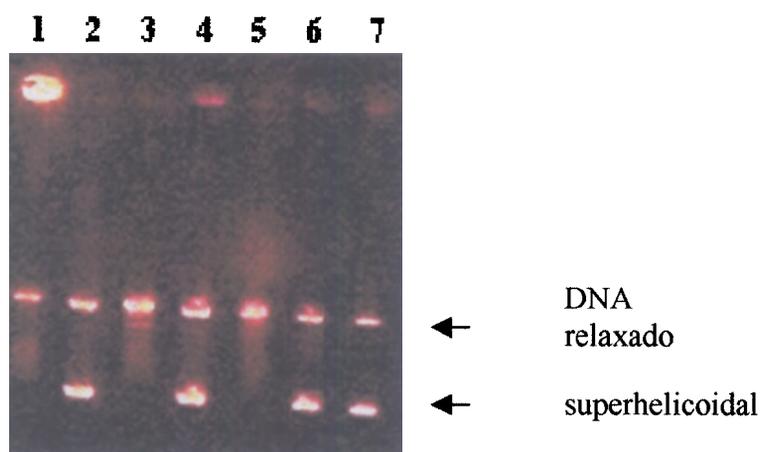


Figura 89. Eletroforese em gel de agarose mostrando a ação dos flavonóides 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona no relaxamento do DNA de plasmídeo por topoisomerase I.

DNA de plasmídeo pBR322 0,2 μg (linha 2) foi incubado com 2 unidades de topoisomerase I na ausência (linha 3) ou na presença de: 7''-O-metilagatisflavona 186 μM (linha 4), rutina 163 μM (linha 5), amentoflavona 186 μM (linha 6), campotecina 50 μM (linha 7) e 200 μM (linha 1). As amostras de DNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose.

Atribuiu-se a eficácia dos agentes tumorais que atuam sobre as topoisomerasas I e II ao aumento da expressão da atividade dessas enzimas em alguns tumores como os de ovário e mama (Cornarotti *et al.*, 1996). Assim, tumores com altos níveis de topoisomerase II seriam mais sensíveis à ação de venenos para essa enzima. Os genes que codificam as topoisomerasas humanas estão perto de oncogenes associados ao câncer e são co-amplificadas em alguns tumores (Comarotti *et al.*, 1996). Deste modo, o gene para topo II α está próximo ao gene *erbB2* implicado no câncer de mama (Murphy *et al.*, 1995) e o gene para a topoisomerase I está perto do sinal de transdução *src* da família da tirosina cinase (Parsons & Parsons, 1997).

Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos que demonstraram a ação inibitória de alguns flavonóides em concentrações mais elevadas na atividade da topoisomerase I (Boege *et al.*, 1996). A biflavona 7"-O-metilagatisflavona apresentou atividade antitumoral significativa *in vivo* e *in vitro* em tumor de Ehrlich e S180, provavelmente como resultado em parte pela ação sobre a topoisomerase I.

Os flavonóides podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer, e preventivos estudando-se a relação estrutura-atividade para a seleção de derivados com ação em topoisomerasas (Cody *et al.*, 1987).

CONCLUSÕES



Replicação do DNA

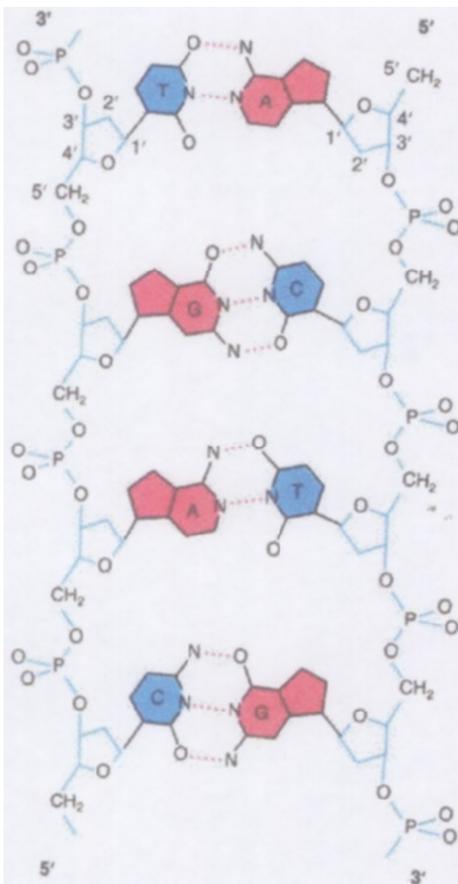
GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R., GELBART, W. M. N. **Introdução à Genética**, 6^a ed., Guanabara Koogan, 1998.

5. CONCLUSÕES

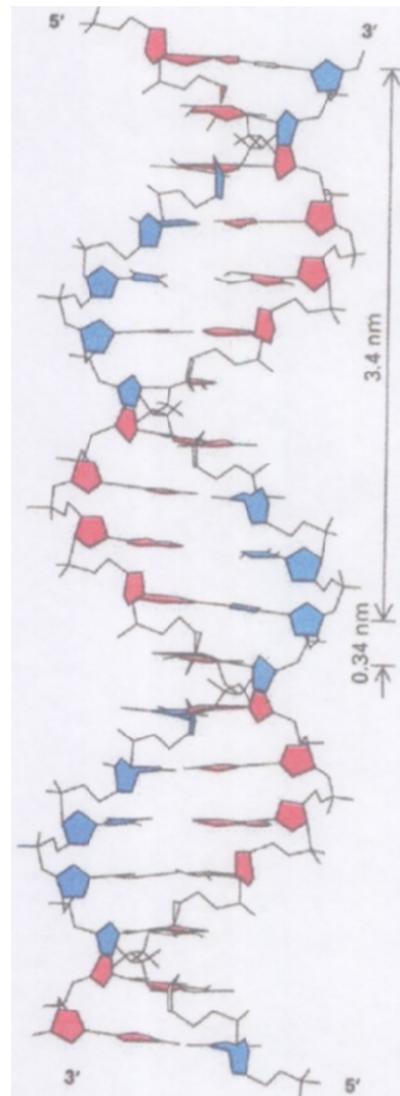
Neste trabalho concluímos que:

- Os derivados mesoiônicos **MI-D** e **MI-J**, o diterpeno DCTN e a biflavona 7"-O-metilagatisflavona apresentaram resposta antitumoral significativa contra os tumores murinos Ehrlich e S180, *in vitro* e *in vivo*.
- As substâncias **MI-D** e **MI-J**, inibiram a síntese de DNA, de proteínas e, ainda, inibiram a atividade da topoisomerase I formando o complexo de quebra e intercalaram-se ao DNA.
- As substâncias **MI-D** e **DCTN** induziram atividade de TNF- α *in vivo*.
- Além disso, nas doses ensaiadas, os derivados mesoiônicos não parecem afetar o sistema hematopoiético, sugerindo serem agentes quimioterápicos promissores.
- As biflavonas 7"-O-metilagatisflavona e amentoflavona ativaram a via que leva à morte celular e inibiram a atividade da DNA topoisomerase I.
- A análise por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para um fragmento do gene *p53*, indicou a amplificação de um fragmento do gene em células de Ehrlich tratadas com os flavonóides, amentoflavona, 7"-O-metilagatisflavona e quercetina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



DNA



LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPUSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**, 3^d ed., Scientific American Books, New York, 1995.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**, 2nd ed., W.B. Saunders Company, 1994, 457 p.
- ALBERTS, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 3th ed., New-York , Garland Publishing Inc., 1994, 1294 p.
- AMORAS, A. M. S. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de alguns compostos mesoiônicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas**. Monografia, 46 p., Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.
- ANAND, K. K., GUPTA, V. N., RANGARI, V., SINGH, B., CHANDAN, B. K . Structure and hepatoprotective activity of a biflavonoid from *Canarium manii*. **Planta Med.**, v. 58, p. 494-495, 1992.
- ASIMAKOPOULOS, F. A., WHITE, N. J., NACHEVA, E., GREEN, A. Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 84, p. 3086-3094, 1994.
- ATLAS, M. R. **Principles of Microbiology**, 2nd ed., W C. Brown Publishers, 1996, 1298 p.

- AVILA, M. A., VELASCO, J. A., CANSADO, J., NOTARIO, V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2424-2428, 1994.
- BAILLY, C., DASSONNEVILLE, L., COLSON, P., HOUSIER, C., FUKASAWA, K., NISHIMURA, S., YOSHINARI, T. Intercalation into DNA is not required for inhibition of Topoisomerase I by indolocarbazole antitumour agents. **Cancer Res.**, v. 59, p. 2853-2860, 1999.
- BARTON, J. K., GOLDBERG, J. M., KUMAR, C. V., TURRO, N. J. Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium (II). Enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 108, p. 2081-2088, 1986.
- BERGER, J. M., GAMBLIN, S. J., HARRISON, S. O., WANG, J. G. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature**, v. 379, p. 225-232, 1996.
- BERGER, J. M. Structure of DNA Topoisomerases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 3-18, 1998.
- BEUTLER, J. A., HAMEL, E., VLIETINEK, A. J., HAEMRS, A., RAJAN, P., ROITMAN, J. N., CARDELLINA, J. H., LOYD, M. R. Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 2333-2338, 1998.
- BIBBY, M. C., PHILLIPS, R. M., DOUBLE, J. A., PRATESI, G. Anti-tumor activity of flavone acetic acid (NSC 3475112) in mice- influence of immune status. **Br J. Cancer**, v. 63, p. 57-62, 1991.
- BLOOMFIELD, V. A., CROTHERS, D. M., TINOCO, J. R. I. **Physical Chemistry of Nucleic Acids**, New York, Harper & Row, 1974, 517 p.
- BOEGE, F., STRAB, T., KEHR, A., BOESENBERG, C., CHRISTIANSEN, K.,

- ANDERSEN, A., JAKOB, F., KOHRLE, J. Selected Novel Flavones Inhibit the DNA binding or the DNA religation step of Eukaryotic Topoisomerase I. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 2262-2270, 1996.
- CADENA, S. M. S. C., CARNIERI, E. G. S., ECHEVARRIA, A., OLIVEIRA, M. B. M. Effect of **MI-D**, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v. 440, p. 46-50, 1998.
- CAPRANICO, G., BINASHI, M., BORGNETTO, M. E., ZUNINO, F., PALUMBO, M. A. Protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 303-346, 1997.
- CAPRANICO, G., ZUNINO, F. Antitumor inhibitors of DNA Topoisomerases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 1, p. 1-14, 1995.
- CARPENTER, M. L., KNEALE, G. G. Analysis of DNA-Protein Interactions by intrinsic fluorescence, In **Methods in Molecular Biology**, New Jersey, ed. Kneale G.G., Humana Press Inc., 1994, v. 30, p. 313-325.
- CASTILLO, M. H., PERKINS, E., CAMPBELL, J. H., DOERR, R., HASSET, J. M., KANDASWAMI, C., MIDDLETON, E. The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin **Am J. Surgery**, v. 158, p. 351-355, 1989.
- CHEN, A. Y., LIU, L. F. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and lethal targets. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 34, p. 191-218, 1994.
- CHEN, G. L., YANG, L., ROWE, T. C., HALLIGAN, B. D., TEWEY, K. M., LIU, L. F. Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA Topoisomerase II. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 13560-13566, 1984.
- CHENG, K. K., ECHEVARRIA, A., GALLEMBECK, S., MACIEL, M. A. M., MILLER,

