

**UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
CONSELHO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
ROSA ANDRÉA NOGUEIRA LAISO**

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO
FENÓLICO POLIFUNCIONAL 4-FORMIL-2-METOXI-FENOLATO
DE SÓDIO (V6) EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS**

SÃO PAULO
2011

**ROSA ANDRÉA NOGUEIRA LAISO
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA**

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO
FENÓLICO POLIFUNCIONAL 4-FORMIL-2-METOXI-FENOLATO
DE SÓDIO (V6) EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado
Profissional em Farmácia da
Universidade Bandeirante de
São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr.: Paulo Celso Pardi

SÃO PAULO
2011

LAISSO, Rosa Andréa Nogueira,

Mecanismo de citotoxicidade do composto fenólico polifuncional 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio(V6) células tumorais e normais. Rosa Andréa Nogueira Laiso. – São Paulo: [s.n.], 2011.

115 f ; il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado – Programa de Mestrado Farmácia –
Universidade Bandeirante de São Paulo,

Orientador: Prof. Dr. Paulo Celso Pardi

1. Citotoxicidade 2. Compostos fenólicos 3. Cultura de Células

DEDICATÓRIA

Dedico, não apenas esse trabalho, mas todas as minhas conquistas, a Victoria Maria Laiso Machado e Álvaro Jorge Laiso Machado, meus filhos, pois eles me trouxeram a luz, a força e a determinação para vencer todas as barreiras e junto a Deus chegar até aqui.

Dedico toda a minha destreza, toda a minha disciplina a minha querida e amada Carlinda Lopes Nogueira (*in memória*), minha querida avó e mãe, pela força e o amor que sei que sempre me transmitiu, e também a dois grandes e eternos amores da minha vida, Vivaldo e Nazaré, meus dois grandes amigos e companheiros, por todas as dificuldades que passei, por todas as fraquezas que eles sempre estiveram fortes como um cedro para me apoiar, ganhei com otimismo do Vivaldo e venci com a perseverança e determinação da Nazaré, me alegro e me envaideço ao pensar que essa vitória serviu e servirá de exemplo para aqueles que acharem que tudo acabou, pois o fim nada mais é que um grande começo.

E uma dedicação mais que especial a mim mesma, por não ter desistido nas horas mais difíceis e por ter acreditado que quando se deseja algo com muita fé, garra e intensidade, ela sempre acabará sendo sua.

A vocês todo o meu amor e carinho para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, **a Deus**, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais essa etapa de minha vida.

Ao Prof. Paulo Celso Pardi só pode dizer sem ele não estaria aqui, foi o filho de Deus enviado em meu Caminho, toda a minha Família te Ama.

Ao Prof. Dr. José Augustin P. Quincoces, que nesses anos passou de orientador a amigo, pelos ensinamentos, pela paciência e por sempre estar disposto a ouvir e eliminar as dúvidas de seus alunos.

À amiga Doutoranda Fernanda Faião Flores esta e família, que me ajudaram em todas as dificuldades e obstáculos não me deixando desanimar, de tantas outras coisas no laboratório e sempre estiveram dispostas a ajudar no que fosse preciso, sem esperar nada em troca.

À Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do Instituto Butantan, pela ajuda, pelos ensinamentos e pelas conversas agradáveis, que com a sua capacidade humana antes de mais nada incrível, por ter me recebido pelo simples fato de amar ao próximo e a ciência, com a doçura e anjo e a força de um leão. Homem e mestre forte e admirável. Só posso dizer muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Francisco Ribeiro de Moraes, que devo a minha atual vocação, pois foi conhecendo sua aptidão como mestre na área Biomédica, descobri um grande caminho onde estou realizando um sonho de Vida, que seu nome entre para a eternidade da sabedoria e do conhecimento, um grande abraço, meus amigos Francisco e Sônia.

À Dra. Maria Nazaré Valadares dos Santos, mulher de tamanha sabedoria e inteligência, grande mestra e profissional em sua arte, que é a

medicina, só posso agradecer infinitamente este dom e por ter salvo a minha vida.

Ao Ivair Donizeti Gonçalves, continuar sendo um grande amigo, que conquistei no início de minha formação acadêmica e espero carregar pelo resto da vida.

Aos meus amigos de sempre: Rosimeire Corrêa e Dr. Aracaty Silva Sobrinho, do Laboratório Weller Works. Valeu pela torcida e por nunca se afastarem dessa amiga tão ausente.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho em especial a Prof. Dra. Rose, a querida mestrandia Mirian e a doutoranda Sônia , por horas de trabalho e alegrias juntas
Muito Obrigada!

Gostaria de agradecer a todos os docentes do Programa de Mestrado em Farmácia, e especial a nossa coordenadora Prof.^a Dr^a Márcia Regina Machado dos Santos e ao Prof^o Dr. Sergio Mendonça.

'A realização de um sonho depende de dedicação. Quem quer fazer alguma coisa, encontra um MEIO. Quem não quer fazer nada, encontra uma DESCULPA!'

Paula Palhete.

RESUMO

LAISO, R.A.N. – MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO FENÓLICO POLIFUNCIONAL 4-FORMIL-2-METOXI-FENOLATO DE SÓDIO (V6) EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS. 2011 115f. Dissertação de Mestrado – Programa de Mestrado Profissional em farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011.

A avaliação dos mecanismos de citotoxicidade tem por função verificar a segurança de novas moléculas com potencialidade no tratamento de doenças, em especial, na molécula V6, sua potencialidade contra o câncer e sua ação citotóxica contra células normais. Para realização dos estudos de citotoxicidade do composto V6 foram utilizadas células das linhagens tumorais de melanoma humano (SKMEL-28) e de adenocarcinoma mamário murino (Ehrlich), como controle normal, fibroblastos normais humanos (FN1), células endoteliais normais humanas (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Os testes foram realizados no Laboratório Patologia Experimental da Uniban e no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan. Os resultados mostraram que o composto V6 apresentou IC_{50%} nas linhagens tumorais SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino respectivamente, 4,02 e 3,78 mg/mL, enquanto os valores de IC_{50%} nas linhagens humanas normais FN1 e HUVEC foram respectivamente, 4,82 e 5,08 mg/mL. O tratamento com o composto fenólico - V6 resultou no aumento significativo na formação de radicais peroxidados lipídicos. Os tratamentos das células tumorais de melanoma humano SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino mostraram efeitos citotóxicos marcantes em todas as concentrações do composto fenólico V6. Em células normais, endoteliais e fibroblastos o tratamento como composto fenólico V6 não se mostrou com a mesma citotoxicidade, que em células tumorais. Na linhagem de melanoma humano SKMEL-28 tratada com o composto fenólico - V6 observa-se aumento da toxicidade com a diminuição significativa do potencial elétrico mitocondrial. A linhagem de adenocarcinoma de mama murina apresentou moderado aumento do potencial elétrico, enquanto as linhagens normais de fibroblastos humanos FN1 e endoteliais HUVEC não apresentaram diferenças neste potencial. As linhagens de células tumorais de SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino e a linhagem de células endoteliais humanas normais HUVEC's apresentaram expressiva diminuição na população de células na fase de quiescente GO/G1 e aumento na fase de divisão celular G2/M. As células de adenocarcinoma mamário murino e endoteliais normais HUVECs apresentaram aumento significativo na expressão de caspase-3 fosforilada, nas análises realizadas em citometria de fluxo. Como conclusão acreditamos que o composto V6 apresentou valores de IC_{50%} menores para as linhagens tumorais de adenocarcinoma mamário e melanoma comparados às linhagens normais de células endoteliais e fibroblastos o que indica uma menor quantidade requerida do composto para tratamento antitumoral. Em células normais, o composto V6 demonstrou potencial citoprotetor com elevação na quantidade de radicais livres. Ainda, a linhagem de fibroblastos humanos apresentou moderada elevação na população de células em proliferação, demonstrando o efeito seletivo de ação e baixa toxicidade do composto V6.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Compostos fenólicos, Testes pré-clínicos

ABSTRACT

LAISO, R.A.N. - CYTOTOXICITY MECHANISMS OF PHENOLIC COMPOUND POLYFUNCTIONAL 4-FORMYL-2-METHOXY-PHENOLATE SODIUM (V6) IN NORMAL AND TUMOR CELLS. 2011 -115f. Master Program in Professional Pharmacy - Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011.

The evaluation of the mechanisms of cytotoxicity has the function to check the safety of new molecules with potential in treating diseases, especially in the molecule V6, its potential against cancer and its cytotoxic against normal cells. To carry out studies of cytotoxicity of the compound were used V6 tumor cell lines of human melanoma (SKMEL-28) and murine mammary adenocarcinoma (Ehrlich) as normal control, normal human fibroblasts (FN1), normal human endothelial cells (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells). The tests were performed at the Laboratory of Experimental Pathology Uniban and Biochemistry Laboratory of the Butantan Institute. The results showed that the compound showed IC 50% in the V6 lineage tumor SKMEL-28 and murine breast adenocarcinoma, respectively, 4.02 and 3.78 mg / mL, while the IC50% values in the normal human strains FN1 and HUVEC were respectively 4.82 and 5.08 mg / mL. Treatment with phenolic compound - V6 resulted in significant increase in the formation of lipid peroxi radicals. The treatment of human melanoma tumor cells SKMEL-28 and murine breast adenocarcinoma showed remarkable cytotoxic effects at all concentrations of the phenolic compound V6. In normal cells, fibroblasts and endothelial treatment as phenolic compound V6 was not with the same cytotoxicity to tumor cells. In the line of human melanoma SKMEL-28 treated with the phenolic compound - V6 observed increased toxicity with significant reduction of mitochondrial electric potential. The strain of murine breast adenocarcinoma showed moderate increase of the electrical potential, while the strains FN1 normal human fibroblasts and endothelial HUVEC showed no differences in this potential. The tumor cell lines SKMEL-28 and murine breast adenocarcinoma and human endothelial cell line's normal HUVEC showed a significant decrease in the population of cells in quiescent phase GO/G1 and increased cell division phase G2 / M. The murine mammary adenocarcinoma cells and normal endothelial HUVECs showed a significant increase in the expression of phosphorylated caspase-3, the analysis performed in flow cytometry. In conclusion we believe that the compound IC50 values presented V6% lower for the strains tumor mammary adenocarcinoma and melanoma lines compared to normal endothelial cells and fibroblasts which indicates a smaller amount of the compound required for tumor therapy. In normal cells, the compound has shown potential cytoprotective V6 with an increase in the amount of free radicals Still, the line of human fibroblasts displayed a moderate increase in the population of proliferating cells, demonstrating the selective effect of action and low toxicity of the compound V6

Keywords: Cytotoxicity, phenolic compounds, preclinical testing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Síntese do V6 anidro.....	36
Figura 2	Atividade citotóxica em células de melanoma humano SKMEL-28.....	49
Figura 3	Atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama murino, na presença de diferentes concentrações do composto V6.....	50
Figura 4	Atividade citotóxica em células Fibroblastos humanos normais FN1, na presença de diferentes concentrações do composto V6.....	51
Figura 5	Atividade citotóxica em células endoteliais humanas normais HUVEC, na presença de diferentes concentrações do composto V6.....	52
Figura 6	Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) de mama murino.....	54
Figura 7	Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) SKMEL-28.....	55
Figura 8	Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) HUVECs.....	56
Figura 9	Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) FN1...	57
Figura 10	Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células de melanoma humano SKMEL – 28.....	59
Figura 11	Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células fibroblastos da derme humana normal (FN1).....	61
Figura 12	Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células de adenocarcinoma de mama murina de Ehrlich....	62
Figura 13	Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células endoteliais humanas (HUVECs).....	63
Figura 14	Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2 da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina.....	66

Figura 15	Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina.....	67
Figura 16	Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2.9 da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL – 28.....	68
Figura 17	Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL-28.....	69
Figura 18	Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2.9 da linhagem de células normais endoteliais humanas HUVECs.....	70
Figura 19	Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem de células endoteliais normais humanas HUVECs.....	71
Figura 20	Histogramas representativos das populações celulares da linhagem FN1 marcadas com a sonda fluorescente Rodamina.....	72
Figura 21	Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem de fibroblastos humanos normais FN1..	73
Figura 22	Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações de células da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino.....	76
Figura 23	Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular na linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino.....	77
Figura 24	Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações de células da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL – 28.....	78

Figura 25	Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular na linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL – 28.....	79
Figura 26	Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs.....	80
Figura 27	Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs.....	81
Figura 28	representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1.....	82
Figura 29	de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1.....	83
Figura 30	Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina.....	85
Figura 31	Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1.....	86
Figura 32	Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL – 28.....	87
Figura 33	Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1 em células da linhagem de melanoma humano SKMEL - 28.	88
Figura 34	Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem endotelial humana normal HUVECs.....	89

Figura 35	Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1.....	90
Figura 36	Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem de fibroblastos humanos normais.....	91
Figura 37	Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1 da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1.	92
Figura 38	Histogramas representativos das populações celulares da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina que expressam Caspase 3 fosforilada.....	94
Figura 39	Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina.....	95
Figura 40	Histogramas representativos das populações celulares da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28 que expressam Caspase 3 fosforilada.....	96
Figura 41	Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL-28.....	97
Figura 42	Histogramas representativos das populações celulares da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs que expressam Caspase 3 fosforilada.....	98
Figura 43	Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs.....	99
Figura 44	Histogramas representativos das populações celulares da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 que expressam Caspase 3 fosforilada.....	100
Figura 45	Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1.....	101
Fgiura 46	Mecanismo de apoptose do V6.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
° C	Graus Celsius
CDKs	Ciclina dependentes de quinases
cm ²	Centímetros quadrado
CO ₂	dióxido de carbono
DL	Dose Letal
DM1	Composto Fenólico DM1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ehrlich	Adenocarcinoma mamário murino
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FLH-2	Intensidade de fluorescência do citometro de fluxo
FLH-1	Intensidade de fluorescência do citometro de fluxo
FN1	Fibroblastos normais humano
g	Gramma
G1/S	Gap entre fase G1 e fase S de síntese
G2/M	Fase Mitose gap entre fase G2 e mitose
HUVEC	Células endoteliais normais humanas
Kg	Quilograma
Ma	Melanócitos melan-a
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramma
mL	Mililitro

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
nm	Nanômetro
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PI	Iodeto de propídio
PBS	Tampão fosfato salino
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura com sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular (Cultilab).
SKMEL-28	Células das linhagens tumorais de melanoma humano
TBARs	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tm5	Melanoma murino

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	Viii
LISTA DE FIGURAS.....	Xii
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 – OBJETIVOS GERAIS.....	29
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. JUSTIFICATIVA.....	32
5. METODOLOGIA.....	35
5.1 COMPOSTO ESTUDADO.....	36
5.2 LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS	37
5.3 Avaliação da citotoxicidade do composto fenólico V6.....	38
5.3.1 Cultura das Linhagens de Células Tumorais e Normais.....	34
5.3.2 Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Proliferativa <i>in vitro</i> do composto V6 em Linhagens de Células Tumorais e Normais.....	39
5.3.3 Determinação <i>in vitro</i> de produtos da peroxidação lipídica por quantificação de TBARS.....	40
5.3.4 Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial pelo Fluorocromo Rodamina 123 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo.....	42
5.3.5 Análise das Fases do Ciclo nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo	43
5.3.6 Avaliação da Expressão de Caspase – 3 Fosforilada e ciclina D1 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo.....	44
5.4- ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	46

6. RESULTADOS.....	47
6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE PROLIFERATIVA DO COMPOSTO V6 EM LINHAGENS CELULARES TUMORAIS E NORMAIS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO MTT	48
6.2 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR QUANTIFICAÇÃO DE TBARS	53
6.3 FOTOMICROGRAFIAS OBTIDAS EM MICROSCÓPIO INVERTIDO SOBRE OS EFEITOS CITOTÓXICOS DO COMPOSTO FENÓLICO- V6.....	58
6.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL DE LINHAGENS DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS TRATADAS COM O COMPOSTO FENÓLICO - V6, POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	64
6.5 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	75
6.6 EXPRESSÃO DA CICLINA DEPENDENTE DE QUINASE REGULADORA DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR CICLINA D-1.....	84
6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CASPASE 3 FOSFORILADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	93
7. DISCUSSÃO.....	102
8. CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande potencial antioxidante, antiinflamatório, antitumoral e analgésico dos compostos fenólicos de origem natural, a equipe coordenada pelo professor doutor José Augustin P. Quincoces do Laboratório de Síntese Orgânica do Mestrado Profissional em Farmácia da Uniban, realizou pesquisas desde o ano 1999, financiadas pela FAPESP, encaminhadas à obtenção de produtos naturais com potencial ação antitumoral.

O primeiro resultado destas pesquisas foi o desenvolvimento de um novo procedimento de obtenção da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadien-3-ona (HB1), produto natural isolado por Masuda em 1993 a partir da *Curcuma domestica*. Devido ao fato que as propriedades antiproliferativas deste composto e seus derivados não tinham sido descobertas, a equipe do professor Quincoces solicitou a primeira patente de invenção para proteger estes destacados resultados (QUINCOCES, 2001; QUINCOCES, 2010).

Devido ao fato que o HB1 ser muito pouco solúvel em água foi desenvolvido um novo procedimento para obter a partir desta molécula o correspondente fenolato de sódio hidrossolúvel, denominado 4-[5-(4hidroxi-3-metoxi-fenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio, ou DM1, que apresentou atividade antioxidante, antiparasitária e antitumoral em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, culminando com o desenvolvimento de outras duas patentes de invenção baseadas principalmente na excelente ação antitumoral deste composto líder (QUINCOCES, 2004; QUINCOCES, 2009).

Motivados pelos resultados com compostos sintéticos de análogos de compostos naturais foi selecionado o produto natural vanilina como ponto de partida para a obtenção de novos princípios ativos antitumorais.

Dentre os vários compostos sintetizados, um deles, nos chamou a atenção, o 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio, denominado composto V6, que dentre outras famílias de compostos, mostrou uma atividade citotóxica significativa contra melanoma, além de potenciar a atividade antitumoral da Bleomisina e da Carboplatina (QUINCOCES, 2006).

Desta forma surgiu uma nova patente de invenção PI 0803375-7 "COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS COMPOSTOS", para proteger os resultados antioxidantes, antiparasitários e principalmente a ação antitumoral de derivados da vanilina de titularidade conjunta da UNIBAN, UNIFESP e FAPESP (QUINCOCES, 2006).

Para dar continuidade aos estudos iniciados em 2006 foi planejada esta dissertação de mestrado e o desenvolvimento de estudos na área antitumoral, principalmente na avaliação de uma série de mecanismos de ação ligados a citotoxicidade que ainda não haviam sido totalmente explorados, como expressos em nossa metodologia.

REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

A síntese e avaliação biológica de novos análogos da curcumina como anticancerígenos e agentes anti-angiogênicos foi revelada por Adams (2004) que neste artigo verificou a atividade antitumoral *in vivo* da curcumina é limitada pela pobre absorção deste composto pelo organismo, o que explicaria a baixa potência antitumoral exibida (ADAMS, 2004)

A partir da *Curcuma domestica* foram isolados compostos com alta conjugação eletrônica, tais como, Curcumina e várias pentadienonas, que exibiram propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (MASUDA, 1993).

Quincoces (2001) apresenta um resumo dos principais resultados obtidos em várias patentes, Desde longa data os povos, principalmente asiáticos, vinham usando alguns corantes isolados de varias espécies do gênero *Curcuma*, principalmente como aditivos alimentares e temperos. Devido a este fato foi de nosso interesse pesquisar os compostos que formam parte desta planta, pois os mesmos devem exibir uma baixíssima toxicidade.

Como podemos observar muitos dos Produtos Naturais isolados da Própolis e Plantas exibiram relevantes propriedades farmacológicas, tais como: antitumorais, entre outras atividades biológicas de grande importância. Devido a estes destacados resultados biológicos e ao fato de que estes compostos naturais bioativos encontram-se numa faixa de concentração muito baixa e em alguns casos misturados com substâncias de difícil separação, houve um forte aumento no número de trabalhos sintéticos envolvendo reações de obtenção destes princípios ativos nos últimos anos para garantir os necessários estudos pré-clínicos e de caracterização estrutural. Deve-se ressaltar que nem todos estes trabalhos de síntese de produtos naturais bioativos estão orientados para

possíveis aplicações na Indústria Farmacêutica, pois encontramos vias de síntese bastante complexas e de difícil produção numa escala superior.

A síntese realizada por Hori e colaboradores (2002) do ácido 3,5-Diprenil-*p*-cumárico é um exemplo do anteriormente exposto. Eles sintetizaram este produto natural partindo do *p*-Halofenol diprenilado, isolado a partir de uma mistura de produtos prenilados de difícil separação e acrilato de metila segundo o método de síntese de Mizoroky-Heck.

F. Bohlmann e colaboradores (1972) desenvolveram uma variante sintética para introduzir grupos prenilas em produtos naturais. Por exemplo, estes autores partindo de *p*-Hidroxiacetofenona e 3-Cloro-3-metil-butino-1 em presença de KI/K₂CO₃/DMF, conseguiram obter o correspondente 1-[4-(1,1-Dimetil-prop-2-iniloxi)-fenil]etanona intermediária, a qual mediante as condições de hidrogenação parcial transformou-se no produto intermediário 1-[4-(1,1-Dimetil-aliloxi)-fenil]etanona. Finalmente se forma 1-[4-Hidroxi-3-(3-metil-but-2-enil)-fenil]etanona com um 79% de rendimento a partir do derivado alílico sob as condições de reação do rearranjo de Claisen. Como desvantagem deste procedimento pode-se colocar a difícil hidrogenação parcial catalítica, que em algumas ocasiões conduz a misturas de produtos de difícil separação (QUINCOES, 2007).

A síntese da 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona foi realizada por vários autores, mas os procedimentos de obtenção empregados são de baixo rendimento e pureza e empregam tempos de reação prolongados, o que não é atrativo para a Indústria Farmacêutica, diferente dos resultados de Quincoces em 2001.

Com o objetivo de sintetizar somente aqueles compostos naturais e seus derivados com alto potencial bioativo é usado hoje em dia o Delineamento Racional de Fármacos. Em particular o programa computacional TOPS-MODE (TOPological Substructural MOlecular DEsign) desenvolvido por Estrada e colaboradores prediz quais das substâncias naturais e seus derivados possuem a maior probabilidade de exibir uma ação biológica específica (QUINCOCES, 2007).