- J., RUMJANECK, V., SIMAS, A. M. Mesoionic compounds. Part IV: Crystal structure of 1,4,5-triphenyl-1,3,4 triazolium-2-thiolate. **Acta Crystallogr.**, C. C49, p.1092-1094, 1993.
- CHRISEY, L. A., BONJAR, G. H., HECHT, S. M. DNA strand scission by (-)-epicatechin and procyanidin B2. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 110, p. 644-646, 1988.
- CODY, V., MIDDLETON, E. JR., HARBORNE, J. B. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, AR Liss, 1987, 592 p.
- COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.**, v. 328, p.1-16, 1997.
- CORNAROTTI, M., CAPRANICO, G., BOHM, S., ORIANA, S., SPATTI, G. B., MARIANI, L., BALLABIO, G., ZUNINO, F. Gene expression of DNA topoisomerases I, II α and II β and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 67, p. 479-484, 1996.
- CORY, S. Cell death throes. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 95, p. 12077-12079, 1998.
- COSTA, A. M. L, SILAVA, J. C.R., CAMPOS, A. R., RAO, V. S. N., MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth, in rats. **Phytotherapy Res.**, v. 13, p. 1-3, 1999.
- CORY, S. Cell death throes. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 95, p. 12077-12079, 1998.
- COTRAN, R., KUMAR, V., ROBBINS, S. L., SCHOEN, F. J. **Patologia Estrutural e Funcional**, 5^a ed, Guanabara & Koogan, 1994, 1277 p.
- COXON, J.M., HALTON, B. *Organic Photochemistry*, 2nd ed., Cambridge University Press, 1987.
- DA SILVA, E. F. **Solvatocromismo & Citotoxicidade de derivados heterocíclicos da**

- classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas**. Seropédica, 1998. 171 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, CPGQO, 1998.
- DA SILVA, E. F., GRYNBERG, N. F., TONIATO, J. V., ECHEVARRIA, A. Ação de derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-aminas sobre a atividade de DNA topoisomerasas e intercalação com o DNA do timo. **22^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.
- DEVITA JR., V. T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S. A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**, 5th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997, v. 1, 1539 p.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic approach**, New York, John Wiley & Sons, 1998, 466 p.
- DONEHOWER, L. A., BRADLEY, A. The tumor suppressor p53. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1155, p. 181-205, 1993.
- ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F., SHINZATO, T. O., GOMES, R. M.. Síntese e atividade antitumoral de novos compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-triazólio. **Rev. Bras. Canc.**, v. 33, p. 274-275 (Apresentado no 2^o Encontro Nacional de Pesquisa em Câncer, Rio de Janeiro, 1987).
- ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Reactivity in S_NAr reactions of 2(4-chloro-3-nitrophenyl)-1,3-diphenyl-1,3,4-triazol-1-ium-5-thiolate with some anionic and neutral nucleophiles. **J. Chem Soc Perkin Trans.**, v. 11, p. 1425-1428, 1989.
- ECHEVARRIA, A., GALLENBECK, S. E., MACIEL, A. M., MILLER, J., MONTANARI, C. A., RUMJANECK, V. M., SIMAS, A. M., SANDOLL, J. P. Reaction of aroyl chlorides with 1,4-diphenylthiosemicarbazole: Formation of both 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and 1,3,4-triazolium-2-thiolate. **Heterocyclic-Communications**, v. 1, p. 129-136, 1995.

- EDER, J. Tumour necrosis factor α and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? **TiPS**, v. 18, p. 319-322, 1997.
- EIGLER, A., SINHA, B., HARTMANN, G., ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine, **Immunology Today**, v. 18, p. 487-492, 1997.
- ESPEVIK, T., NISSEN-MEYER, J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. **J. Immunol. Methods**, v. 95, p. 99-195, 1986.
- FERREIRA, P. S., ARAÚJO, JR., C. M., SANTOS, A. C. S., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F. Parâmetros Hematológicos e Citotoxicidade de Compostos mesoiônicos. **X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, São Paulo, 1994.
- FESEN, M. R., POMMIER, Y., LETEURTRE, F., HIROGUCHI, S., YUNG, Y., KOHN, K. W. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenyl ester (CAPE) and related compounds. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 595-608, 1994.
- FIDLER, I. J. Molecular Biology of Cancer: Invasion and Metastasis, **In Cancer: Principles and Practice of Oncology**, 5th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997, v. 1, 1539 p., p. 135-152.
- FOLKMAN, J. Antiangiogenic Therapy, **In Cancer: Principles and Practice of Oncology**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997, v. 2, 1584 p., p. 3075-3085.
- FRANKS, L. M., TEICH, N. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**, 3^d ed., Oxford University Press, 1998.
- GEISSMAN, T. A., CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. California, Freeman, Cooper Company, 1969, 592 p.

- GERAN, R. I, GREENBERG, N. H., MACDONALD, M. M, SCHUMACHER, A. M.,
ABOTT, R. J. Protocols for screening chemical agents and natural products against
animals tumours and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Rep.**, v. 3, p.
1-103, 1972.
- GOBERT, C., BRACCO, L., ROSSI, F., OLIVIER, M., TAZI, J., LAVELLE, F.,
LARSEN, A. K., RIOU-F. Modulation of DNA Topoisomerase I activity by p53.
Biochemistry, v. 35, p. 5778-5786, 1996.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, ed. J. G. Hardman
& L.E. Limbird, 9^a ed., Rio de Janeiro, McGraw Hill Interamericana, 1996, 1436 p.
- GRYNBERG, N. F., BRIOSO, P. S. T., VELANDIA, J. R., ECHEVARRIA, A.,
CARVALHO, M. G., BRAZ-FILHO, R. Antiproliferative effects and activation of
apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones, **Proceedings 17th International
Cancer Congress**, v. 1, p. 317-320, Rio de Janeiro, 1998.
- GRYNBERG, N., ECHEVARRIA, A., LIMA, J. E., PAMPLONA, S. S. R., PINTO, A. C.,
MACIEL, M. Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes: Trans-
dehydrocrotonin and trans-crotonin from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, in press.
- GRYNBERG, N., GOMES, R., SHINZATO, T., ECHEVARRIA, A, MILLER, J. Some
new aryl-sydnonones: Effects on murine tumours. **Anticancer Res.**, v. 12, p. 1025-1028,
1992.
- GRYNBERG, N., SANTOS, A. C., ECHEVARRIA, A. Synthesis and in vivo antitumor
activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class.
Anticancer Drugs, v. 8, p. 88-901, 1997.
- GUPTA, M., FUJIMORI, A., POMMIER, Y. Eukaryotic DNA Topoisomerases I.
Biochem. Biophys. Acta, v. 1262, p. 1-14, 1995.

- GURA, T. Systems for identifying new drugs are often faulty. **Science**, v. 273, p. 1041-1042, 1997.
- HAGESAWA, H., UEDA, M., FURUKAWA, K., WATANABE, M., TERAMOTO, T., MUKAI, M., KITAHAMA, M. p53 gene mutations in early colorectal carcinoma de novo vs. adenoma- carcinoma sequence. **Int. J. Cancer**, v. 64, p. 47-51, 1995.
- HALL, P. A., LANE, D. P. Genetics of growth arrest and cell death: key determinants of tissue homeostasis. **Eur. J. Cancer**, v. 30A, p. 2012-2015, 1994.
- HARBORNE, J. B., MARBRY, J. J., MARBRY, H. **The Flavonoids**. Chapman & Hall, London, 1975.
- HARRIS, C. C. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, v. 262, p. 1980-1981, 1993.
- HASDAY, J. D., SHAH, E. M., LIEBERMAN, A. P. Macrophage Tumor Necrosis Factor α release is induced by contact with some tumors. **J. Immunol.**, v. 145, p. 371-379, 1990.
- HAVELL, E.A., FIERS, W., NORTH, R. J. The antitumor function of Tumor Necrosis Factor (TNF). 1. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1067-1085, 1988.
- HIRANO, T., ABE, K., GOTOH, M., OKA, K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. **Brit. J. Cancer**, v. 72, p. 1380-1388, 1995.
- HIREMATH, U. S., YELAMAGGAD, C. V., BADAMI, B. V., BADAMI, B. V., PURANIK, G. S. Synthetic utility of 3-[4-(hydrazinecarbonyl)] phenyl-sydnone: Synthesis and antimicrobial activity of 3-[4[(2,5-dimethylpyrrol-1-ylaminocarbonyl)]-

- 3-[4-(5-amino-4-ethoxycarbonyl-3-methylsulfanylpyrazol-1-ylcarbonyl)]- and 3-[4[(1,3,4-oxadiazol-2-yl)]-phenylsydnones. **J. Chem. Res. (S)**, p. 502-503, 1994.
- ILLIDGE, T. M. Radiation-induced apoptosis. **Clin Oncol.**, v. 10, p.3-13, 1998.
- JOYEUX, M., LOBSTEIN, A., ANTON, R., MORTIER, F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. **Planta Med.**, v. 61, p. 126-129, 1995.
- KANDASWAMI, C., PERKINS, E., DRZEWIECKI, G., SOLONIUK, D. S., MIDDLETON JR., E. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids **Anti-Cancer Drugs**, v. 3, p. 525-530, 1992.
- KAUFMANN, S. H. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note. **Cancer Res.**, v. 49, p. 5870-5878, 1989.
- KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KIER, L. B., ROCHE, E. B. Medicinal Chemistry of Mesoionic Compounds. **J. Pharm. Sciences**, v. 56, p 149-168, 1967.
- KLOSTERGAARD, J.M., LEROUX, M.E., HUNG, M-C. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro. Characterization of cytolytic responses to Tumor Necrosis Factor and Nitrite Oxide pathways in vitro **J. Immunol.**, v. 147, p. 2802-2808, 1991.
- KOROKOLVAS, A., BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**, Guanabara Koogan, 1988, 783 p.
- KUMAR, C. V., ASUNCION, E. H. DNA binding studies and site selective fluorescence