Os fenóis e seus respectivos derivados podem causar lesão em estruturas microbianas por alterações da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando uma perda das substâncias intracelulares vitais. Esses compostos também desnaturam proteínas como as enzimas (PELCZAR e cols., 1997).

Muitos dos produtos naturais prenilados isolados da própolis e plantas exibem relevantes propriedades farmacológicas, tais como antitumorais, antimicrobianas, entre outras atividades biológicas de grande importância (MORAES e QUINCOCES, 2007).

Na própolis encontram-se principalmente fenóis polifuncionais, entre os quais merecem destaque os fenóis com grupos carboxílicos α,β -insaturados, fenóis com grupos cetônicos e aldeídicos aromáticos, que devido às surpreendentes propriedades biológicas que estes compostos exibem, temos um grande aumento do número dos trabalhos sintéticos envolvendo reações a partir de fenóis polifuncionais e aqueles que principalmente apresentam ações como antitumorais (QUINCOCES, 2001; PISCO, 2006).

Compostos fenólicos polifuncionais bioativos como o 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6) , tiveram sua ação biológica avaliada positivamente contra *Trypanosoma cruzi* (QUINCOCES, 2007) e depois também foram utilizados contra *Leishmania* e resultados preliminares mostraram atividade significativa desse e de outros compostos sobre a forma promastigota desses parasitas, fazendo com que possa se utilizar estes compostos polifuncionais como alvo terapêutico para as leishmanioses (MARTINS, 2007).

A ação do composto 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6) inibe seletivamente a proliferação de células tumorais e o desenvolvimento de tumores, além disso, o composto V6 inibe a produção de ânion superóxido, tornando as células tumorais mais susceptíveis à morte celular por agentes quimioterápicos e/ou radiação ionizante, auxiliando como agente adjuvante de quimioterápicos convencionais como a bleomicina e a carboplatina dexorrubucina (QUINCOCES 2006).

Os compostos V4 e V6 apresentaram efeito inibidor seletivo na proliferação de células de melanoma. Os compostos V4 e V6 em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL) foram analisados quanto ao efeito na proliferação das linhagens de melanócitos melan-a (ma) e de melanoma (Tm5) através do ensaio de MTT. Os compostos V4 e V6 mostraram efeito inibidor dose dependentes da proliferação de células de melanoma, mas não de melanócitos (QUINCOCES, 2007).

A atividade antioxidante do composto V6 constitui outro aspecto do uso dos compostos aqui descritos para tratar ou prevenir ou para manufaturar

medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas, de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais além da manufatura de produtos cosmético para uso no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele (QUINCOES, 2001).

O composto V6 apresentou ação sobre a proliferação de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultivo LIT causador do Mal de Chagas, determinado pelo método de MTT. Por outro lado, o composto apresenta ação sobre as formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, induzindo morte do parasita sem afetar a célula hospedeira, fato importante para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas não exibindo efeitos tóxicos indesejáveis como acontece na utilização de Nifurtimox e Benzonidazol (MARTINS E QUINCOES, 2007).

Em relação à *Leishmania*, ensaios preliminares mostraram atividade sobre as formas promastigotas desses parasitas, os compostos exibem ação leishmanicida seletiva sobre as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, fato importante para o tratamento das leishmaniose cutânea e visceral não exibindo efeitos tóxicos e resistência dos parasitas ao medicamento, como acontece na utilização de antimoniais, pentamidinas e anfotericina B, desta forma, constitui um outro aspecto da ação deste composto para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para uso no

tratamento, profilaxia ou prevenção de parasitoses(MARTINS, 2009).
(MARTINS, 2009).

Durante os últimos anos taxas de remissão de leucemias tiveram remissão de mais de 72% quanto tratadas com arsênio(III)-óxido(As_2O_3), devido a esta afinidade química pelo arsênio e pelo antimônio , foi analisado o potencial da composição anitmonio (III)-óxido (As_2O_3), que em concentrações molares menores mostrou menor eficácia na indução da apoptose e uma diminuição da caspase-dependente do potencial de membrana mitocondrial. A capacidade de moduladores do sistema redox celular em concentrações clinicamente aplicáveis parece poder melhorar os efeitos apoptóticos dos dois óxidos de um modo sinérgico que pode ser útil para reduzir a toxicidade de alguns compostos , otimizando suas doses (LOSLER, 2009)

Romagnoli e col (2010) relatam as deleções da membrana mitocondrial, onde uma série de 1-aryl-5-(3', 4', 5'-trimetoxifenil) e seus respectivos derivados 1 - (3', 4', 5'-trimetoxifenil)-5-aryl-1, 2,4 - triazóis, como análogos da Combretastatina cis-restrita, foram sintetizados e avaliados quanto à sua atividade antiproliferativa, efeitos inibitórios sobre a polimerização da tubulina, os efeitos do ciclo celular e indução de apoptose e variações no potencial elétrico da membrana mitocondrial. Segundo este estudo este composto apresentou maior atividade do que ou comparáveis com o dos compostos de referência CA-4. Na citometria de fluxo, mostrou que células tratadas com o composto pararam na fase G2/M do ciclo celular de uma forma

dependente da concentração Este efeito foi acompanhado por apoptose das células, despolarização mitocondrial, a geração de espécies reativas de oxigênio e ativação de caspase-3.

Em estudos recentes da ação do composto V6 sobre sua ação nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, foi constatado que em diversas dosagens o V6 não alterou os padrões bioquímicos do grupo controle em doses repetidas por mais de 14 dias, mostrando que do ponto de vista bioquímico não provoca alterações significativas (ARAUJO E PARDI, 2010)

Quanto aos estudos relacionados a novos fatores de análise , partimos de Marveti e col (2011), que analisaram os efeitos de um novo agente antitumoral denominado de complexo platina (II) com difenil tiourea , [Pt (bipy) (Ph (2)-tu) (2)] Cl (2), sendo este comparado a cisplatina no controle para linhagens de células humanas do carcinoma ovariano e sua variante as células C13, onde a maior acumulação de citotoxicidade foi encontrada em todos os complexos de tioureiabipiridina. Neste trabalho foi demonstrado aqui que este complexo faz com que espécies reativas de oxigênio para formar e inibir a atividade da topoisomerase II. A deficiência desta enzima levou a danos ao DNA, mostrado pelo teste do cometa. Como consequência, a distribuição do a distribuição do ciclo celular também foi bastante perturbado em ambas as linhas. A análise morfológica revelou desarranjo celular profundo, com a presença de massas celulares, juntamente com aumento da permeabilidade da membrana e despolarização da membrana mitocondrial.

De forma geral pode-se concluir que o composto estudado por Marveti e col(2011), mostrou que o mecanismo de citotoxicidade pode estar além dos fatores de resistência das linhagens estudadas, mas também pela ação deleterea sobre a enzima topoisomerase II e por aumentar a permeabilidade de membrana, da formação de especies reativas de oxigenio, e inversamente comprometendo o potencial de membrana mitocondrial para mostrar a ação da molecula estudada em linhagens tumorais resistentes.

Os casos de câncer continuam a aumentar devido, sem duvida ao processo de envelhecimento e aumento da mundial em conjunto a um aumento de modos de vida cotidiano que desenvolvem o câncer, como por exemplo, o tabagismo, principalmente em economias emergentes. Com base na GLOBOCAN 2008 por estimativa pode-se concluir que ocorreram cerca de 12.700 milhões de casos sendo que destes 7,6 milhões de mortes por câncer, sendo que 56% dos casos e respectivamente 64% das mortes, ocorreram em países emergentes. Entre os casos o câncer de mama é o mais freqüentemente diagnosticado e pode ser considerado como a principal causa de morte entre as mulheres, representando 23% dos casos de câncer e 14% das mortes por câncer. O câncer de pulmão é a principal causa entre os homens, com 17% do total de novos casos e 23% das mortes. (JEMAL , 2011).

O câncer de mama é agora também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em países desenvolvidos, uma mudança a partir da década passada, durante o qual a causa mais comum de morte era por câncer

de útero. Além disso, a taxa de mortalidade por câncer de pulmão entre as mulheres nos países em desenvolvimento é tão alta como os as do câncer de útero, sendo responsável por 11% do total de mortes por câncer do sexo feminino. Embora as taxas de incidência de câncer em geral no mundo em desenvolvimento são metade das observadas em países desenvolvidos em ambos os sexos, as taxas de mortalidade de câncer em geral são semelhantes.(JEMAL, 2011).

A sobrevivência ao câncer tende a ser menor em países pobres e nos países em desenvolvimento, provavelmente pela causa de uma combinação simples: um diagnóstico tardio e acesso limitado a tratamento oportuno e padronizado (JEMAL, 2011)

Apesar dos experimentos realizados e protegidos por patente, ainda faltam aspectos ligados, por exemplo, ao mecanismo de apoptose e da peroxidação lipídica e a expressão de caspases 3, ambos de interesse a possível mecanismo de ação destas moléculas com capacidade antitumoral, principalmente sobre a eficácia deste composto em diversos tipos celulares de tumores

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

Avaliar os mecanismos de citotoxicidade do composto fenólico polifuncional 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6) em células tumorais e normais.

3.2. ESPECÍFICOS

3.2.1 -Avaliação dos mecanismos de citotoxicidade e da atividade antiproliferativa do composto V6 frente a células tumorais humanas e de animais ;

3.2.2 -Avaliação da ação do composto fenólico V6 sobre o potencial de membrana mitocondrial e as fases do ciclo celular das linhagens estudadas;

3.2.3 -Avaliação da capacidade do composto fenólico V6 sobre a expressão de caspase 3 e ciclina D1.

JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

No ano 2006 foram realizadas pesquisas conjuntas por parte de pesquisadores da UNIBAN e UNIFESP a partir de derivados obtidos no Laboratório de Síntese Orgânica da UNIBAN, usando o produto natural vanilina, como ponto de partida. Na UNIFESP, a equipe coordenada pela profa. Miriam Galvonas Jasiulionis determinou em primeiro lugar a atividade antiproliferativa *in vitro* de vários derivados da vanilina, destacando-se entre estes derivados, o composto 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio, V6. Por este motivo foi determinada a atividade antitumoral *in vivo* do citado composto, entre outros derivados testados. Além disso, foram desenvolvidos experimentos *in vivo* que comprovaram a excelente propriedade sinérgica deste princípio ativo quando associado a quimioterápicos comerciais, como Bleomicina e Carboplatina. Estes promissores resultados permitiram a solicitação da patente PI 0803375-7 intitulada: COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS COMPOSTOS de 2008.

Inspirados nestes resultados inconclusos a equipe liderada pelo Dr. Paulo Pardi (Laboratório de Patologia Experimental da UNIBAN) decidiram estudar os mecanismos de ação do composto V6 em diferentes linhagens celulares.

Neste ano 2011 foi realizada uma importante reunião entre pesquisadores co-autores desta patente em presença de funcionários das respectivas CEIT de ambas as Universidades, onde foram avaliados os novos resultados obtidos, entre outros assuntos, o que levou à reativação dos

vínculos acadêmicos e científicos entre ambos os centros. Foi solicitado em seguida um aditivo financeiro para dar continuidade a este pedido de patente neste ano 2011, que foi aprovado nesta ocasião pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Os estudos contidos nesta dissertação de mestrado foram para o possível licenciamento desta patente e aumentando suas chances comerciais de uso e sua possível aplicação na indústria farmacêutica.

METODOLOGIA

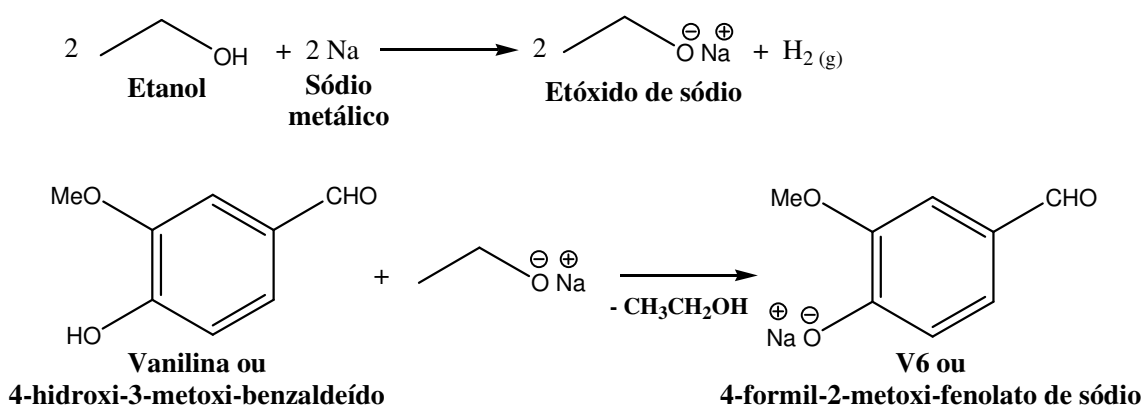
5. METODOLOGIA

5.1- COMPOSTO ESTUDADO:

Para o presente estudo foram utilizado o composto sintético 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6), sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica do Mestrado Profissional em Farmácia da Uniban.

Na síntese do V6 é empregado etanol absoluto (livre de água) e sódio metálico para formar a base etóxido de sódio, liberando neste processo gás hidrogênio. É muito importante ressaltar que o etanol usado neste procedimento deve estar totalmente livre de água para evitar a formação do hidróxido de sódio a partir de restos de água e sódio metálico.

Este composto V6 é obtido a partir de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) e etóxido de sódio anidro em relação molar 1:1 seguido de evaporação do etanol a vácuo até formar um sal metálico no estado sólido (Esquema 1) (QUINCOES, 2006).



Esquema 1: Síntese do V6 anidro

5.2- Laboratórios envolvidos:

O presente projeto foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Experimental, e em colaboração com o Laboratório de Síntese Orgânica do Mestrado Profissional em Farmácia, pelo Prof. Dr. Jose Quincoces e com a colaboração da aluna de Doutorado da USP Fernanda Faião Flores e pelo Prof. Durvanei Augusto Maria do Instituto Butantan, ambos nos processos de análise citotóxica, com produtos e fomentos já oriundos do desenvolvimento da patente 3, da qual estes profissionais fazem parte.

A diluição do composto V6, assim como os testes de solubilidade e preparo de materiais (descartáveis e reagentes) foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia Experimental.

5.3 Avaliação da citotoxicidade do composto fenólico V6

5.3.1. Cultura das Linhagens de Células Tumorais e Normais

As células das linhagens de fibroblastos normais humano (FN1) obtidos pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria nº921/06 CAPPesq, melanoma humano (SKMEL-28), células endoteliais normais humanas (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells), adenocarcinoma mamário murino (tumor de Ehrlich) oriundas da ATCC (American Type Culture Collection) foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura (RPMI-1640 completo), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2mM de L-glutamina e antibióticos.

Para a realização dos experimentos *in vitro*, após sub-confluência, as células foram desprendidas com solução de Tripsina-Edta, neutralizadas com o mesmo volume de soro fetal bovino inativado, centrifugadas duas vezes por 10 minutos á 1500 rpm, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada para cada ensaio. (FAIÃO-FLORES, 2011)

5.3.2 Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Proliferativa *in vitro* do composto V6 em Linhagens de Células Tumorais e Normais

Após o desprendimento e centrifugação, as células foram ajustadas para a concentração de 1×10^5 células/mL e adicionadas em placas de 96 orifícios (100 μ L em cada orifício). Após 24 horas de adesão e confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto V6 (10 a 0,0015 mg/mL) diluído em solução fisiológica 0,9% (diluições seriadas em microplaca) e em 3 experimentos realizados separadamente.

Todo o sobrenadante da cultura celular foi retirado e armazenado em freezer -20 °C para análise da produção de radicais livres (peroxidação lipídica).

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazolio brometo] após 24 horas de incubação do composto .

Foram adicionados 100 μ L de MTT (5 mg/mL) às células, e estas incubadas por 3 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Após este período, o meio com MTT foi removido e foi acrescentado 100 μ L de metanol absoluto para dissolver os cristais de formazan, formados e precipitados.

A quantificação da absorbância foi avaliada espectrofotometricamente a 540 nm (MOSMANN , 1983).

5.3.3. Determinação *in vitro* de produtos da peroxidação lipídica por quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os sobrenadantes das culturas celulares utilizadas para a metodologia do MTT foram recolhidos antes do teste de citotoxicidade pelo MTT e mantidos sob refrigeração de -20 °C até o momento da análise da peroxidação lipídica.

A quantificação da peroxidação de lipídeos em culturas celulares é baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR's), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estas substâncias produzem uma coloração característica que é medida espectrofotometricamente.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Em microtubo adicionamos 50µL da referida amostra juntamente com 250µL de ácido tricloroacético - TCA 20% (20g de ácido tricloroacético em 100mL de água Milli-Q). Em outro microtubo, 50µL da mesma amostra foi adicionada ,juntamente com 250µL de ácido tiobarbitúrico – TBA 0,86% (0,86g de ácido tiobarbitúrico em 100mL de TCA 20%). Os microtubos após este processo permaneceram em banho-maria (100°C) por 20 minutos, seguido de resfriamento à 0 °C por 20 minutos. Os microtubos então foram centrifugados á 8000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante utilizado para a quantificação das TBARS. Para a leitura foi utilizado espectrofotômetro a 535nm, para o cálculo da medida de lipoperoxidação descontamos o valor do branco respectivo de cada série, subtraindo a absorbância da série de TBA da média da série de TBA e dividindo-se pelo coeficiente de extinção molar do MDA (0,0312). A Fórmula para cada amostra é a seguinte:

Valor obtido na série TBA – Valor obtido na série TCA

0,0312

Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA por mililitro (nM MDA/mL). (OHKAWA, 1979).

5.3.4 Análise do Potencial de Membrana Mitocondrial pelo Fluorocromo Rodamina 123 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial utilizamos o corante Rodamina 123 Sigma-Aldrich (Rodamina 123 ou Rod 123), que inibe a função mitocondrial, assim marcando somente as mitocôndrias ativas ou viáveis. O fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular.

Após o desprendimento e centrifugação das células de todas as linhagens (tumerais e normais), as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios (volume=1mL), com amostras em triplicata. Após 24 horas da adesão e confluência, as células foram tratadas por 4 horas com o respectivo valor da IC_{50} do composto V6 para cada linhagem celular.

No momento da análise, as amostras foram centrifugadas á 1800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, e adicionados 5 μ L de Rodamina 123 (5mg/mL) em cada tubo. As amostras foram colocadas em estufa de CO₂ (5%) à 37°C por 30 minutos. Após este período, nos tubos centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 100 μ L de tampão Fac's Flow (solução tampão, livre de azida sódica utilizada em citômetro de fluxo – Beckman Coulter n° 8448011) (DARZYNKIEWICZ, 1982).

5.3.5 Análise das Fases do Ciclo nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo

As células das linhagens tumorais e normais foram cultivadas nas mesmas condições citadas na metodologia descrita no item 5 da metodologia.

Após o desprendimento e centrifugação das células de todas as linhagens (tumorais e normais), as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios (volume=1mL), com amostras em triplicata. Após 24 horas da adesão e confluência, as células foram tratadas por 4 horas com o respectivo valor da $IC_{50}\%$ do composto V6 para cada linhagem celular.

A aquisição da população celular, em média de 10.000 eventos realizada pelo programa "Cell Quest" (BD) e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência (FL2). Os resultados são expressos em porcentagem média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado, Fase quiescente G0/G1, Fase de síntese - S e Fase G2/M (SCHWARTZ, 2005).

5.3.6 Avaliação da Expressão de Caspase - 3 Fosforilada e ciclina D1 nas Populações Celulares por Citometria de Fluxo

Após o desprendimento e centrifugação das células de todas as linhagens (tumoriais e normais), as mesmas foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL, adicionadas em placas de 24 orifícios (volume=1mL), com amostras em triplicata. Após 24 horas da adesão e confluência, as células foram tratadas por 4 horas com o respectivo valor da $IC_{50}\%$ do composto V6 para cada linhagem celular. (BHATT, 2007 ; FECHER, 2009)

Após 4 horas de tratamento com o composto V6, o sobrenadante das amostras foi recolhido em um microtubo, e em outro microtubo foi adicionado as células tripsinizadas (BHATT, 2007 ; FECHER, 2009).

Todas as amostras após este procedimento foram centrifugadas por 10 minutos à 1800 rpm sob refrigeração de 4°C, o sobrenadante descartado, o *pellet* ressuspense em PBS, e a amostra congelada em temperatura de -80°C, mantendo-se esta condição até o momento do preparo das amostras para análise. Alíquotas de 100µL das suspensões celulares foram então incubadas por 1 hora, à 4°C, com 1µg de anticorpo específico anti-caspase 3 conjugado com ficoeritrina-PE (Santa Cruz, USA) na presença ou ausência de seu inibidor específico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-OH (BioAgency Biotecnologia LTDA) ou anti-ciclina D1 (FITC) e 10µL de Triton X-100 0,1% para permeabilizar a membrana celular. Após este período as células centrifugadas por 10 minutos á 1500 RPM foram lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspense em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura e análise

da expressão do marcador foram realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL-2 (BHATT, 2007 ; FECHER, 2009).

5.4- ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os dados deste experimento foram tratados estatisticamente com auxílio do software GRAPH PAD PRISM 5.0 e GRAPH PAD PRISM 3.0

Foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos diferentes grupos (concentrações) no mesmo tempo experimental.

Foi também aplicado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os tempos experimentais.

O nível de significância de hipótese de nulidade foram de 5% ($p \leq 0,05$)

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Proliferativa do Composto V6 em Linhagens Celulares Tumorais e Normais pelo Método Colorimétrico MTT

Após a expansão, as culturas em confluência média de 70% das diferentes linhagens celulares de melanoma humano SKMEL-28, adenocarcinoma mamário murino de Ehrlich, fibroblastos humanos normais FN1 e células endoteliais normais HUVEC, foram utilizadas para a determinação da concentração inibitória ($IC_{50\%}$), a equação da reta e os valores de correlação (R^2). Os valores obtidos foram expressos em mg/mL e os coeficientes de correlação mostraram uma correlação extremamente significativa e positiva. O sobrenadante de todos os tratamentos e grupos controles foi retirado, congelado imediatamente e reservado para a determinação de lipídeos peroxidados pela técnica de LPO.

As $IC_{50\%}$ das linhagens tumorais SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino foram respectivamente, 4,02 e 3,78 mg/mL, enquanto os valores de $IC_{50\%}$ nas linhagens humanas normais FN1 e HUVEC foram respectivamente, 4,82 e 5,08 mg/mL. Os dados estão apresentados nas figuras **2, 3, 4 e 5**.

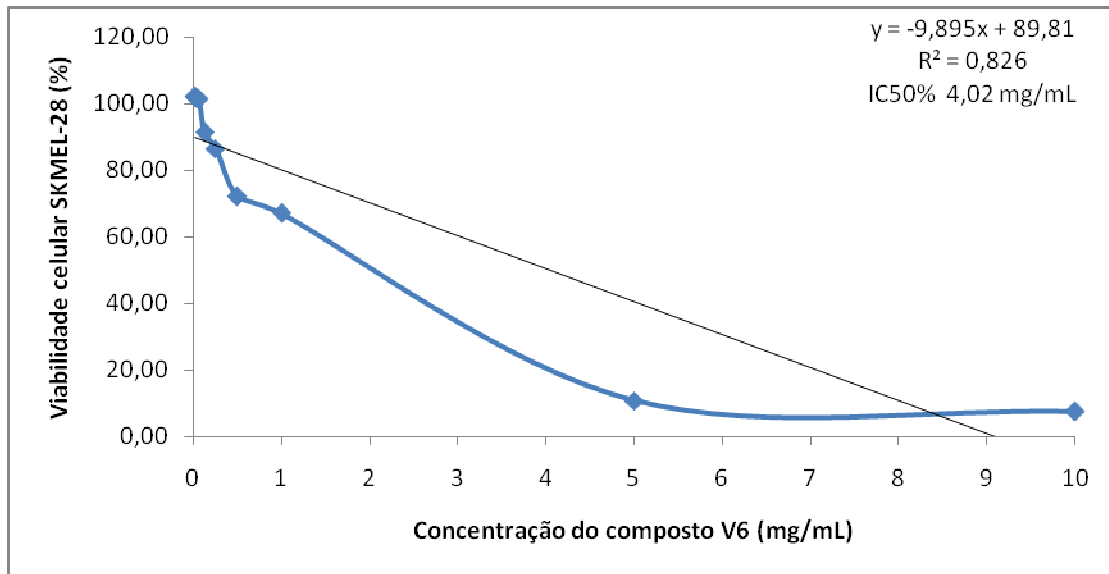


Figura 2 - Atividade citotóxica em células de melanoma humano SKMEL-28, obtido pelo teste colorimétrico MTT, na presença de diferentes concentrações do composto V6. Foram calculadas a equação matemática da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism Instat 3. A IC₅₀% do composto foi de 4,02mg/mL.

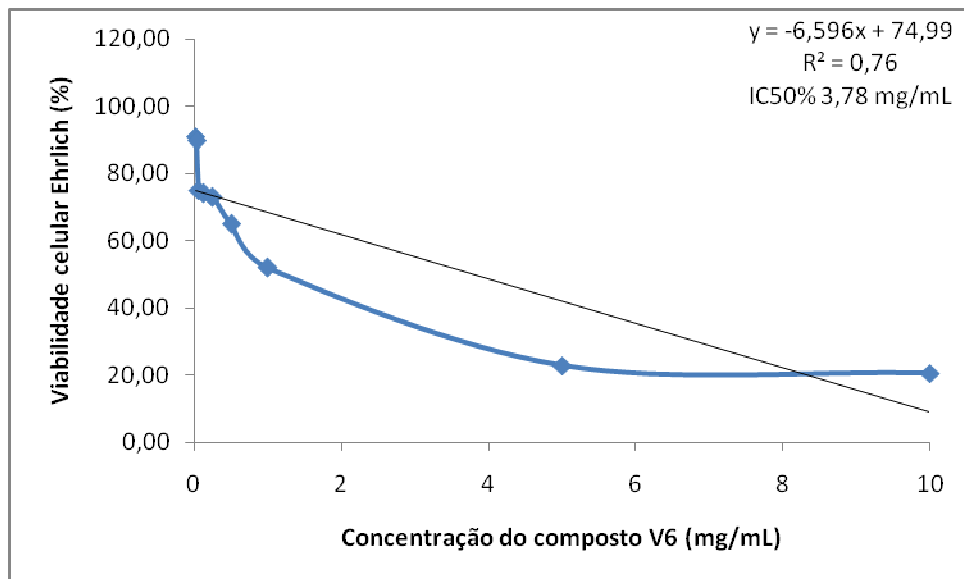


Figura 3 - Atividade citotóxica em células de adenocarcinoma de mama murino, na presença de diferentes concentrações do composto V6. Foram calculadas a equação matemática da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism Instat 3. A $IC_{50}\%$ do composto foi de 3,78 mg/mL.

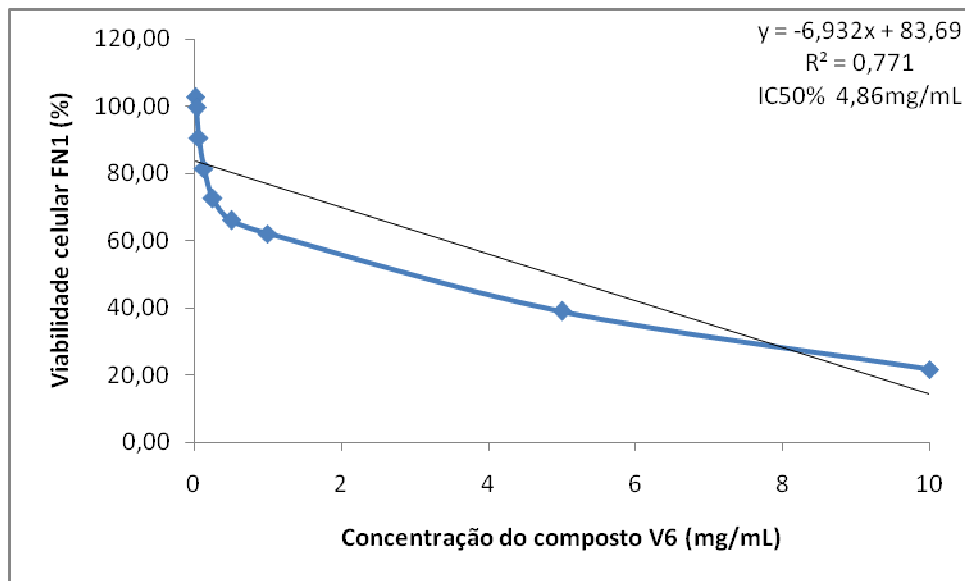


Figura 4 - Atividade citotóxica em células Fibroblastos humanos normais FN1, na presença de diferentes concentrações do composto V6. Foram calculadas a equação matemática da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism . A $IC_{50}\%$ do composto foi de 4,86 mg/mL.

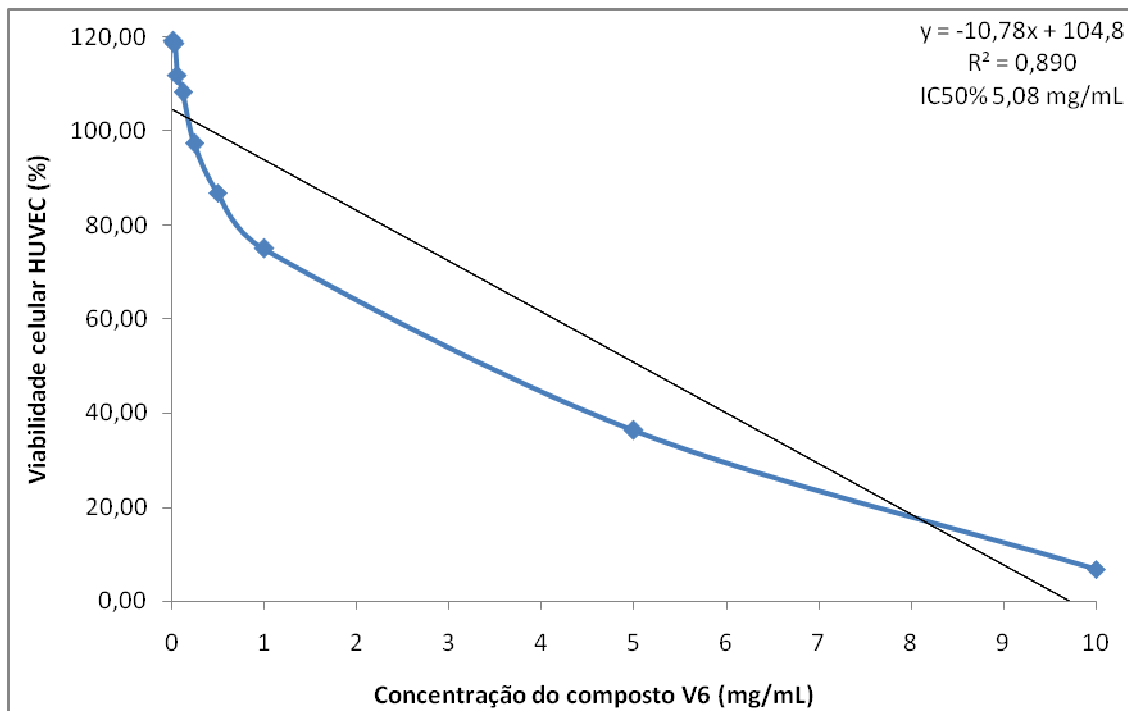


Figura 5 - Atividade citotóxica em células endoteliais humanas normais HUVEC, na presença de diferentes concentrações do composto V6. Foram calculadas a equação matemática da reta e a curva de regressão linear no programa Graph Pad Prism. A IC₅₀% do composto foi de 5,08 mg/mL.

6.2 Avaliação da formação de produtos da peroxidação lipídica por quantificação de TBARs

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), foi avaliada para a quantificação da formação de radicais livres formados a partir da peroxidação dos lipídeos das membranas celulares com a liberação de malondialdeído.

O tratamento com o composto fenólico - V6 resultou no aumento significativo na formação de radicais peroxidados lipídicos das membranas celulares das linhagens tumorais de melanoma SKMEL-28 e adenocarcinoma mamário murino (Ehrlich), superior em média, respectivamente, de 28x e 7x vezes a formação de radicais livres peroxidados do que o grupo controle. O tratamento com o composto fenólico - V6 ocasionou poucos danos oxidativos nas linhagens normais de fibroblastos e células endoteliais humanas, apenas nas maiores concentrações do composto em 24 horas de exposição. Os resultados apresentados em média \pm desvio padrão estão apresentados nas figuras 6, 7, 8 e 9.

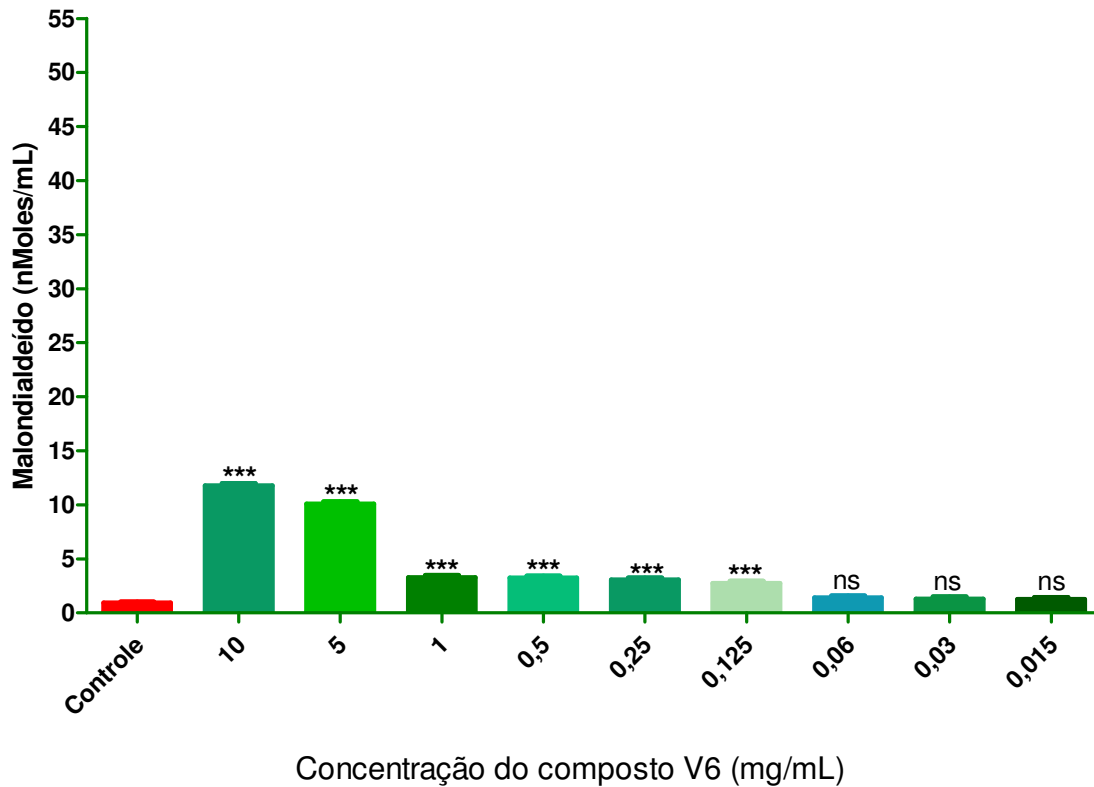


Figura 6 – Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados e quantificados do sobrenadante da cultura celular da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $p < 0.05$.

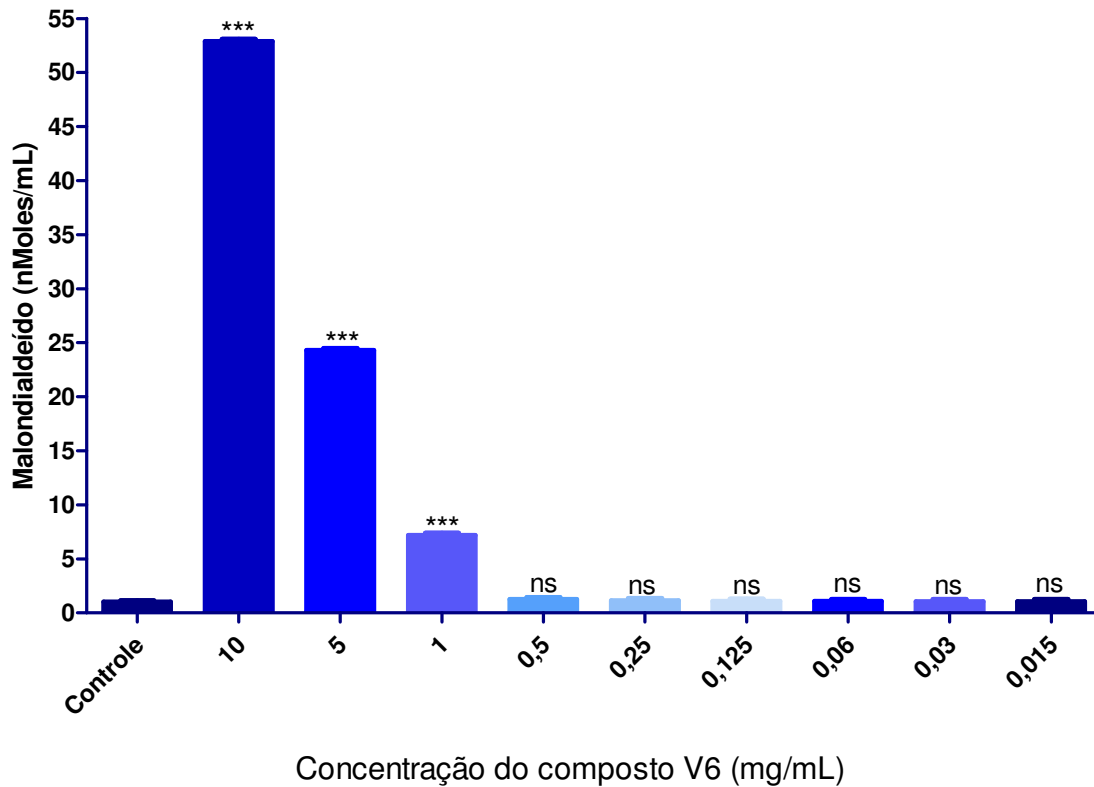


Figura 7 – Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados e quantificados do sobrenadante da cultura celular da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL-28. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

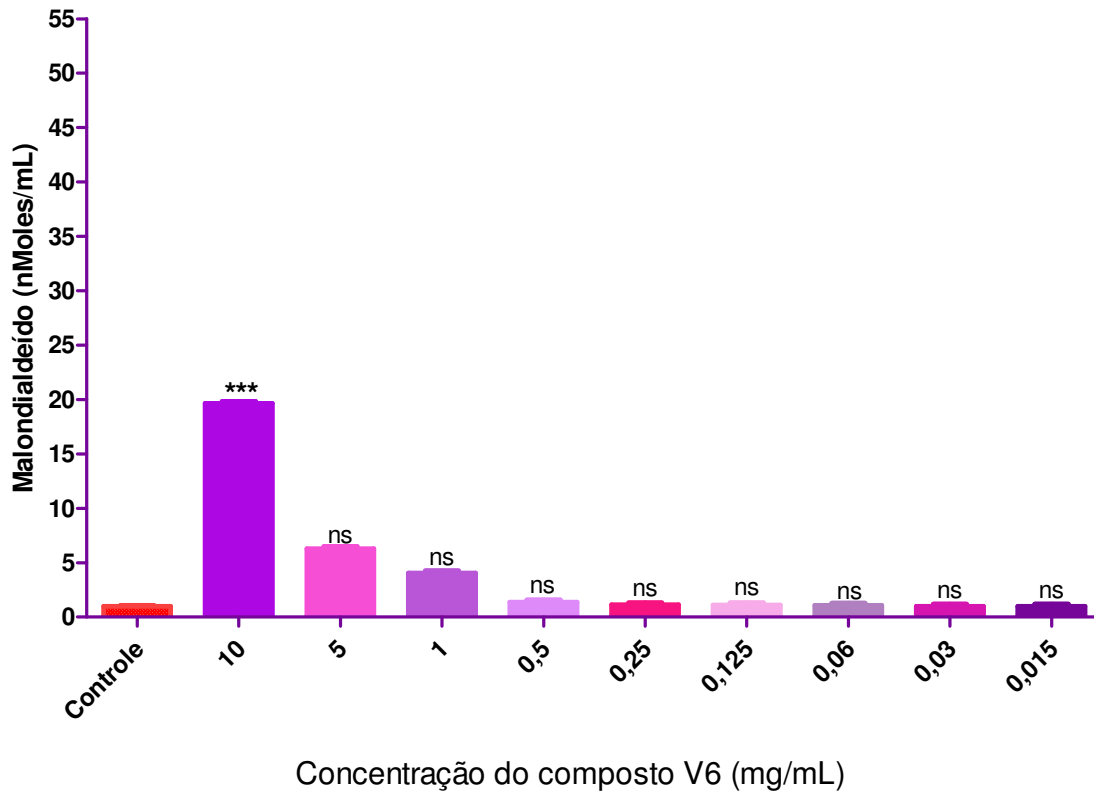


Figura 8– Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados e quantificados do sobrenadante da cultura celular da linhagem de células endoteliais humanas HUVECs. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

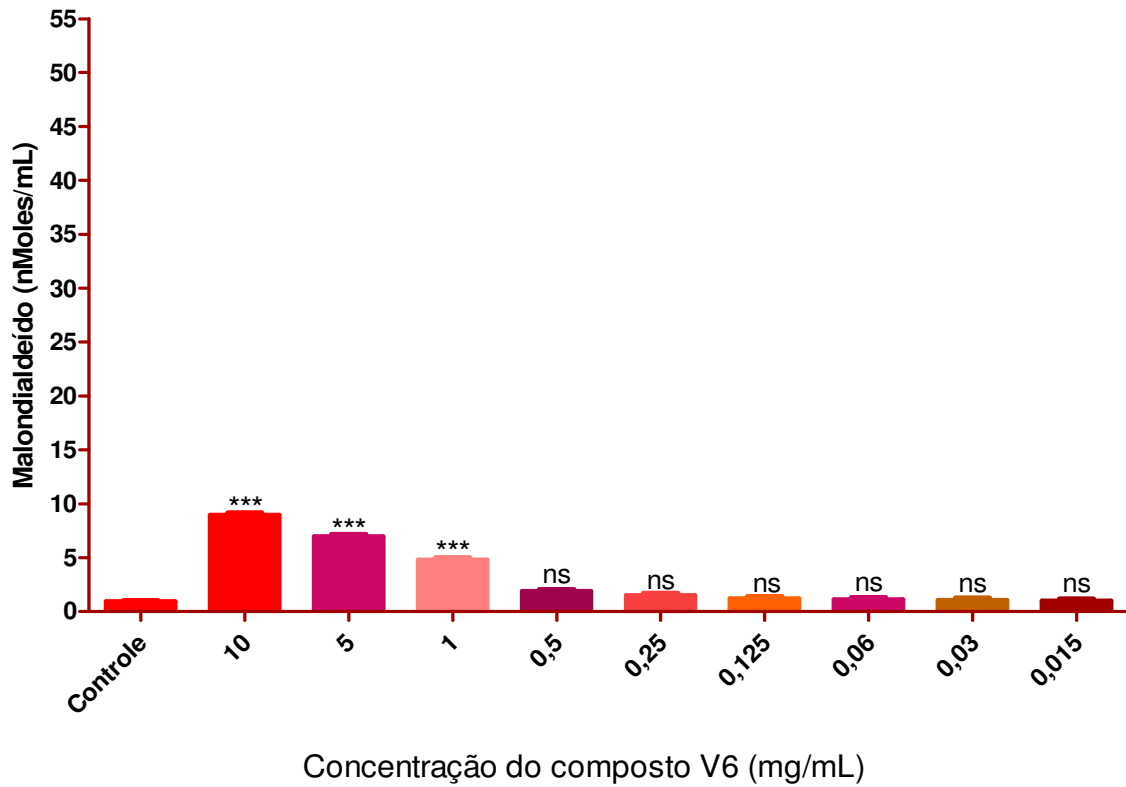


Figura 9 – Gráfico de barras representando a média \pm dp dos radicais livres peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados e quantificados do sobrenadante da cultura celular da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

6.3 Fotomicrografias obtida em microscópio invertido, dos efeitos citotóxicos do composto fenólico - V6.

Após o tratamento das células das linhagens tumorais e normais com as diferentes concentrações do composto fenólico – V6, as imagens dos efeitos tóxicos e citopáticos foram registrados e fotodocumentados em microscópio invertido com a utilização de uma câmara digital Sony Cyber-shot DSC-W200–CCD de 12 Megapixels.