- sensitization of an anthryl probe. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p. 8547-8553, 1993.
- LÄHTEENMÄKI, L., SIEVI, E., VAPAATALO, H. Inhibitory effects of mesoionic 3-aryl substituted oxatriazole-5-imine derivatives on vascular smooth muscle cell mitogenesis and proliferation in vitro. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 402-408, 1998.
- LAMARTINIERI, C. A., MOORE, J., HOLLAND, M., BARNES, S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 208, p. 120-123, 1995.
- LANE, D. P. The regulation of p53 function: Steiner award lecture. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 623-627, 1994.
- LANE, D. P., HALL P. A. MDM2 –arbiter of p53's destruction, **TIBS** v. 22, p. 372-374, 1997.
- LEIST, M., NICOTERA, P. Apoptosis, Exotoxicity and Neuropathology. **Experimental Cell Res.**, v. 239, p. 183-201, 1998.
- LEPECQ, J. B., PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-Chemical characterization. **J. Mol. Biol.**, v. 27, p. 87-105, 1967.
- LEWIN, B. **Genes VI**, Oxford University Press, 5th ed., 1997, 1260 p.
- LIMA, A. O., SOARES, J. B., GRECO, J. B. GALIZZI, J., CANÇADO, J. R.. **Técnicas de laboratório aplicados à clínica. Técnica e Interpretação.** 7^a ed., Guanabara Koogan, 1992.
- LIMA, J. E., SAMPAIO, A. L. F., HENRIQUES, M. M. O., BARJA-FIDALGO, C. Lymphocyte activation and cytokine production by Pisum sativum agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. **Immunopharmacology**, v. 42, p. 147-155, 1999.

- LIU, L. F., MILLER, K. Eukaryotic DNA Topoisomerases: Two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 78, p. 3487-3491, 1981.
- LIU, L.F. DNA Topoisomerase Poisons as Antitumor Drugs. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 351-375, 1989.
- LIU, L. F. DNA Topoisomerases: Biochemistry and Molecular Biology. **Adv. Pharmacol.**, v. 29 A, p. 1-320, Academic Press, 1994.
- LU, X., KOPUN, M., WERNER, D. Cell cycle phase-specific cDNA libraries reflecting phase-specific gene expression of Ehrlich ascites cells growing *in vivo*. **Exp. Cell Res.**, v. 174, p.199-214, 1988.
- MACIEL, M. A M. **Croton cajucara: Uma escolha etnobotânica**. Rio de Janeiro, 1997. 243 p. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.
- MATTHEWS, H. R., FREEDLAND, R, MIESFELD, R. L. **Biochemistry, A short course**, New York, John Wiley & Sons Inc., 1997, 505 p.
- MAYR, B., SCHAFFNER, G, KURZBAUER, R, REIFINGER, M, SCHELLANDER, K. Sequence of an exon of tumour suppressor p53 gene – A comparative study in domestic animals: mutation in a feline solid mammary carcinoma. **Br. Vet. J.**, v. 151, p. 325-329, 1995.
- MEAGER, A., LEUNG, H., WOOLEY, J. Assays for tumour necrosis factor and related Cytokynes. **J. Immunol. Methods**, v. 116, p. 1-17, 1989.
- MITIDIERI, E., MITIDIERI, O. **Problemas e Exercícios em Bioquímica**, ed. Interciência, 1978, 369 p.
- MOILANEN, E., THOMSEN, L. L., MILES, D. W., HAPPERFIELD, L., KNOWLES, S.,

- MONCADA, S. Persistent induction of nitric oxide synthase in tumours from mice treated with the anti-tumour agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. **Brit. J. Cancer**, v. 77, p. 426-433, 1998.
- MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, ^a, GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, J., BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-76, 1991.
- MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., MIYATA, Y., KYIAN, N. Z., MILLER, J. Algumas propriedades espectroscópicas dos produtos cíclicos da reação de acilação anidra de 1,4-difeniltiossemicarbazida. **Química Nova**, v. 16, p. 404-408, 1994.
- MOREAU, P., ANIZON, F., SANCELME, M., PRUDHOMME, M., SEVÈRE, D., RIOU, J-F., GOOSSENS, J-F., HÉNICHART, J-P., BAILLY, C., LABOURIER, E., TAZZI, J., FABBRO, D., MEYER, T., AUBERTIN, A M. Synthesis, mode of action, and biological activities of rebeccamycin bromo derivatives. **J. Med. Chemistry**, v. 42, p. 1816-1822, 1999.
- MOREIRA, I. C., CARVALHO, M. G., BASTOS, A B. O. F., BRAZ-FILHO, R. A Flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. **Phytochemistry**, v. 53, p 833-838, 1999.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOWAT, M R. A. p53 in tumor progression: Life, death, and everything. **Adv. Cancer Res.**, v. 74, p. 25-48, 1998.
- MULLINS, D. W., WALKER, T. M., BURGER, C. J., ELGERT, K. D. Taxol-mediated change in fibrosarcoma-induced immune cell function: modulation of antitumour activities. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 45, p. 20-28, 1997.

- MURPHY, D. S., MCHARDY, P., COUTTS, J., MALLON, E. A., GEORGE, W. D., KAYE, S. B., BROWN, R., KEITH, W. N. Interphase cytogenetic analysis of *erbB2* and *topoII α* co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ. **Int. J. Cancer**, v. 64, p. 18-26, 1995.
- NANDI, R., MAITI, M. Binding of sanguinarine imine to deoxyribonucleic acids of differing base compositions. **Biochem Pharmacol.**, v. 34, p. 321-324, 1985.
- NANDI, R., DEBNATH, D., MAITI, M. Interactions of berberine with poly (A) and tRNA. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1049, p. 339-342, 1990.
- NANDI, R., CHAKRABORTY, S., MAITI, M. Base and sequence-dependent binding of aristolactam β -D-Glucoside to deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, v. 30, p. 3715-3720, 1991.
- NERDAL, W., ANDERSEN, Ø. M., SLETTEN, E. NMR studies of a plant flavonoid – DNA oligonucleotide complex. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 47, p. 658-662, 1993.
- NEWTON, C. G., RAMSDEN, C. A. Mesoionic heterocycles (1976-1980). **Tetrahedron**, v. 38, p. 2965-3010, 1982.
- NORTH, R., HAVELL, E. A. The antitumor function of Tumor Necrosis Factor (TNF). II. Analysis of the role of endogenous TNF in endotoxin-induced hemorrhagic necrosis and regression of an established sarcoma. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 1086-1099, 1988.
- O'CONNOR, P. M., JACKMAN, J., BAE, I, MYERS, T. G., FAN, S., MUTOH, M., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., SAUSVILLE, E. A., WEINSTEIN, J. N, FRIEND, S., FORNACE JR., A J., KOHN K. W. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute. Anticancer drug screen and correlations with the growth- inhibitory potency of 123 anticancer agents. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4285-4300, 1997.

- OKUDA, M., UMEDA, A., SAKAI, T., OHASHI, T., MOMOI, Y., YOUNG, H.-W., WATRI, T., GOITSUKA, R., TSUJIMOTO, H., HAGESAWA, A. Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. **Int. J. Cancer**, v. 58, p. 602-607, 1994.
- OZBUN, M. A., BUTEL, J. S. Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: A critical analysis **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p. 71-141, 1995.
- PARSONS, J. T., PARSONS, S. J. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 187-192, 1997.
- PEZZUTO, J. M. Plant derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-133, 1997.
- PHILLI, H. G., SAFAK, C., ABBASAGLER, V. Sydnone derivatives: Synthesis and antimicrobial activity. **Arch Pharm.**, v. 326, p. 559-561, 1993.
- POMMIER, Y., POURQUIER, P., FAN, Y., STRUMBERG, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 83-106, 1998.
- PRATT, W. B., RUDDON, R. W., ENSMINGER, W. D., MAYBAUM, J. **The Anticancer Drugs**, 2nd ed., Oxford University Press, 1994, 352 p.
- RAMACHANDRA, S., STUDZINSKI, G. P. Morphological and biochemical criteria of apoptosis, In **Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach**, New York, IRL Press, 1995, 269 p., p. 119-142.
- RAO, G. N. **Espectroscopia Ultravioleta y Visible**, editorial Alhambra, S.A, Madrid, 1967, 308 p.
- RIEBER, M., RIEBER, M. S. Induction of p53 and melanoma cell death is reciprocal with

- down-regulation of E2F, cyclin D1 and pRb. **Int. J. Cancer**, v. 76, p. 757-760, 1998.
- ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. **Farmacognósia e Farmacobiocologia**, São Paulo, Editorial premier, 1997, 372 p.
- ROITT, I. **Essential Immunology**, 9th ed., Oxford, Blackwell Science, 1997, 476 p.
- ROST, F. W. D. **Fluorescence Microscopy**, Cambridge University Press, 1992, v. 1.
- RUBIN, E., PANTAZIS, P., BHARTI, A., TOPPMEYER, D., GIOVANELLA, B., RUFÉ, D. Identification of a mutant topoisomerase I with intact catalytic activity and resistance to 9-nitro-camptothecin. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 2433-2439, 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press publications, 1987.
- SANÉ, A-T., BERTRAND, R. Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G1 arrest followed by necrotic cell death. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3565-3569, 1999.
- SANTOS, A. C. S. **Síntese, Espectroscopia e Correlação de energia livre de novos heterocíclicos mesoiônicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina**. Seropédica, 1992. 140 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, CPGQO, 1992.
- SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O., PANICI, P. B., PIANTELLI, M., BONANNO, G., DE VINCENZO, R., FERRANDINA, G., RUMI, C., LAROCCA, L. M., MANCUSO, S. Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells. **Br. J. Cancer**, v. 62, p. 942-946, 1990.
- SCATCHARD, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann. N.Y.**

- Acad. Sci.**, v. 51, p. 660-672, 1949.
- SCHNEIDER, E., HSIANG, Y-H., LIU, L. DNA Topoisomerases as anticancer drug targets. **Adv. Pharmacol.**, v. 21, p. 149-183, 1990.
- SCHOMBURG, U., GROSSE, F. Purification and characterization of DNA topoisomerase II from calf thymus associated with polypeptides of 175 and 150 kDa. **Eur J. Biochem.**, v. 160, p. 451-457, 1986.
- SELIVANOVA, G., WIMAN, K. G. p53: A cell cycle regulator activated by DNA damage. **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p. 143-179, 1995.
- SEN, A., MAITI, M. Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 2097-2102, 1994.
- SHINZATO, T. O., GRYNBERG, N. F, GOMES, R. M., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Antitumour activity of new mesoionic compounds against three murine tumours. **Med. Sci. Res.**, v. 17, p. 865-866, 1989.
- SIELMAN, R. J., CATCHPOOLE, D. R., STEWART, B. W. Drug-induced death of leukaemic cells after G2/M arrest: higher order DNA fragmentation as an indicator of mechanism. **Brit. J. Cancer**, v. 77, p. 40-50, 1998.
- SILVERSTEIN, R. M., BASSIER, G. C., MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of Organic compounds**, New York, John Willey & Sons, 1981, 387 p.
- SKEHAN, P. Assays of cell growth and cytotoxicity, in Studzinsky ed. **Cell growth and Apoptosis**, p.169-191. A Practical Approach, New York, IRL Press, 1995.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A, MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T, BOKESCH, H, KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