Os tratamentos das células tumorais de melanoma humano SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino mostraram efeitos citotóxicos marcantes em todas as concentrações do composto fenólico V6. Foram observadas alterações na perda da adesão celular ao substrato da placa de cultura, retração dos prolongamentos e expansão do citoesqueleto, formação de células multi-agregados celulares e debris no sobrenadante, como ilustrados nas figuras 10 e 12.

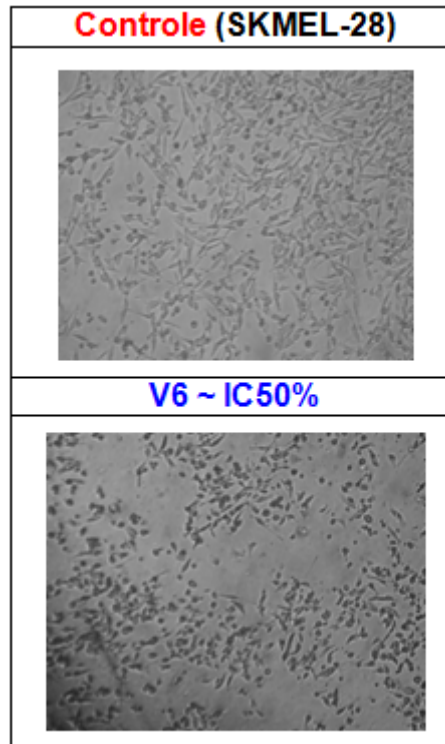


Figura 10 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células de melanoma humano SKMEL – 28, cultivadas com o valor da IC50% do composto V6, após 24 horas de tratamento e grupo controle. Aumento 10X.

No tratamento da linhagem de melanoma com o composto V6 nota-se diminuição significativa na densidade de células nas concentrações de 1.0 à 0.060 mg/mL, moderada perda da adesão celular ao substrato da placa de cultura, retração dos prolongamentos citoplasmáticos e no citoesqueleto.

Nas concentrações de 0.030 e à 0.015 mg/mL, não foram observados efeitos citotóxicos, alterações na adesão celular ou formação de debris, não ocorreu estímulo de proliferação. Sendo assim, o composto V6 em células tumorais mostrou-se inibidor na densidade e na resposta proliferativa das células tumorais.

Em células normais, endoteliais e fibroblastos o tratamento como composto fenólico V6 não se mostrou com a mesma citotoxicidade, que em células tumorais. Não há relação entre dose e efeito. Foi evidenciado somente nas

concentrações de 1.0 e 0.5mg/mL, uma discreta perda de células aderidas ao substrato da placa de cultura. Não foram evidenciados efeitos tóxicos, com a retração dos prolongamentos citoplasmáticos, modificações no citoesqueleto e a modificação da forma celular. Efeitos tóxicos, como vacuolização, picnose e fragmentação do núcleo, não foram documentados. Os dados estão ilustrados nas figuras 11 e 13. Nestes tipos celulares nota-se diminuição significativa na densidade de células nas concentrações de 1.0 à 0.5 mg/mL, perda da adesão celular ao substrato da placa de cultura, retração dos prolongamentos citoplasmáticos e no citoesqueleto, com a formação de células arredondadas, nas demais concentrações (0.025 à 0.015 mg/mL), não foram observadas alterações celulares ou formação de debris ou mesmo efeitos de toxicidade.

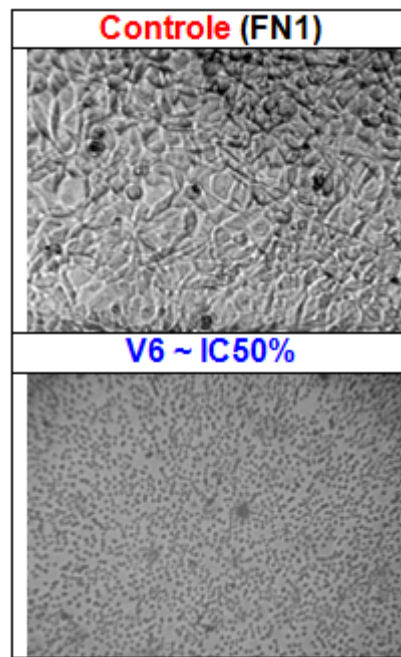


Figura 11 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células fibroblastos da derme humana normal (FN1), cultivadas com o valor da IC50% do composto V6, após 24 horas de tratamento e grupo controle. Aumento 10X.

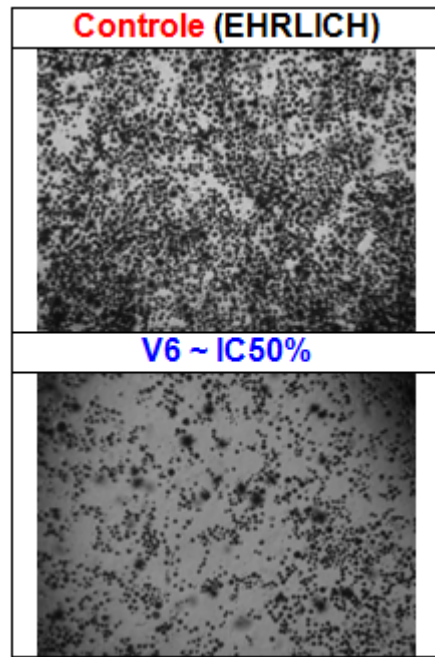


Figura 12 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células de adenocarcinoma de mama murina de Ehrlich, cultivadas com o valor da IC50% do composto V6, após 24 horas de tratamento e grupo controle. Aumento 10X

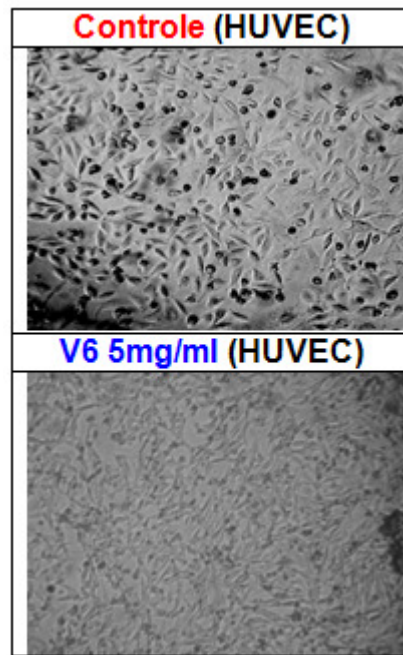


Figura 13 - Fotomicrografia obtida em microscópio invertido das células endoteliais humanas (HUVEC), cultivadas com o valor da IC50% do composto V6, após 24 horas de tratamento e grupo controle. Aumento 10X

6.4 Análise do potencial elétrico mitocondrial de linhagens de células normais e tumorais tratadas com o composto fenólico - V6, por citometria de fluxo.

A fosforilação oxidativa é processo que sofre as graves conseqüências da injúria celular provocada pela exposição por agentes intrínsecos ou extrínsecos. Uma vez que a cadeia respiratória está localizada nas membranas mitocondriais, e sendo as membranas celulares importantes alvos da lesão por radicais livres, é natural supor que a destruição das membranas celulares resultará no impedimento da fosforilação oxidativa.

Todas as linhagens de células normais e tumorais foram submetidas à análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial utilizando-se a sonda fluorescência com a Rodamina 123. A técnica de análise da sonda rodamina 123 por citometria de fluxo permite analisar a viabilidade e a sua atividade metabólica de mitocôndrias, fornecendo parâmetros como viáveis / ativas metabolicamente e inviáveis / inativas metabolicamente, em que as células permanecem preservadas ou sofrem alterações que levam à morte por apoptose ou necrose. Ou seja, as células marcadas com a sonda Rodamina 123 apresentaram a função mitocondrial inibida pela ligação das membranas mitocondriais do composto ou dos radicais livres produzidos, com a inibição do transporte de elétrons, sendo denominadas neste protocolo por M1, quadrante ou "gate" definido pelo programa de aquisição Cell Quest do citômetro de fluxo. As células que não foram marcadas, ou seja, não possuíam transporte ativo de elétrons foram denominadas M2 quadrante ou *gate* definido pelo programa de aquisição Cell Quest do citômetro de fluxo. Estas

determinações foram obtidas com base na intensidade de fluorescência captada no canal FLH-1, em que a população com maior intensidade de fluorescência foi identificada como viável e a com menor intensidade foi identificada como a população inviável.

O *overlay*, ou sobreposição, dos histogramas obtidos no citômetro de fluxo pelo programa de análise WinMDI 2.9 foi utilizado para demonstrar a eficácia do tratamento com o composto fenólico V6 (IC50%) em relação ao grupo controle.

Na linhagem de melanoma humano SKMEL-28 tratada com o composto fenólico - V6 observa-se aumento da toxicidade com a diminuição significativa do potencial elétrico mitocondrial. A linhagem de adenocarcinoma de mama murina apresentou moderado aumento do potencial elétrico, enquanto as linhagens normais de fibroblastos humanos FN1 e endoteliais HUVEC não apresentaram diferenças neste potencial. Os resultados dos histogramas e as médias das diferentes populações de mitocôndrias ativas (M1) e inativas (M2) estão apresentados nas figuras 15, 17, 19 e 21. O *overlay* das curvas de intensidade de fluorescência FLH-1 representativo das comparações das populações tratadas com o composto fenólico – V6 versus à população controle evidencia o significativo efeito citotóxico deste composto. Figuras 14, 16, 18 e 20.

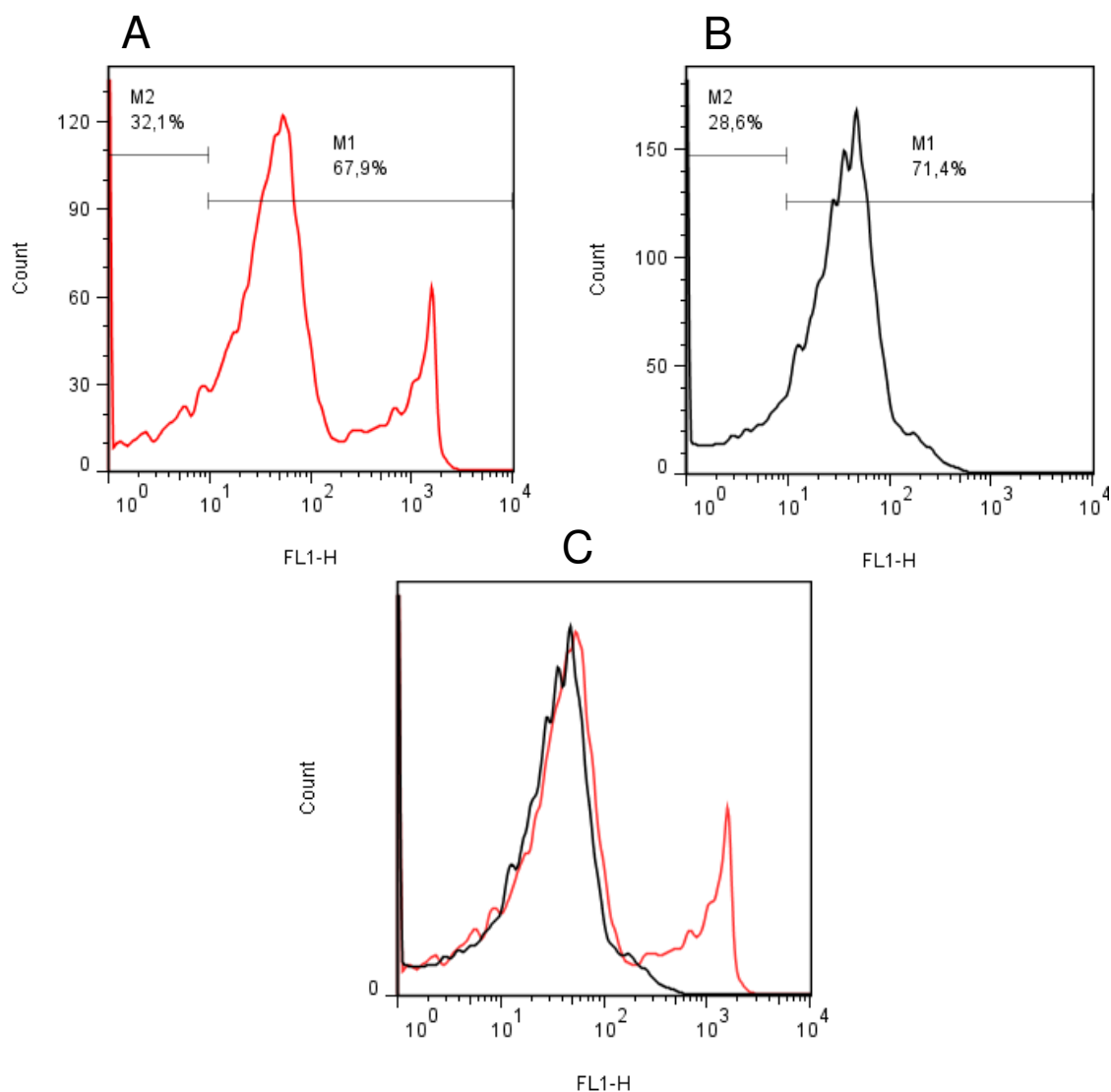


Figura 14 – Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2.9 da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina marcadas com a sonda fluorescência Rodamina 123 (M1 ativas) e sem marcação do fluorocromo (M2 inativas) do grupo Controle (A), grupo tratado com o composto fenólico V6 (B) e o *overlay* sobreposição das curvas dos grupos de tratamentos para efeito comparativo e o grupo controle (C).

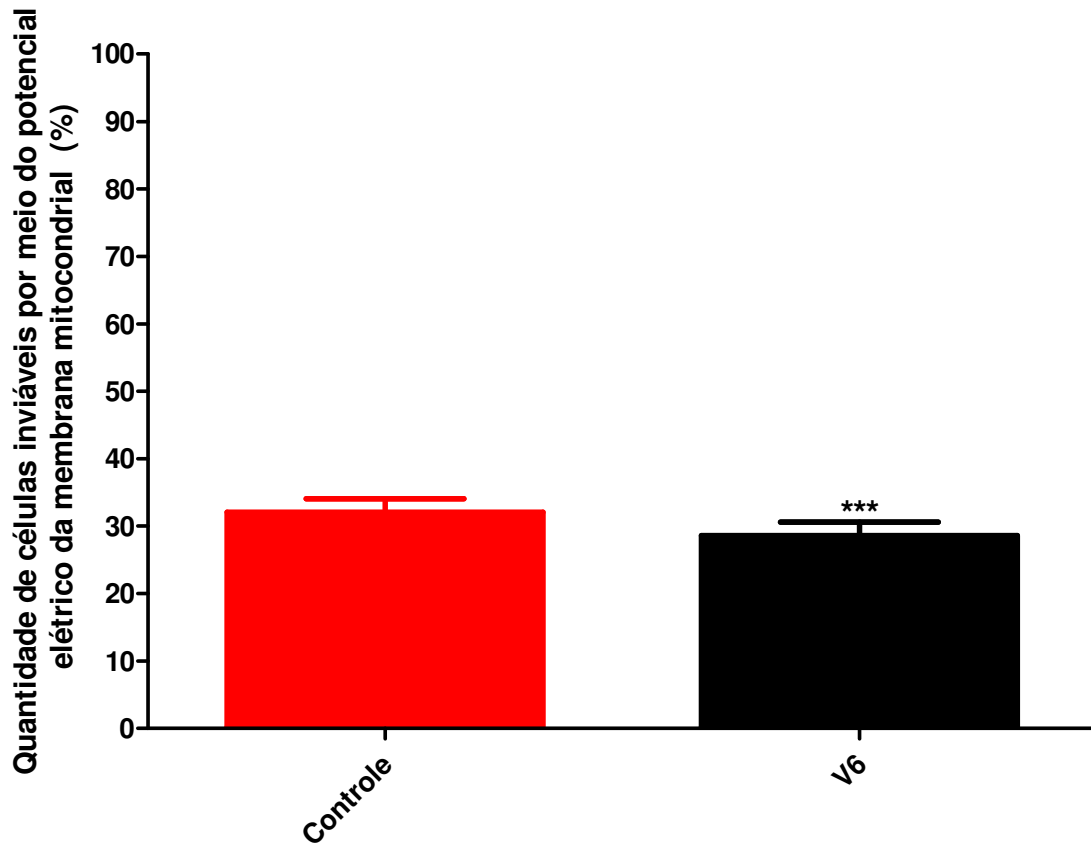


Figura 15 – Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina. Nota-se em azul a quantidade de mitocôndrias inativas/inviáveis e em verde a quantificação de mitocôndrias ativas/viáveis. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de*** $p < 0.05$.

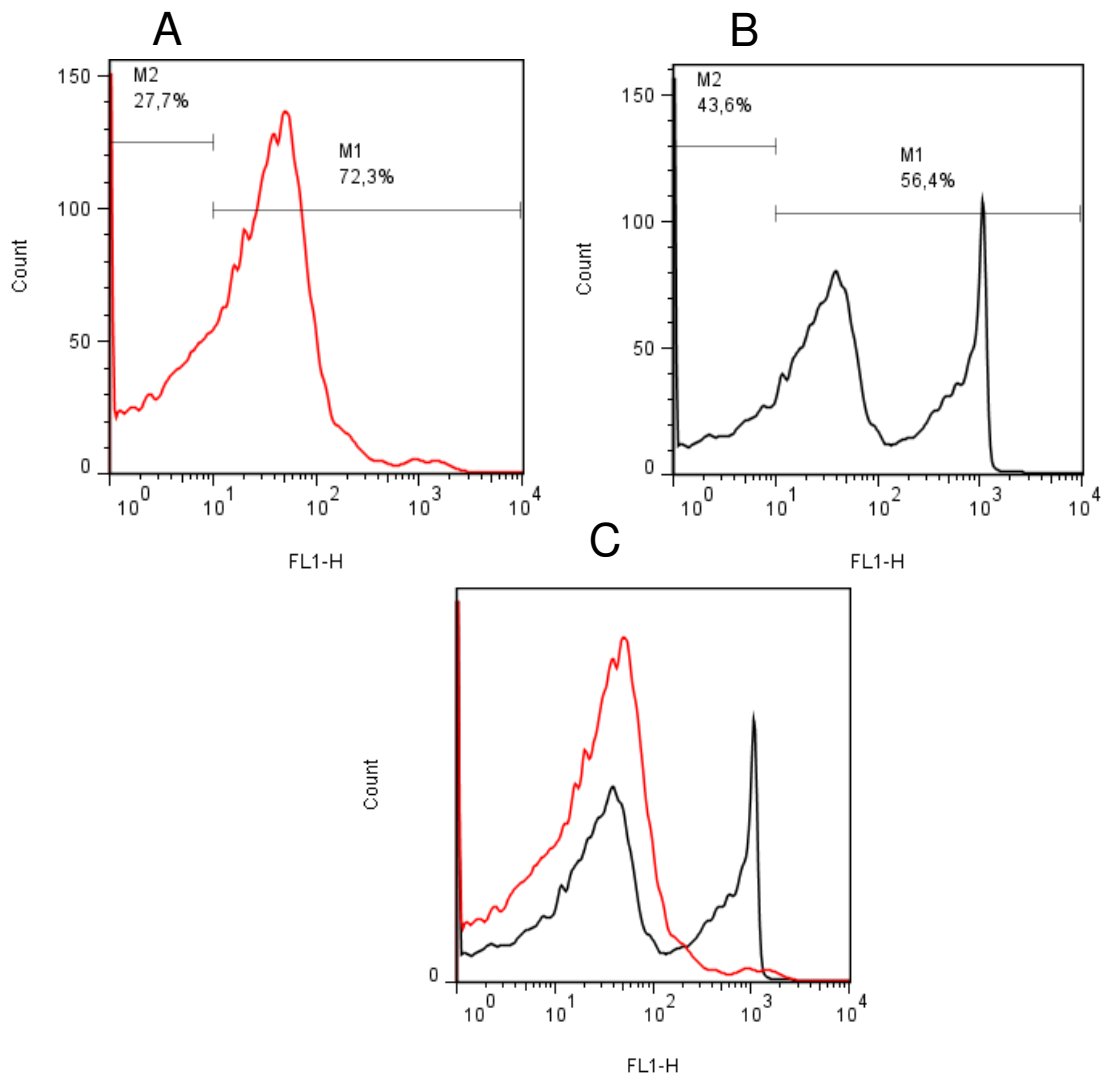


Figura 16 – Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2.9 da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28 marcadas com a sonda fluorescência Rodamina 123 (M1 ativas) e sem marcação do fluorocromo (M2 inativas) do grupo Controle (A), grupo tratado com o composto fenólico V6 (B) e o *overlay* sobreposição das curvas dos grupos de tratamentos para efeito comparativo e o grupo controle (C).