- SKOOG, D. A., LEARY, J. L. **Principles of Instrumental Analysis**, 4th ed., Saunders Publishing, 1992, 700 p.
- SONG, Z., VARANI, J., GOLDSTEIN, I. J. Differences in cell surface carbohydrates, and in laminin and fibronectin synthesis, between adherent and non-adherent Ehrlich ascites tumor cells. **Int. J. Cancer**, v. 55, p. 1029-1035, 1993.
- SOONG, R., IACOPETTA, B. J., HARVEY, J. M., STERRETT, G. F., DAWKINS, H. J. S., HAHNEL, R., ROBBINS, P. D. Detection of p53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poor survival in breast cancer. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol)**, v. 74, p. 642-647, 1997.
- SOUZA, M. A. S. **Síntese e utilização de compostos heterocíclicos da classe 1,3,4-tiadiazólio como sondas fluorescentes**. Seropédica, 1996, 126 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, CPGQO, 1996.
- STAFFORD, H. A. **Flavonoid Metabolism**, Florida, CRC Press Inc., 1990, 298 p.
- STEWART, L., REDINHO, M. R., QIU, X., HOL, W. G. J., CHAMPOUX, J. J. A model for the mechanism of human topoisomerase I. **Science**, v. 279, p. 1534-1541, 1998.
- STREITWIESER, A., HEATHCOCK, C. H., KOSOWER, E. M. **Introduction to Organic Chemistry**, 4th ed., MacMillan Publishing Company, 1992, 1256 p.
- STRUMBERG, D., POMMIER, Y., PAULI, K., JAYARAMAN, M., NAGAFUJI, P., CUSHMAN, M. Synthesis of cytotoxic indenoisoquinoline topoisomerase I poisons. **J. Med. Chem.** v. 42, p. 446-457, 1999.
- SUOLINA, M., BUCHSBAUM, R. N., RACKER, E. Effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. **Cancer Res.**, v. 35, p. 1865-1872, 1975.
- SUPPAN, P. **Chemistry and Light**, Cambridge, Royal Society of Chemistry Publishers, 1994, 295 p.

THEODORESCU, D., LADEROUTE, K.R., CALAAGAN, J. M., GULDINO, K. M.

Inhibition of human bladder cancer cell motility by genistein is dependent on epidermal growth factor receptor but not p21 ras gene expression. **Br. J. Cancer**, v. 78, p. 773-782, 1998.

THOMSEN, L. L., CHING, L-M., ZHUANG, L., GAVI, J.B., BAGULEY, B. C. Tumor-dependent increased plasma nitrate concentrations as an indication of the antitumor effect of flavone-8-acetic acid and analogues in mice. **Cancer Res.**, v. 51, p. 77-81, 1991.

THORNBERRY, N. A. The caspase family of cysteine proteases. **Brit. Med. Bulletin**, v. 53, p 47-490, 1997.

TORRES, M. A., ECHEVARRIA, A. , CANTO-CAVALHEIRO, M. M., LEON, L. L.

Preliminary structure-activity relationships of the some N-aryl-sydnones in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Congresso Nacional de Parasitologia**, Caxambú, Minas Gerais, 1998.

TRAGANOS, F., ARDELT, B., HALKO, N., BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, Z. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. **Cancer Res.**, v. 52, p. 6200-6208, 1992.

URANO, S., PRICE, H. L., FETZER, S. M, BRIEDIS, A. V., MILLMAN, A.,

LEBRETON, P. R. Photoemission probes of hydrocarbon-DNA interactions: A comparison of DNA influences on the reactivities of (\pm)-trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyrene, benzo[a]pyrene 4,5-oxide and benz[a]anthracene 5,6-oxide **J. Am Chem. Soc.**, v. 113, p. 3881-3893, 1991.

VAN DER ZEE, A. G., HOLLEMA, H., DE JONG, S., BOONSTRA, H., GOUW, A.,

- WILLEMSE, P. H., ZIJKSTRA, J. G., DE VRIES, E. G. P-glycoprotein expression and DNA topoisomerase I and II activity in benign tumours of the ovary and in malignant tumors of the ovary, before and after platinum/cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 51, p. 5915-5920, 1991.
- VAUX, D. L., KORSMEYER, D. Cell death in development. **Cell**, v. 96, p.245-254, 1999.
- VELANDIA, J. R. **Constituintes químicos de *Ouratea semiserrata* e transformações químicas da *Neolignana aureína***. Seropédica, 1997. 155 p. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, CPGQO, 1997.
- VILPO, J. A., VILPO, L. M., VUORINEN, P., MOILANEN, E., METSÄ, K. T. Mode of cytostatic action of mesoionic oxatriazole nitric oxide donors in proliferating human hematopoietic cells. **Anticancer Drug Des.**, v. 12, p. 75-89, 1997.
- WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., MC PAHIL, A. T. Plant antitumour agents. VI Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumour agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem Soc.**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.
- WANG, J. C. DNA Topoisomerases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 665-697, 1985.
- WANG, J. C. DNA Topoisomerases as targets of therapeutics: An overview. **Adv. Pharmacol.**, v. 29A, p. 1-19, 1994.
- WANG, J. C. DNA Topoisomerases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 633-692, 1996.
- WARING, M. Drugs which affect the structure and function of DNA. **Nature**, v. 219, p.1320-1325, 1968.
- WARING, M. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation. **J. Mol. Biol.**, v. 54, p. 247-270, 1970.