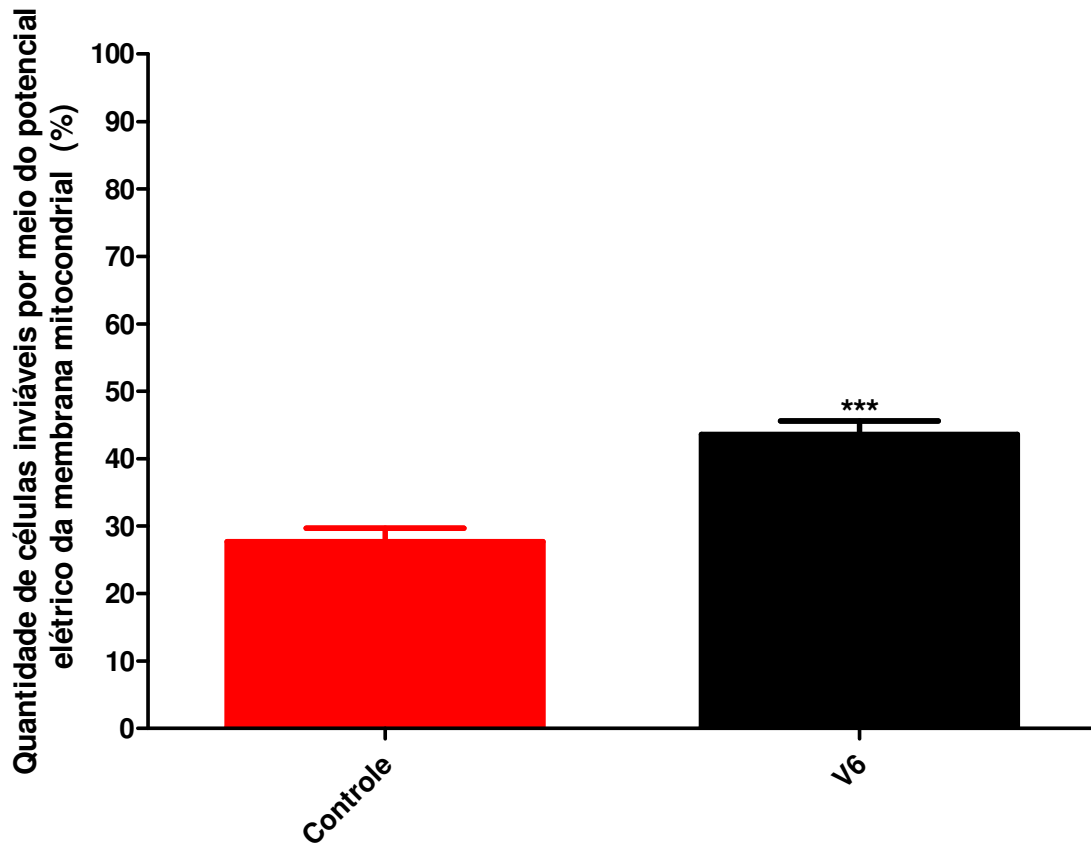


Figura 17 – Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28. Nota-se em azul a quantidade de mitocôndrias inativas/inviáveis e em verde a quantificação de mitocôndrias ativas/viáveis. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

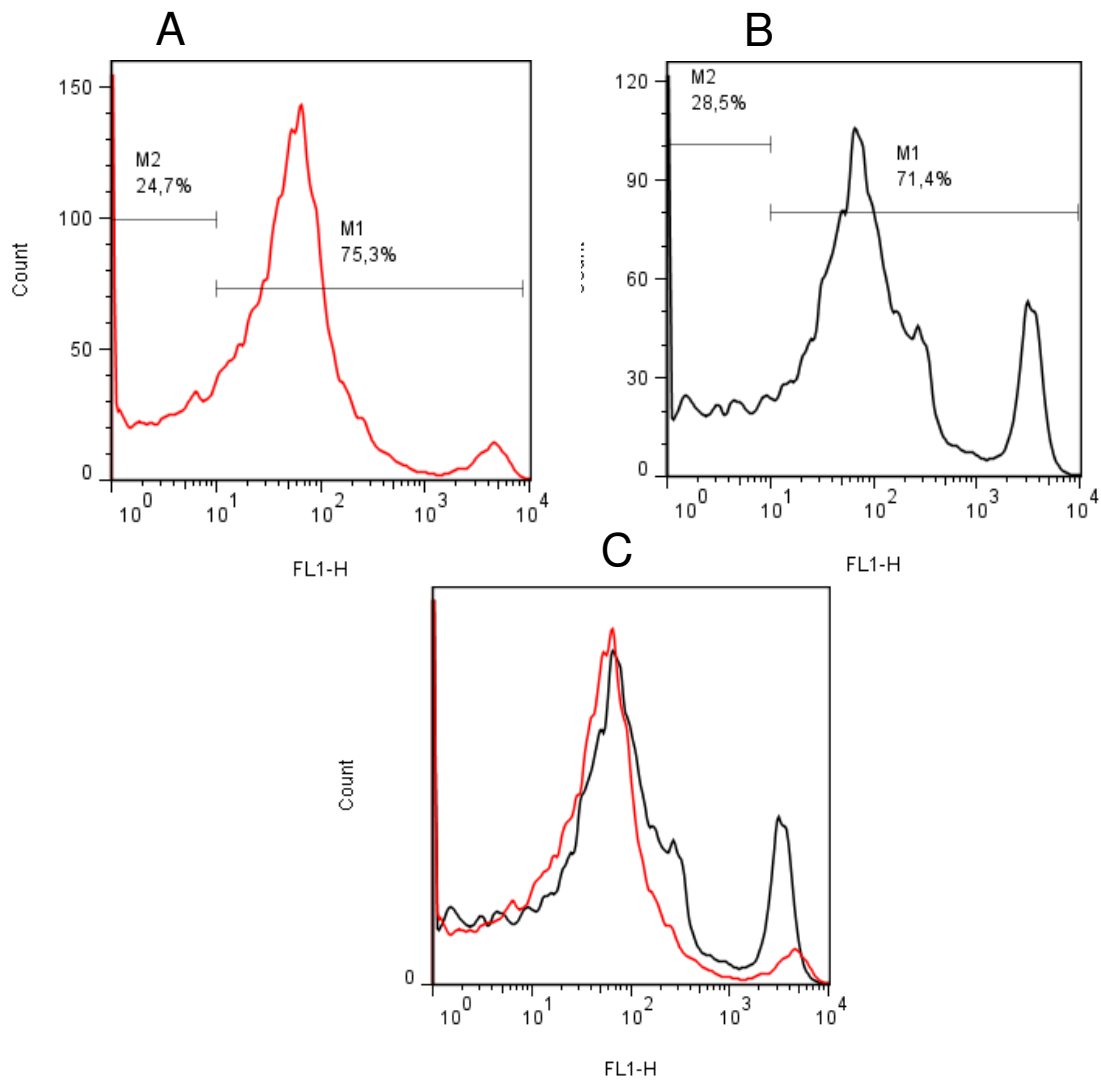


Figura 18 – Histogramas representativos das populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest e analisados pelo programa WinMDI 2.9 da linhagem de células normais endoteliais humanas HUVECs marcadas com a sonda fluorescência Rodamina 123 (M1 ativas) e sem marcação do fluorocromo (M2 inativas) do grupo Controle (A), grupo tratado com o composto fenólico V6 (B) e o *overlay* sobreposição das curvas dos grupos de tratamentos para efeito comparativo e o grupo controle (C).

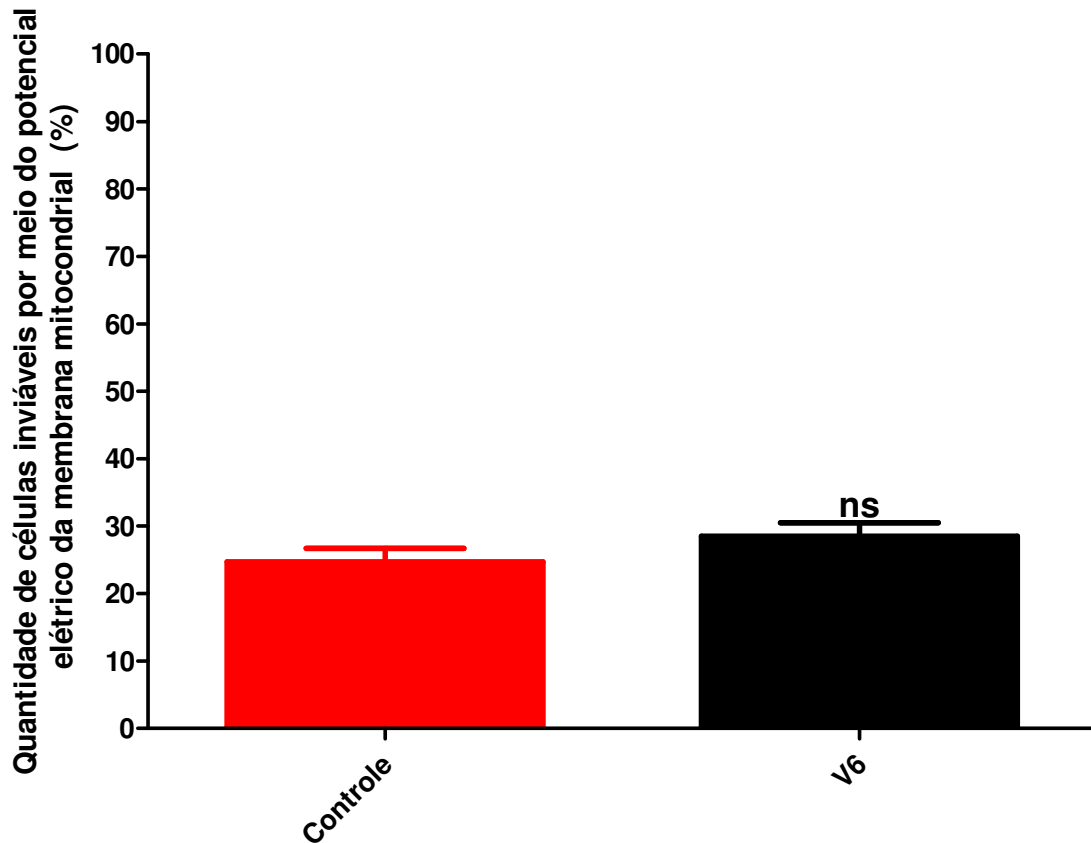


Figura 19 – Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem de células endoteliais normais humanas HUVEC. Nota-se em azul a quantidade de mitocôndrias inativas/inviáveis e em verde a quantificação de mitocôndrias ativas/viáveis. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $p < 0.05$, ns diferenças não significativas.

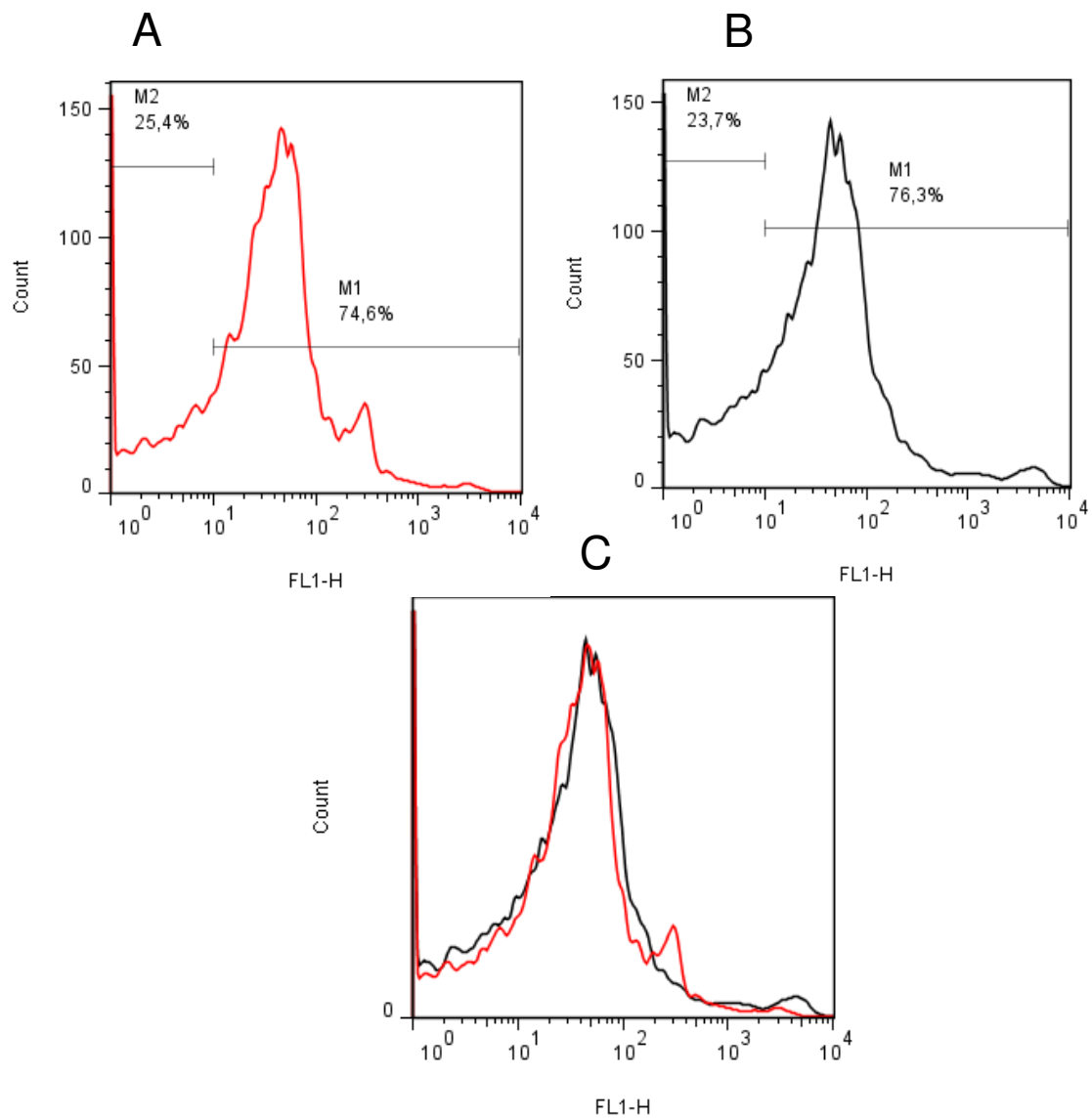


Figura 20 – Histogramas representativos das populações celulares da linhagem FN1 marcadas com a sonda fluorescente Rodamina 123 (M1) e sem marcação do fluorocromo (M2) do grupo Controle (A), grupo tratado com o composto V6 (B) e o *overlay* dos dois tratamentos para efeito comparativo (C).

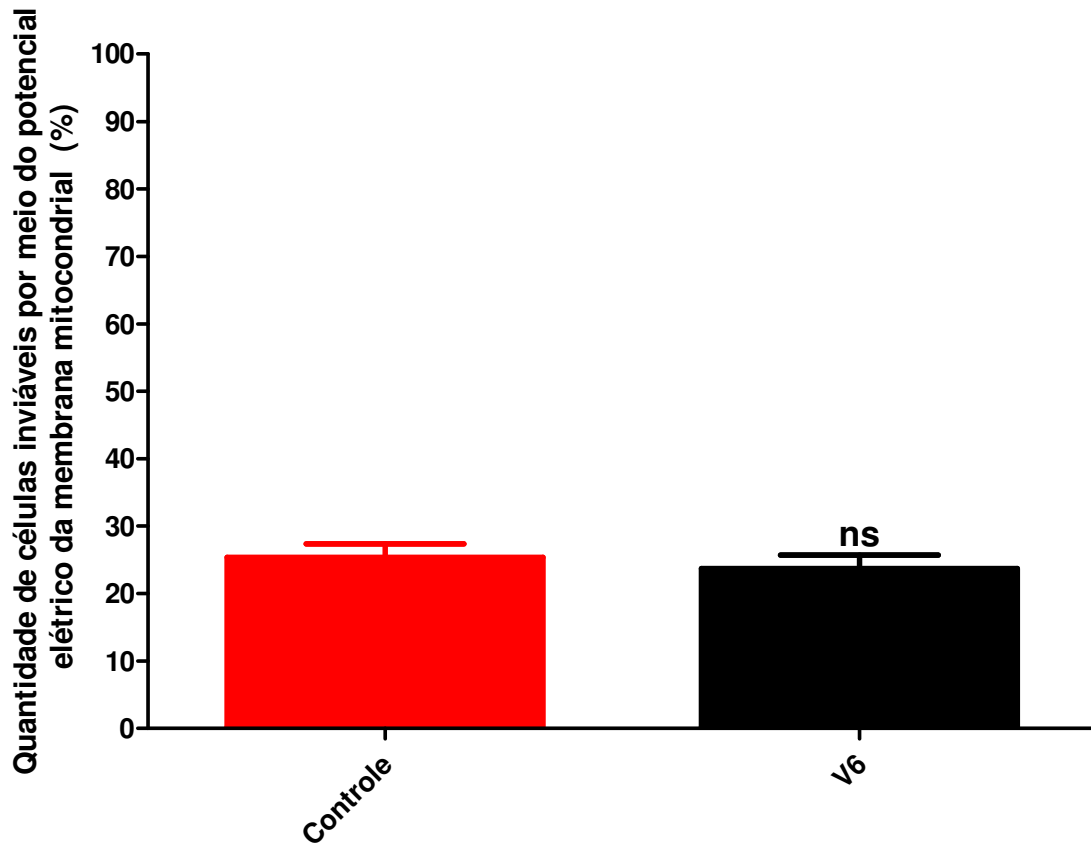


Figura 21 – Gráfico de barras representando a média \pm dp da proporção de células com potencial e elétrico mitocondrial ativo na linhagem de fibroblastos humanos normais FN1. Nota-se em azul a quantidade de mitocôndrias inativas/inviáveis e em verde a quantificação de mitocôndrias ativas/viáveis. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $p < 0.05$, ns diferenças não significativas.

6.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Os resultados foram expressos em porcentagem da média de células nas diferentes fases do ciclo celular: DNA fragmentado, fase quiescente G0/G1, fase S (síntese) e fase G2/M (Mitose), representadas no histograma pelos quadrantes M4, M3, M2 e M1, respectivamente.

O iodeto de propídio (PI) utilizado na determinação do conteúdo de DNA adquirido no citômetro de fluxo, é um fluorocromo que se intercala de forma esquiométrica às duplas fitas de DNA. Após a incidência do laser do aparelho sobre a amostra, a excitação do PI leva a uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA na célula. Células diplóides que não estejam replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de DNA $2n$, emitindo sinais de intensidade menor que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de intensidade menor que aquelas situadas em G2/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para $4n$, que permanecem assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula-mãe da origem a duas células-filhas.

As células situadas no pico hipodiploide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$, e pode representar o aumento na ocorrência de *debris* celulares e DNA fragmentado, característica de eventos de morte celular, por necrose ou apoptose.

Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelos aparelhos em pulsos, permitindo a construção de gráficos de distribuição das células no ciclo celular, conforme mostrado no histograma na figura 2.

Considerando que existe uma relação proporcional entre o aumento no conteúdo de DNA e a área do pulso gerando, os histogramas foram construídos utilizando o parâmetro FL2 área (FL2A).

As linhagens de células tumorais de melanoma humano SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murina e a linhagem de células endoteliais humanas normais HUVEC's apresentaram expressiva diminuição na população de células na fase de quiescente GO/G1 e aumento na fase de divisão celular G2/M. A linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 apresentou-se de maneira distinta entre os tipos celulares utilizados neste projeto, obtendo aumento significativo na população de células na fase de proliferação e diminuição moderada na fase G2/M, representando o efeito não tóxico do composto fenólico – V6, neste tipo celular. Os dados estão apresentados nas figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29.

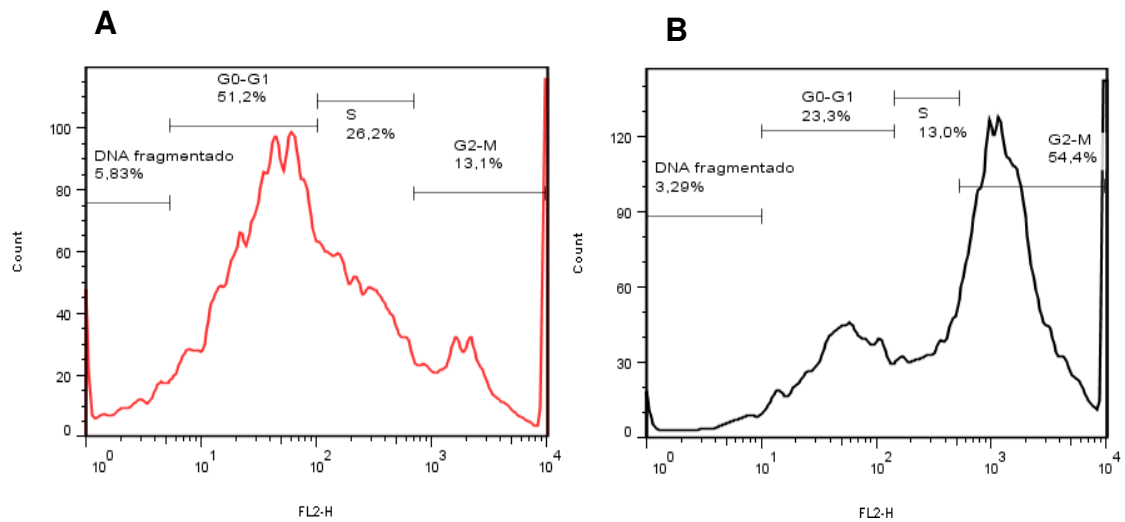


Figura 22 – Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações de células da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino do grupo Controle (A) e do grupo tratado com o composto fenólico - V6 (B) nas fases do ciclo celular: G2/M, S, G0/G1 e DNA fragmentado expresso em porcentagem em relação ao conteúdo de DNA (FL2-H).

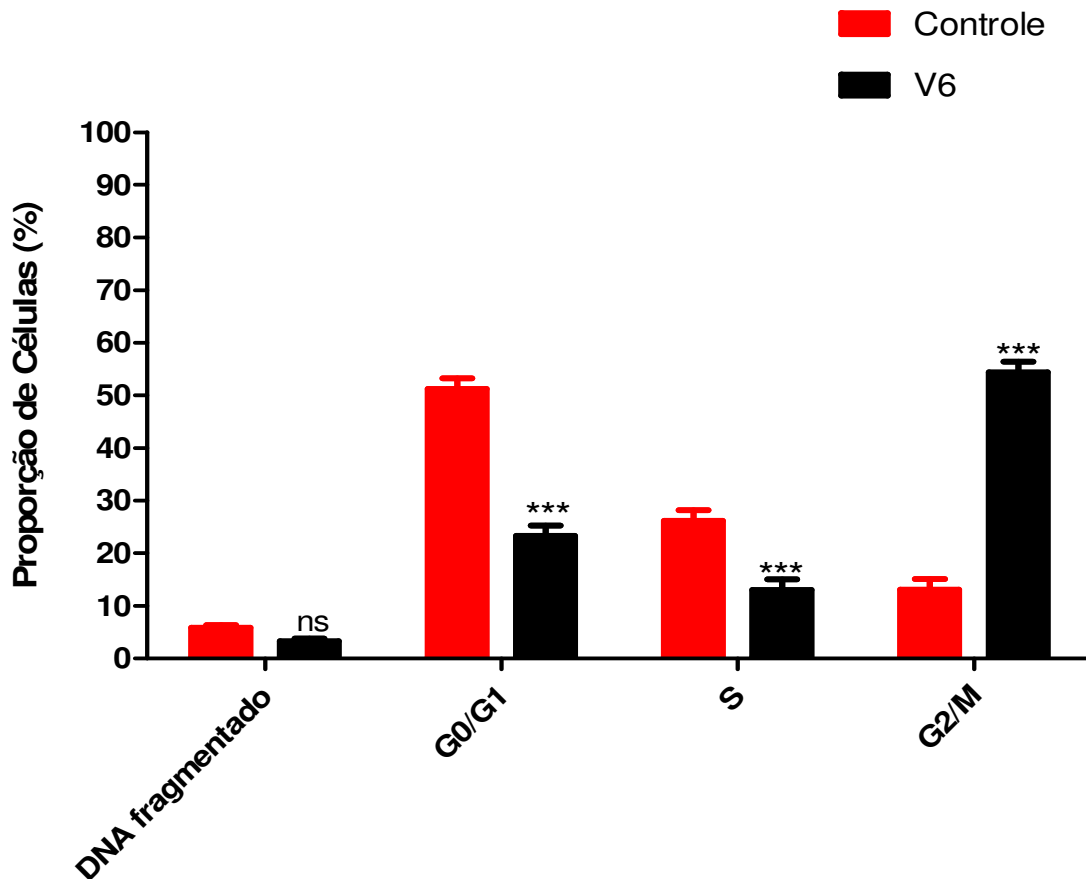


Figura 23 – Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular na linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino do grupo controle em comparação ao grupo tratado com o composto fenólico – V6. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

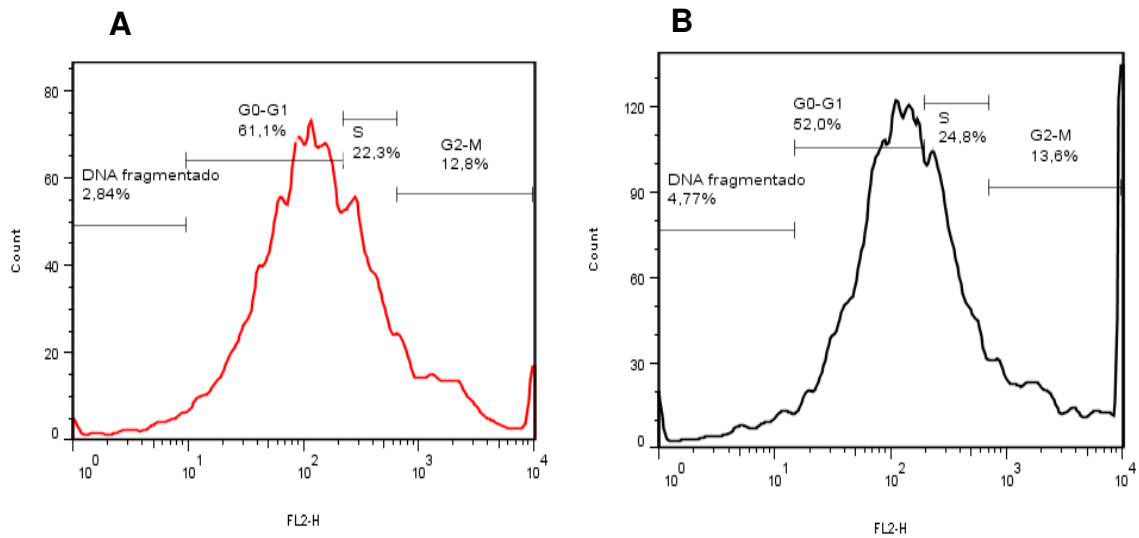


Figura 24 – Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações de células da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28 grupo controle (A) e do grupo tratado com o composto fenólico - V6 (B) nas fases do ciclo celular: G2/M, S, G0/G1 e DNA fragmentado expresso em porcentagem em relação ao conteúdo de DNA (FL2-H).

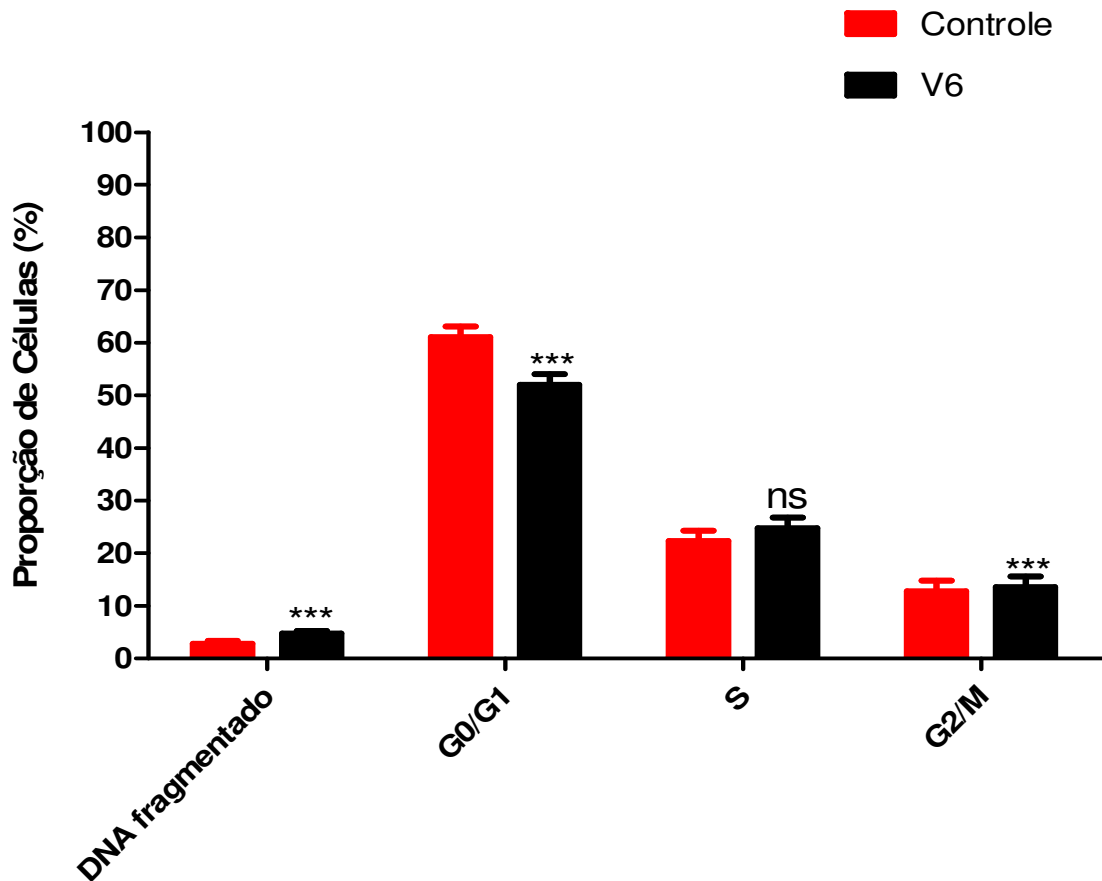


Figura 25 – Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular na linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL – 28 do grupo controle em comparação ao grupo tratado com o composto fenólico – V6. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

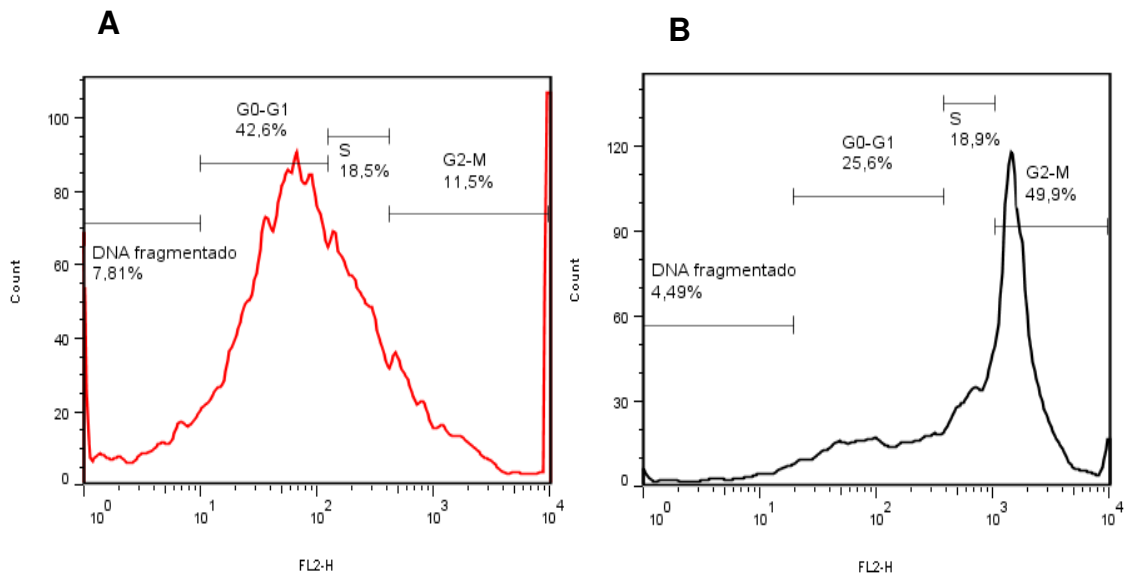


Figura 26 – Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs do grupo controle (A) e do grupo tratado com o composto fenólico - V6 (B) nas fases do ciclo celular: G2/M, S, G0/G1 e DNA fragmentado expresso em porcentagem em relação ao conteúdo de DNA (FL2-H).

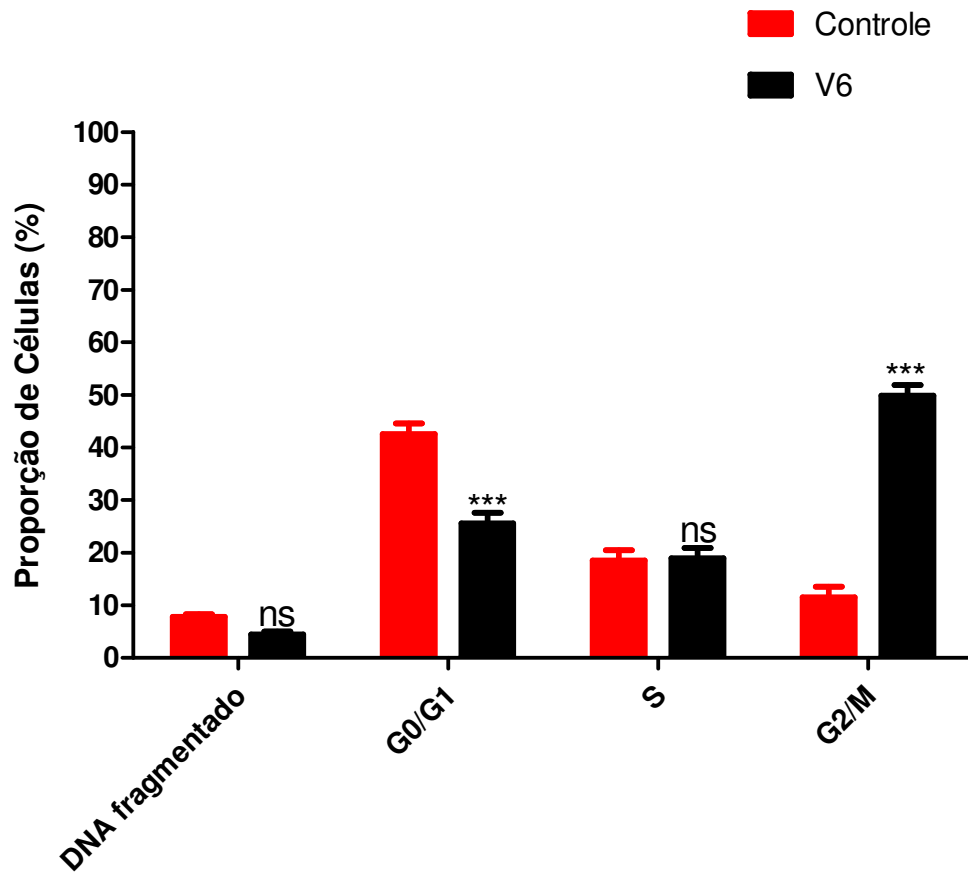


Figura 27 – Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs do grupo controle em comparação ao grupo tratado com o composto fenólico – V6. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

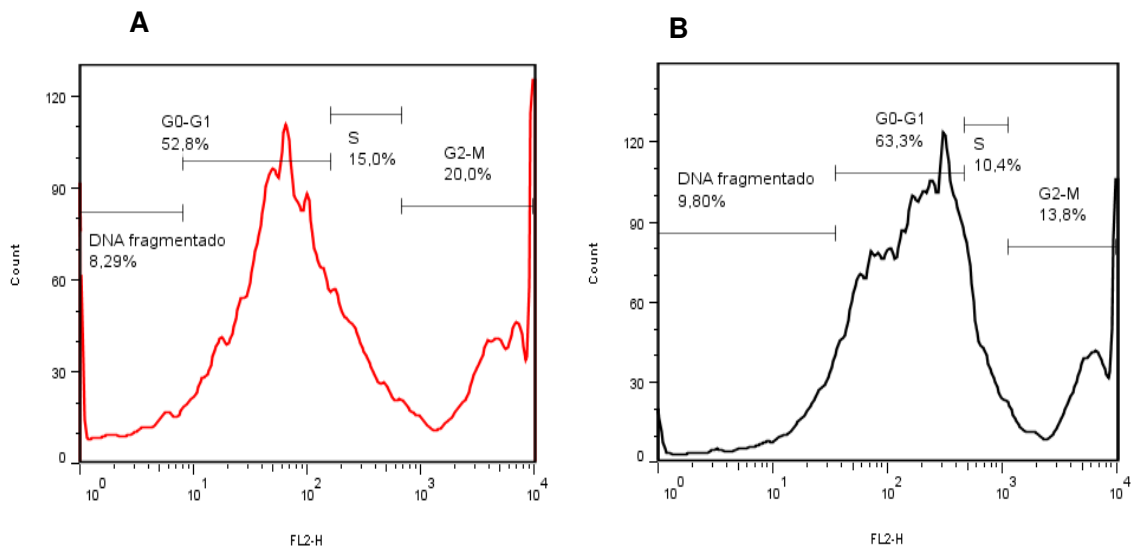


Figura 28 – Histogramas representativos adquiridos pelo programa MOD-Fit em citômetro de fluxo da distribuição das populações da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 do grupo controle (A) e do grupo tratado com o composto fenólico - V6 (B) nas fases do ciclo celular: G2/M, S, G0/G1 e DNA fragmentado expresso em porcentagem em relação ao conteúdo de DNA (FL2-H).

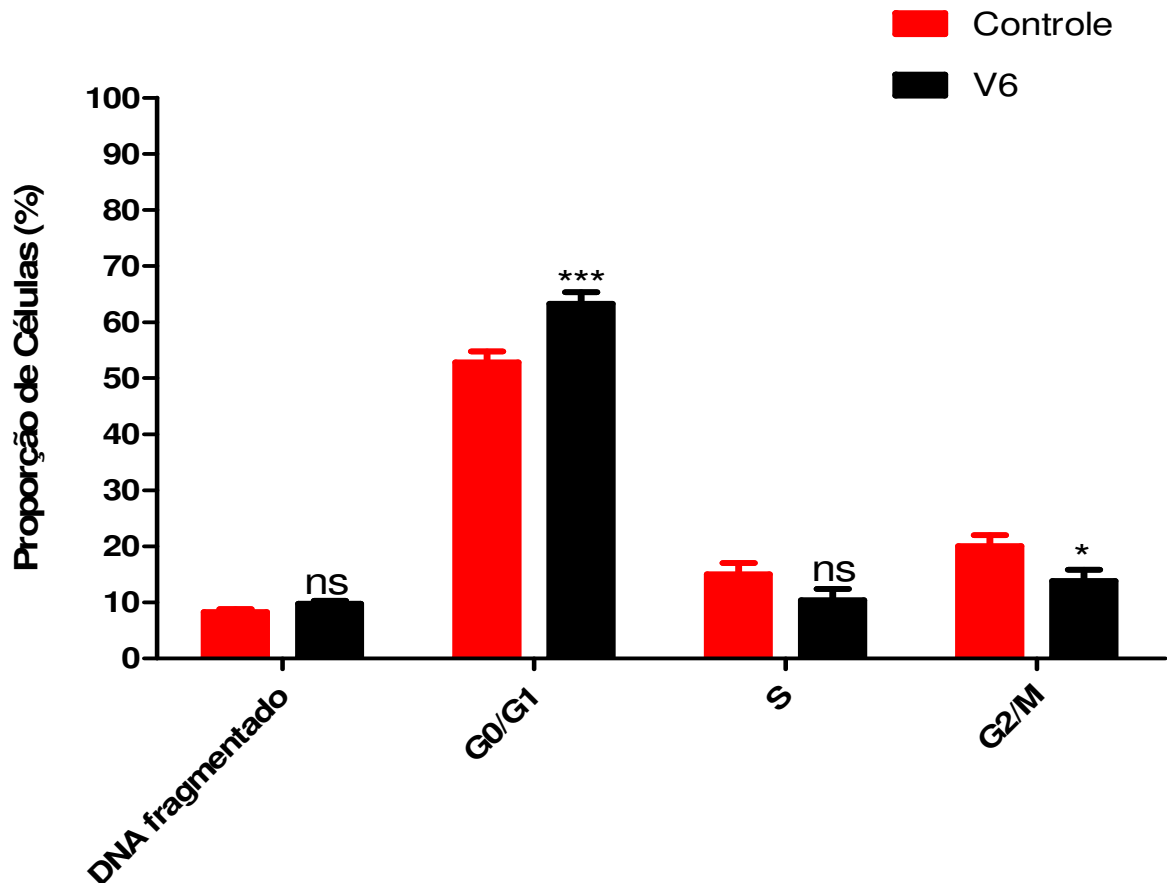


Figura 29 – Gráfico de barras das médias e \pm dp das porcentagens de distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 do grupo controle em comparação ao grupo tratado com o composto fenólico – V6. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

6.6 Expressão da ciclina dependente de quinase reguladora da progressão do ciclo celular Ciclina D-1.

As ciclinas dependentes de quinases (CDKs) são as reguladoras positivas do ciclo celular, por meio da interação das quinases com suas respectivas ciclinas que permitem a progressão do ciclo. CDK4/6 seguido por CDK2 facilita a progressão do ciclo celular da fase G1 à fase S por suas interações com a ciclina D e ciclina E, respectivamente. As ciclinas do tipo D (D1, D2, D3 e D4) e ciclina E intervém regulando o ponto de controle G1/S. Ambas são sintetizadas durante a fase G1 e o balanço entre a síntese e degradação faz com que apareçam na célula no final da fase G1 e desapareçam durante a fase S ou ao final desta fase.

As células de adenocarcinoma de mama murino e os fibroblastos humanos normais FN1 apresentaram diminuição expressiva significativamente na expressão da ciclina D1, enquanto as linhagens de células de melanoma humano SKMEL-28 e células endoteliais normais HUVEC não apresentaram alterações significativas deste marcador de proliferação e progressão do ciclo celular. Os resultados dos *density plots* adquiridos pelo programa Cell Quest e os gráficos de barras estão apresentados nas figuras 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 e 37.

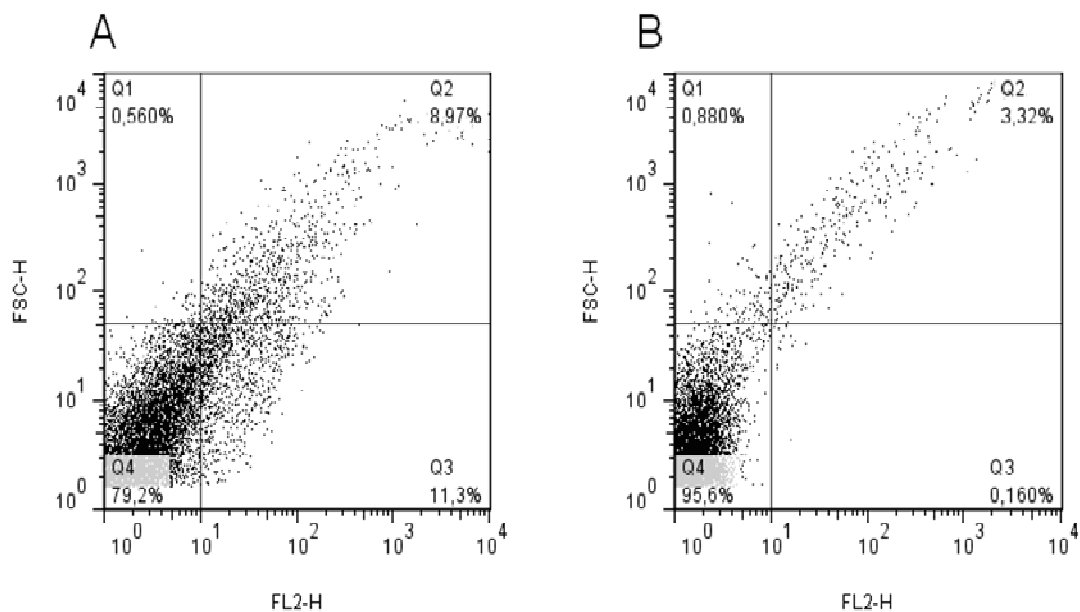


Figura 30 – Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina dos grupos: controle (A), composto fenólico - V6 (B). A expressão do marcador de progressão Ciclina D1 foi realizado pela intensidade de arbitrária de fluorescência no canal FL-1 pelo programa Cell-Quest.