- WARING, M. DNA modification and Cancer **Ann. Rev. Biochem.**, v. 50, p.159-192, 1981.
- WATSON, J. D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J., Zoller, M. **O DNA Recombinante**, 2nd Ouro Preto , ed. UFOP, 1997, 624 p.
- WATTENBERG, L. Chalcones, myo-inositol and other novel inhibitors of pulmonary carcinogenesis. **J. Cell. Biochem.**, v. 22, p. 162-168, 1995.
- WILLIAMS, C. S. F. **Practice guide to Laboratory Animals**. Saint Louis, C.V. Mosby Company, 1976.
- WUERZBERGER, S .M., PINK, J. J., PLANCHON, S. M., BYERS, K. L, BORNMANN, W. G., BOOTHMAN, D. A. Induction of apoptosis in MCF-7: WS8 breast cancer cells by β -lapachone. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1876-1885, 1998.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F. R., CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **Brit. Med. Bulletin**, v. 53, p. 451-465. 1997
- YAMASHITA, Y., KAWADA, SHO-ZOU, FUJII, N., NAKANO, H. Induction of mammalian Topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, Genistein and Orobol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 39, p. 737-744, 1990a.
- YAMASHITA, Y., KAWADA, SHO-ZOU, FUJII, N., NAKANO, H. Induction of mammalian DNA Topoisomerases II dependent DNA cleavage by antitumor antibiotic streptonigrin. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5841-5844, 1990b.
- YANAGYHARA, K., RU, A., TOGE, T., NUMOTO, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. **Cancer Res.**, v. 53, p. 5815-5821, 1993.

- YOSHIDA, A, POURQUIER, P, POMMIER, Y. Purification and characterization of a Mg^{2+} dependent endonuclease (AN34) from etoposide-treated human leukemic HL-60 cells undergoing apoptosis. **Cancer Res.**, v. 58, p. 2576-2582, 1998.
- YOSHINARI, T., YAMADA, A., UEMARA, D., NOMURA, K., ARAKAWA, H., KOJIRI, K, YOSHIDA, E., SUDA, H., OKURA, A. Induction of Topoisomerase I-mediated DNA cleavage by a new indolocarbazole, ED110. **Cancer Res.**, v. 53, p. 490-494, 1993.
- YU, Y., LITTEL, J. B. p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4277-4281, 1998.
- ZAHIR, A., JOSSANG, A. , BODO, B., PROVOST, J., COSSON, J.P., SEVENET, T. DNA Topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Lethedon tannaensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 701-703, 1996.
- ZHAI, Y., YU, J., IRUELA-ARISPE, L., WANG, Z., HAYES, A., LU, J., JIANG, G., ROJAS, L., LIPPMAN, M. E., NI, J., YU, G-L., LI, L-Y. Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEGI, a novel cytokine of the TNF superfamily. **Int. J. Cancer**, v. 82, p. 131-136, 1999.

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Congressos

AMORAS, M. A. S., DA SILVA, E. F., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F. Inibição do crescimento do tumor de Ehrlich por tiadiazólios em associação com quercetina. **XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambú, MG, 1997.

DA SILVA, E. F., AMORAS, A. E., AZNAR, A. E., GRYNBERG, N. F. Ensaio colorimétrico para análise da quimiossensibilidade de compostos mesoiônicos frente a células de carcinoma de Ehrlich. **20º Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1997.

DA SILVA, E. F., GRYNBERG, N. F., TONIATO, J. V., ECHEVARRIA, A. Ação de derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-aminas sobre a atividade de DNA topoisomerasas e intercalação com o DNA do timo. **22ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 1999.

GRYNBERG, N. F., DA SILVA, E., VELANDIA, J. R., CARVALHO, M. G., BRAZ

FILHO, R., ECHEVARRIA, A. Citotoxicidade e inibição da atividade de DNA topoisomerase I por Biflavona. **XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambú, MG, 1999.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., ARRUDA, A. C., PAMPLONA, S. S. R., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F., FARIAS, R. A. F., LUNA, C. A. M., RAO, V. S. N. Estudo etnofarmacológico do *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, SP, 1998.

Revistas

GRYNBERG, N., SANTOS, A. C., ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. **Anticancer Drugs**, v. 8, p 88-901, 1997.

GRYNBERG, N. F., BRIOSO, P. S. T., VELANDIA, N., ECHEVARRIA, A., CARVALHO, M. G., BRAZ FILHO, R. Antiproliferative effects and activation of apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones. **Proceedings 17th International Congress**, v. I, p. 317-320,1998, RJ, Brasil.

GRYNBERG, N., ECHEVARRIA, A., LIMA, J. E., PAMPLONA, S. S. R., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Anti-tumour activity of two 19-nor-clerodane diterpenes: *Trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin from *Croton cajucara*. **Planta Med.**, *in press*.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., ARRUDA, A. C., PAMPLONA, S. S. R., ECHEVARRIA, A., GRYNBERG, N. F., FARIAS, R. A. F., LUNA, C. A. M., RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology: A combine set that allowed great success in the study of *Croton cajucara*. **Ethnopharmacology**, *in press*.