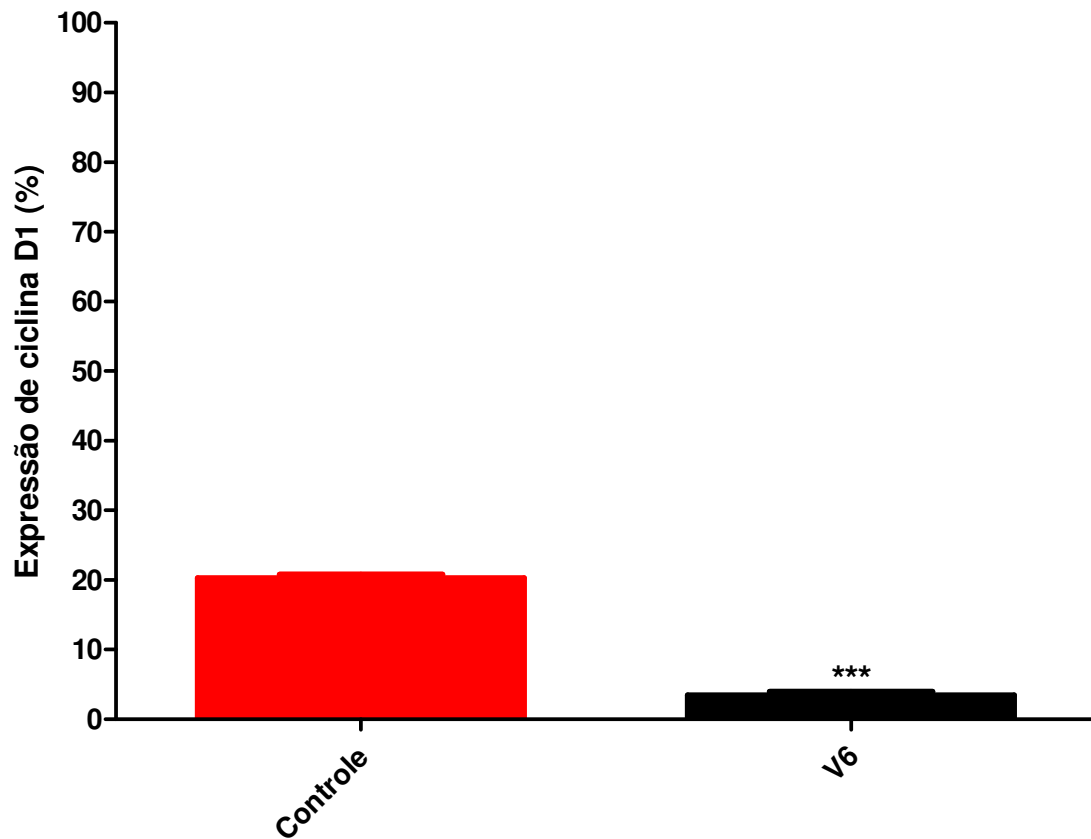


Figura 31 – Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1 em células da linhagem de adenocarcinoma de mama murina. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

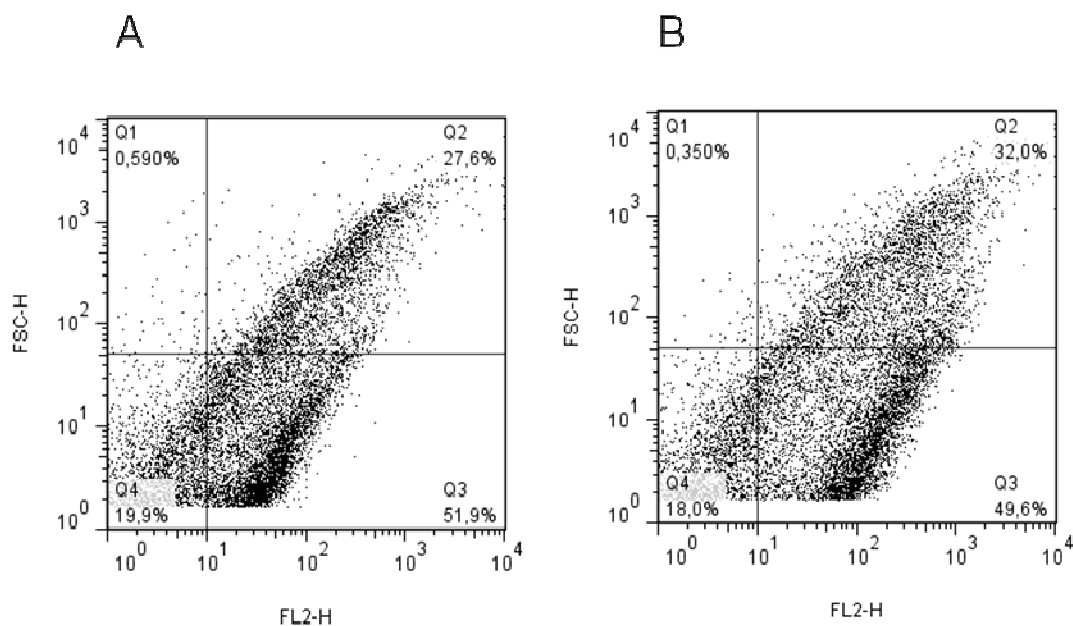


Figura 32 – Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28 dos grupos: controle (A), composto fenólico - V6 (B). A expressão do marcador de progressão Ciclina D1 foi realizado pela intensidade de arbitrária de fluorescência no canal FL-1 pelo programa Cell-Quest.

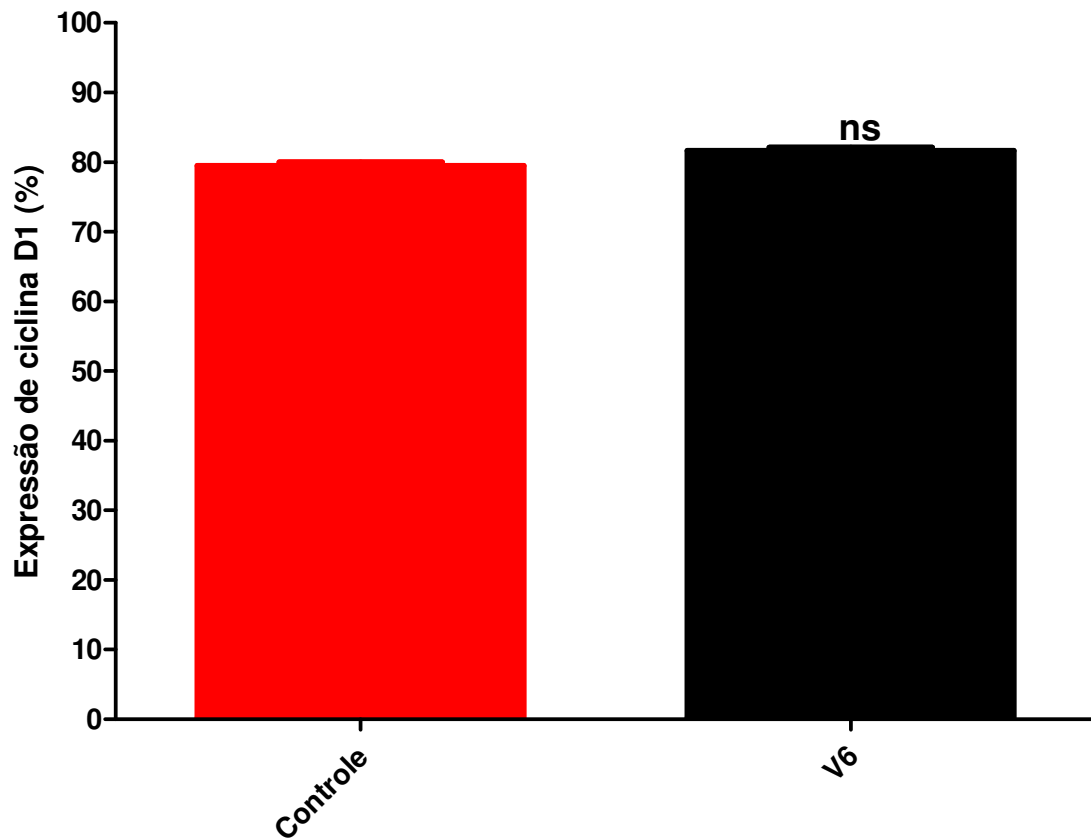


Figura 33 - Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular. Ciclina D1 em células da linhagem de melanoma humano SKMEL - 28. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

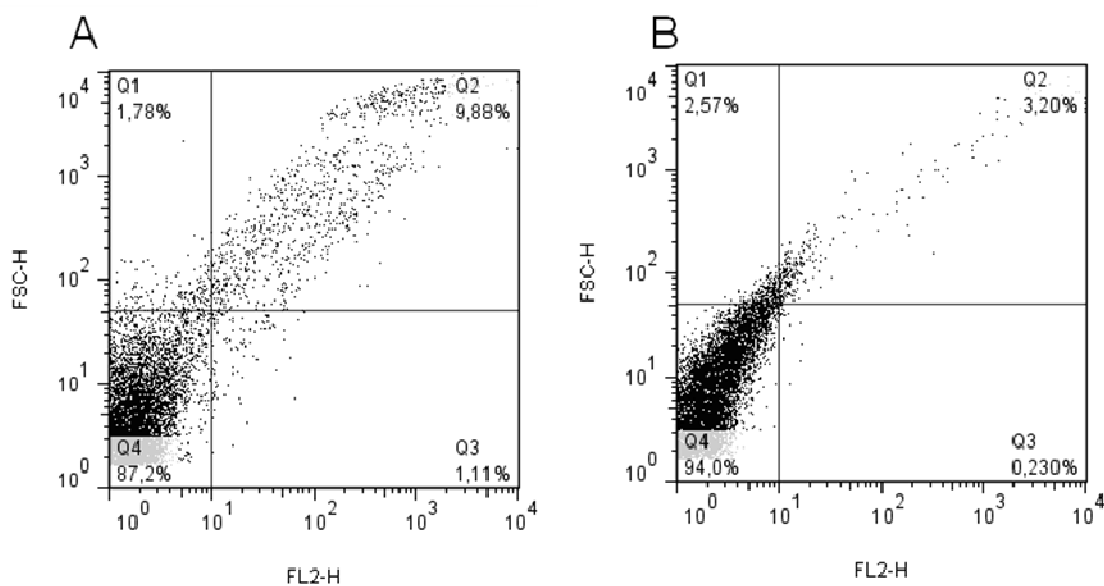


Figura 34 – Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem endotelial humana normal HUVECs dos grupos: controle (A), composto fenólico - V6 (B). A expressão do marcador de progressão Ciclina D1 foi realizado pela intensidade de arbitrária de fluorescência no canal FL-1 pelo programa Cell-Quest.

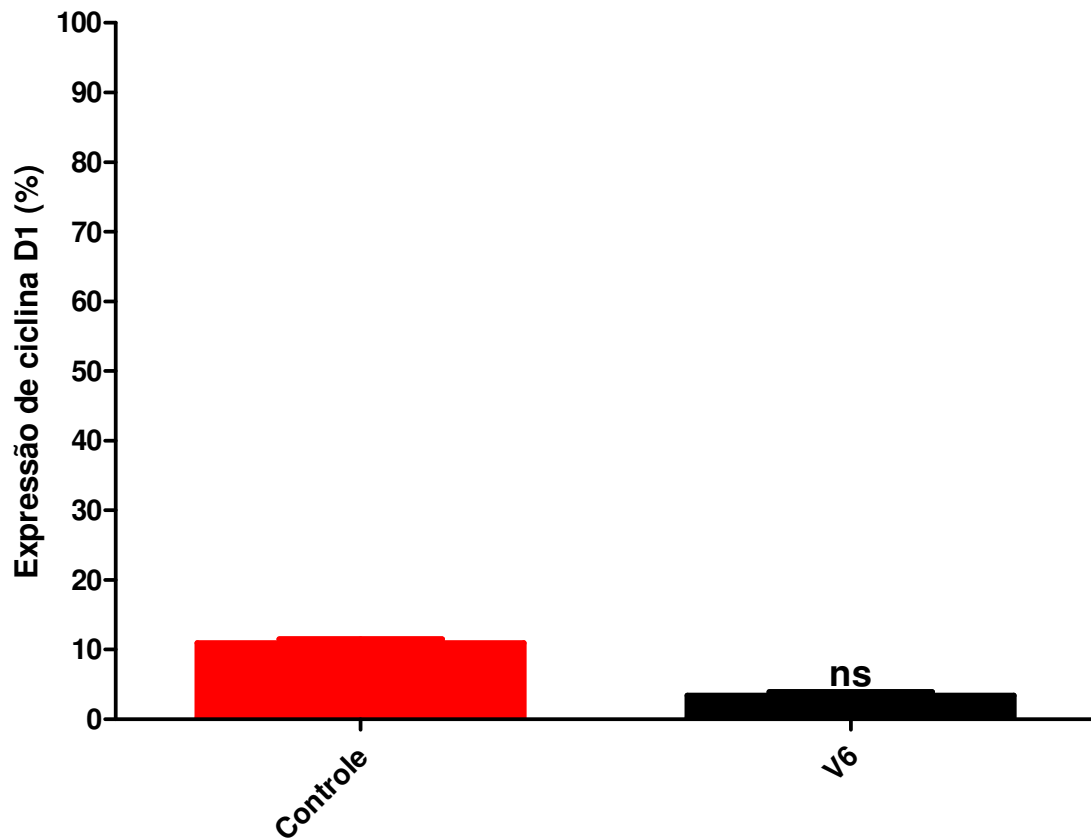


Figura 35 - Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular. Ciclina D1 em células da linhagem de endotelial humana normal HUVEC. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $p < 0.05$; ns diferença não significativa.

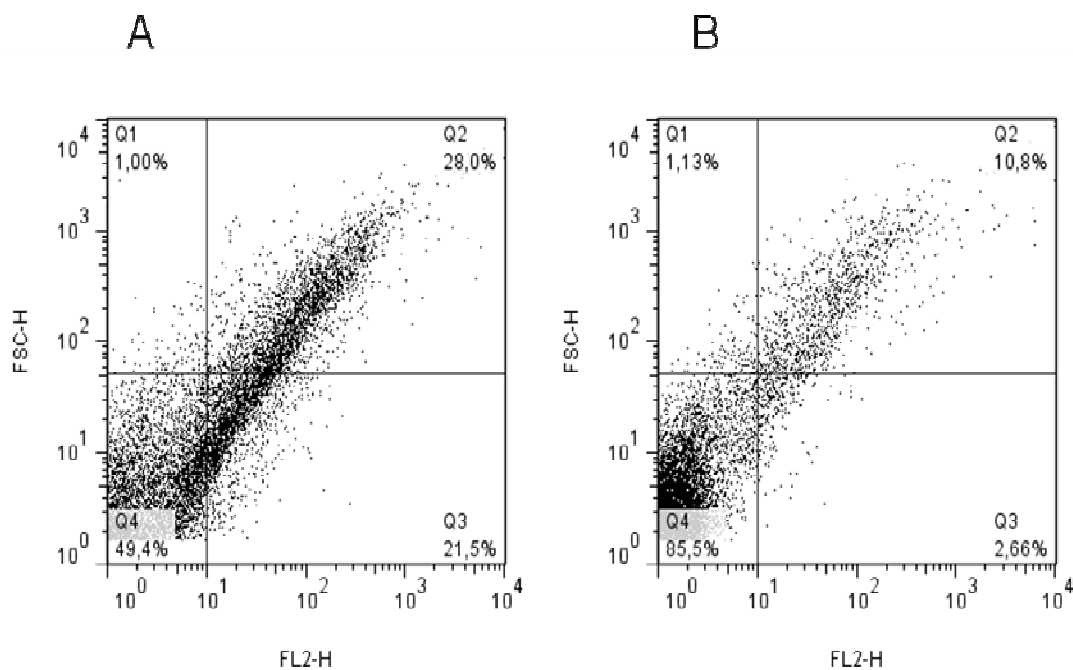


Figura 36 – Histogramas representativos da expressão da Ciclina D-1 em populações celulares adquiridos pelo programa Cell Quest em citômetro de fluxo da linhagem de fibroblastos humanos normais dos grupos: controle (A), composto fenólico - V6 (B). A expressão do marcador de progressão Ciclina D1 foi realizado pela intensidade de arbitrária de fluorescência no canal FL-1 pelo programa Cell-Quest.

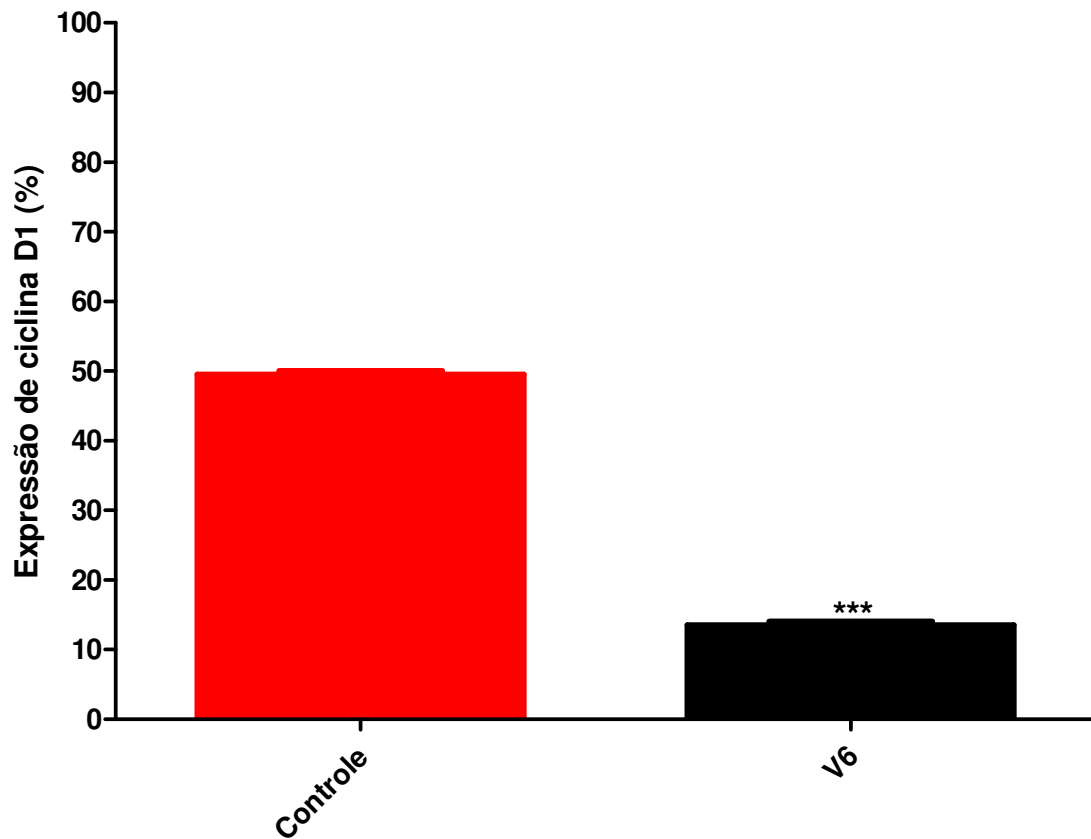


Figura 37- Gráfico de barras representando a média \pm dp da expressão da ciclina dependente de quinase envolvida na progressão do ciclo celular Ciclina D- 1 da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de*** $p < 0.05$.

6.7 Análise da expressão de Caspase 3 fosforilada por citometria de fluxo

A apoptose é definida como a morte celular irreversível associada com a perda do potencial da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, e a ativação das caspases. Caspases são cisteíno-proteases aspartato-específicas que possuem nucleases ativadas e lipases para executar o suicídio celular.

As células de adenocarcinoma mamário murino e endoteliais normais HUVECs apresentaram aumento significativo na expressão de caspase-3 fosforilada, nas análises realizadas em citometria de fluxo. As linhagens celulares de melanoma humano SKMEL-28 e fibroblastos humanos normais FN1 não apresentaram alterações significativas na expressão do marcador de apoptose, dependente de caspase. Figuras 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 e 45.

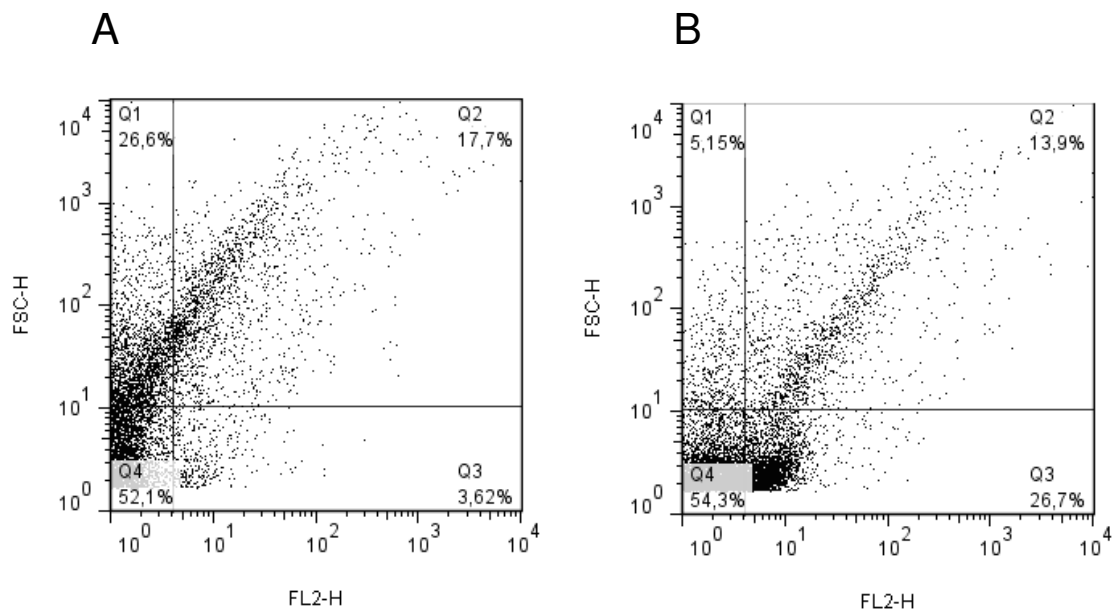


Figura 38 – Histogramas representativos das populações celulares da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina que expressam Caspase 3 fosforilada dos grupos: controle (A), e tratado com o composto fenólico - V6 (B) analisadas por citometria de fluxo. Histograma de expressão de Caspase 3 fosforilada foi realizada considerando-se a intensidade arbitrária de fluorescência no canal de marcação FL2-H pelo programa Cell-Quest.

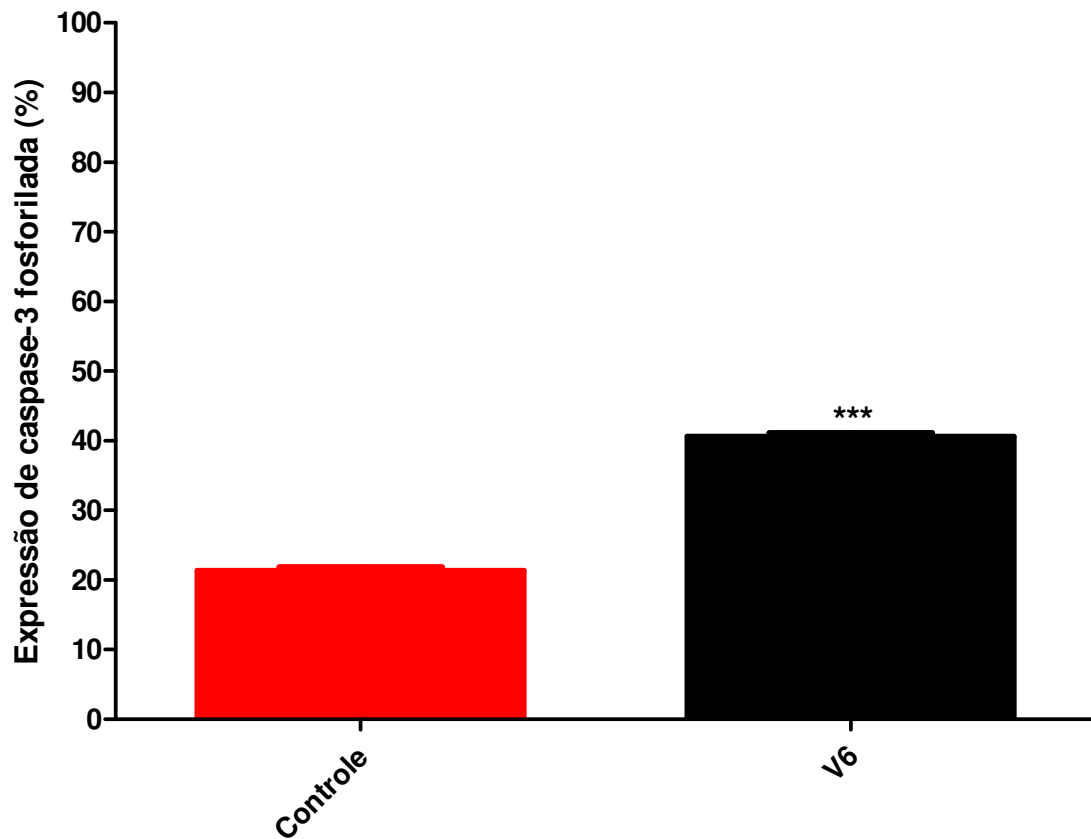


Figura 39 – Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murina. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

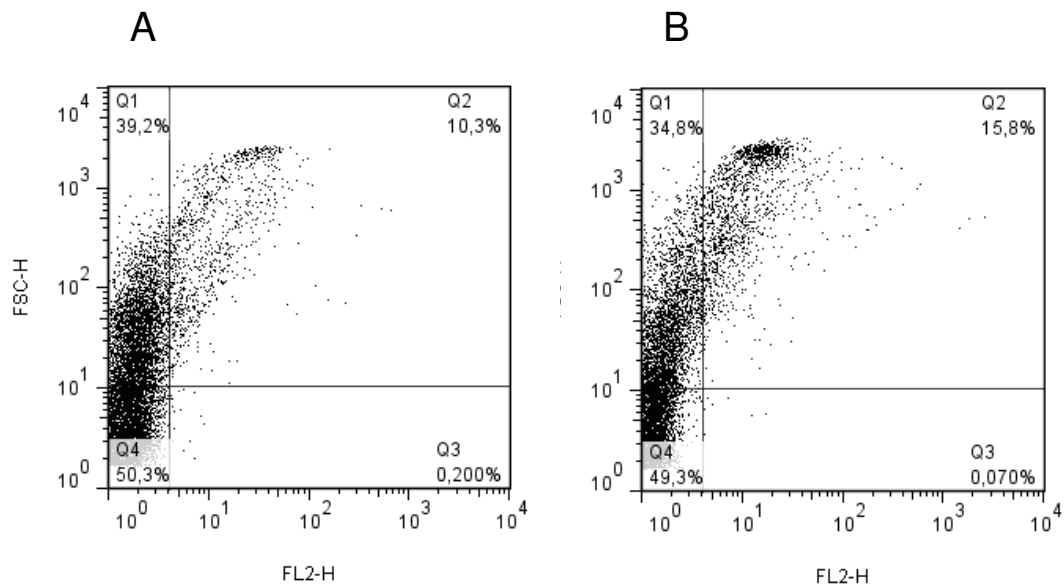


Figura 40 – Histogramas representativos das populações celulares da linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL - 28 que expressam Caspase 3 fosforilada dos grupos: controle (A), e tratado com o composto fenólico - V6 (B) analisadas por citometria de fluxo. Histograma de expressão de Caspase 3 fosforilada foi realizada considerando-se a intensidade arbitrária de fluorescência no canal de marcação FL2-H pelo programa Cell-Quest.

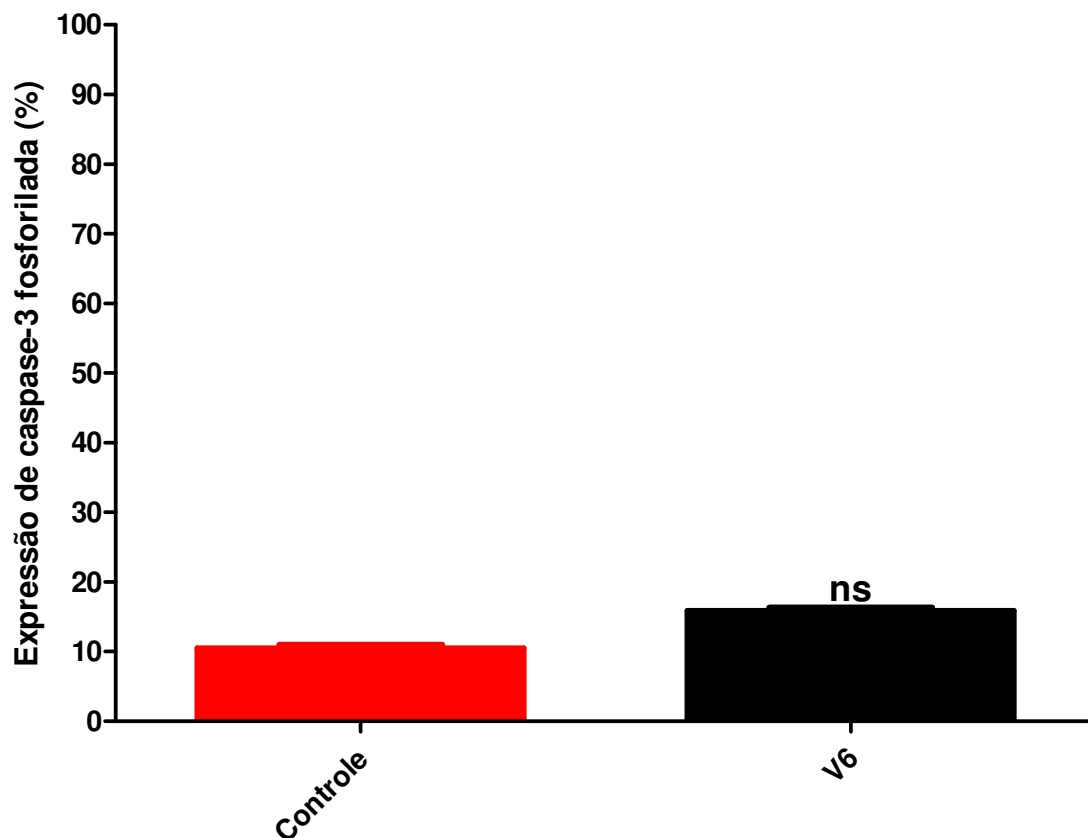


Figura 41 - Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL-28. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $***p < 0.05$, ns diferença não significativa.

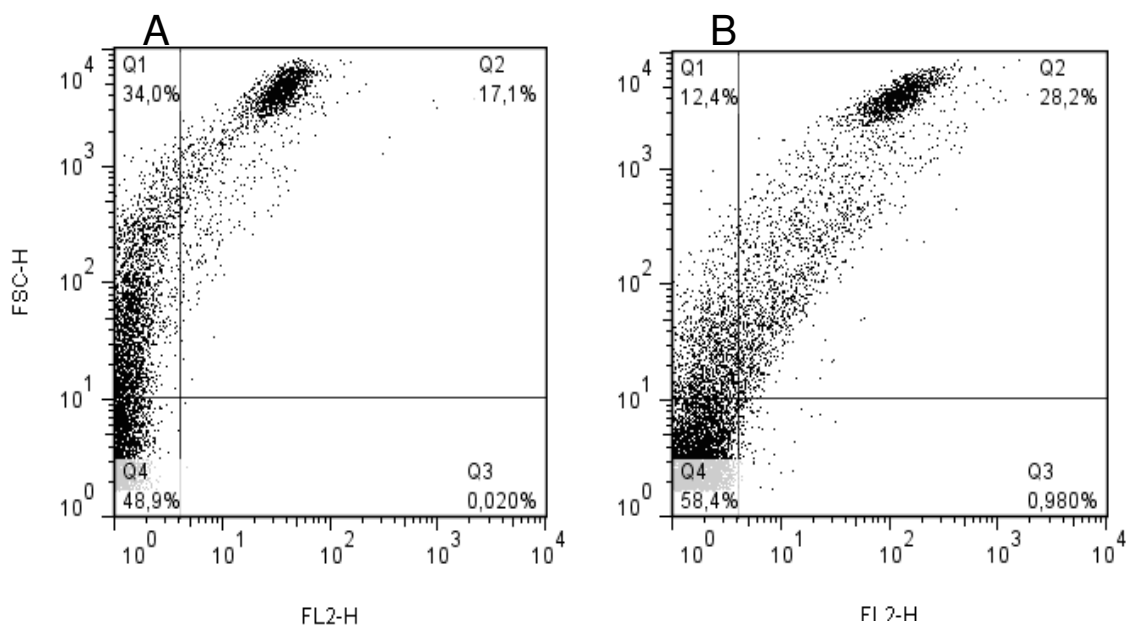


Figura 42 – Histogramas representativos das populações celulares da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs que expressam Caspase 3 fosforilada dos grupos: controle (A), e tratado com o composto fenólico - V6 (B) analisadas por citometria de fluxo. Histograma de expressão de Caspase 3 fosforilada foi realizada considerando-se a intensidade arbitrária de fluorescência no canal de marcação FL2-H pelo programa Cell-Quest.

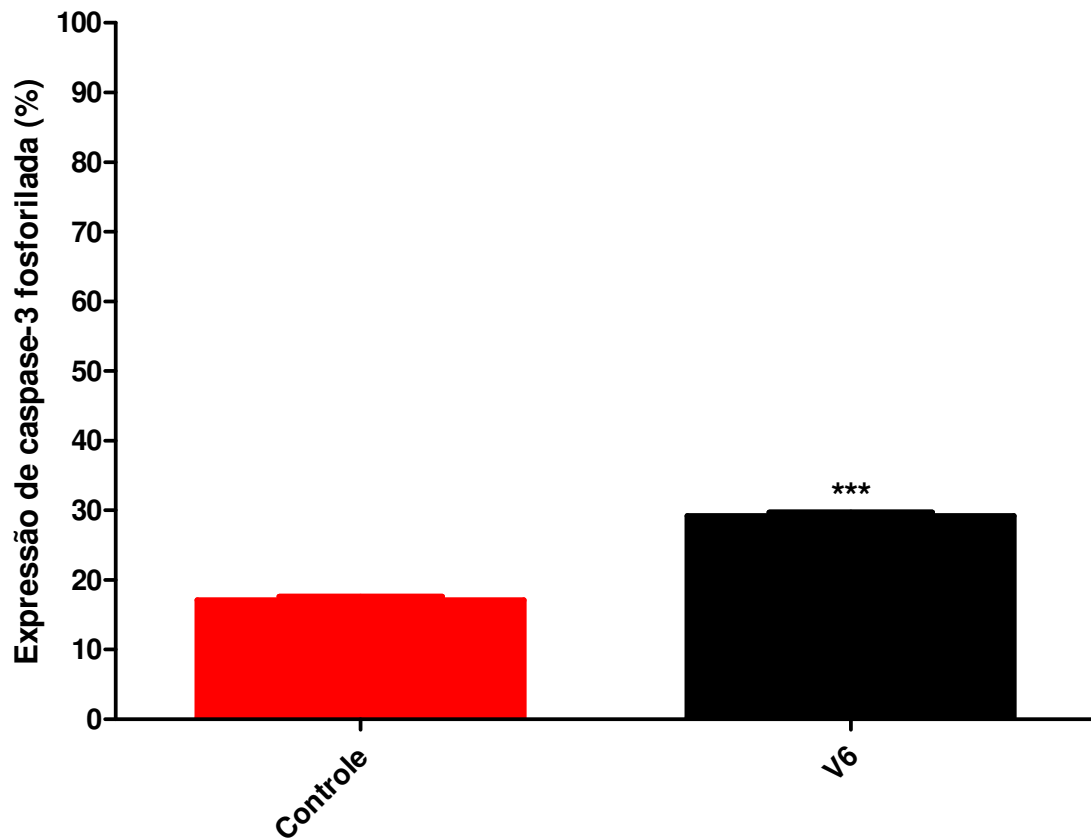


Figura 43 - Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem de células endoteliais humanas normais HUVECs. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de *** $p < 0.05$.

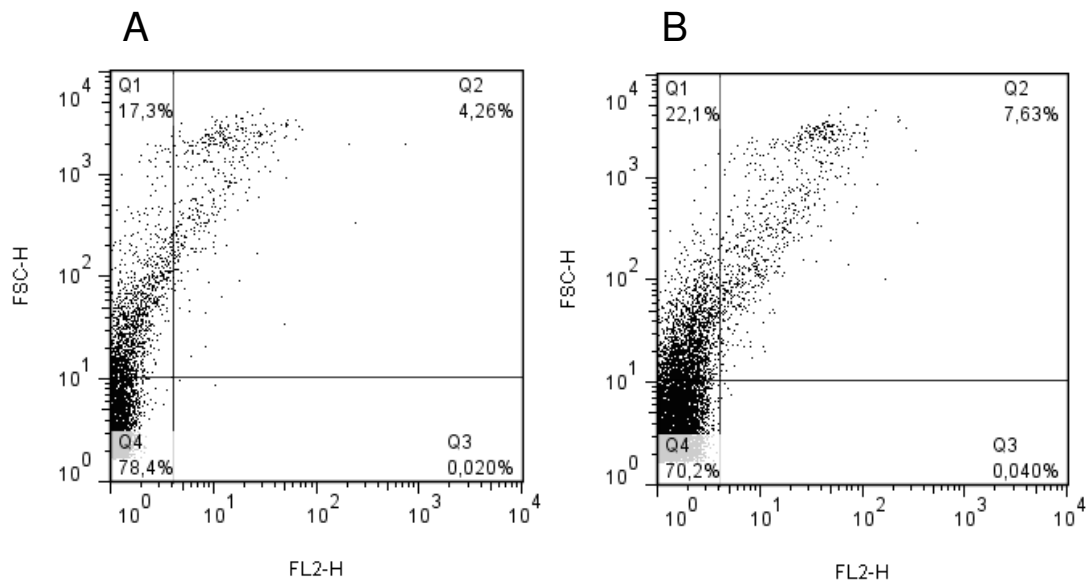


Figura 44 – Histogramas representativos das populações celulares da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1 que expressam Caspase 3 fosforilada dos grupos: controle (A), e tratado com o composto fenólico - V6 (B) analisadas por citometria de fluxo. Histograma de expressão de Caspase 3 fosforilada foi realizada considerando-se a intensidade arbitrária de fluorescência no canal de marcação FL2-H pelo programa Cell-Quest.

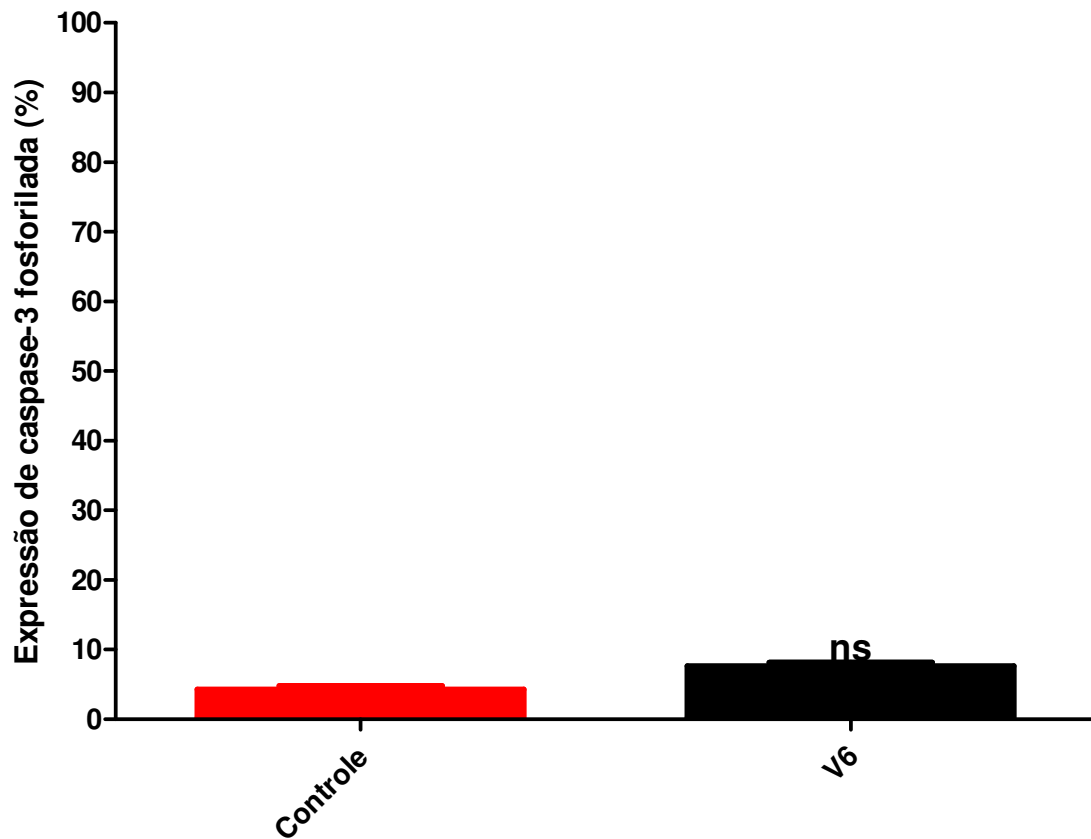


Figura 45 - Gráfico de barras representando a média \pm dp de expressão Caspase 3 fosforilada em células da linhagem de fibroblastos humanos normais FN1. Análise estatística de variância ANOVA seguida do teste múltiplo de TUKEY-KRAMER com nível crítico para significância de $***p < 0.05$, ns diferença não significativa.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Aproximadamente 70% dos medicamentos utilizados para o tratamento de câncer são derivados ou baseadas em produtos naturais (NEWMAN, 2002).

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998).

Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998).

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão um número reduzido deles, embora estes sejam encontrados com certa freqüência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. A esta família também pertencem os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais como a vanilina (SOARES, 2002).

Entre eles a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um dos compostos aromáticos mais apreciados no mundo e um importante flavorizante para alimentos, bebidas e é usada também em produtos farmacêuticos (OMIKRON, 2004). Ela possui vários efeitos como ação antimutagênica, antioxidante e antimicrobiano (CERRUTI,1996; SHAUGHNESSY, 2001).

As propriedades da vanilina também incluem efeito quimiopreventivo, diminuição das espécies reativas de oxigênio em células normais, além de prevenir danos oxidativos à proteínas e lipídios (KAMAT, 2000).

A vanilina possui baixa toxicidade, com DL 50 oral em ratos de aproximadamente 1,58-2,8 g/kg. (OPDYKE, 1977)

Alguns trabalhos indicam a atividade antitumoral da vanilina (FERGUSON, 1994; SHAUGHNESSY, 2006). Recentemente, alguns artigos relataram diminuição na quantidade de metástases tumorais em camundongos portadores de adenocarcinoma mamário tratados com vanilina e atividade antiproliferativa *in vitro*. (LIRPRAPAMONGKOL, 2005).

Desta forma, análogos da vanilina, como o composto V6 podem também induzir efeito antiproliferativo (FARTHING, 1999).

Em relação aos resultados descritos na patente - **COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS COMPOSTOS**, os compostos da presente invenção, principalmente o V4 e V6 sugerem uma resposta inflamatória específica nos tumores primários humanos e animais *in vivo*, impedindo seu crescimento e disseminação, principalmente nos tumores de pele, no caso do melanoma.

Desta forma, os compostos descritos na referida patente , pelos testes realizados podem impedir a disseminação e migração das células tumorais, assim como formação de tumores secundários ou metástases. Em particular, os compostos V4 e V6, inibem seletivamente a proliferação de células tumorais e o desenvolvimento de tumores. Por outro lado os compostos DM-1, DM-2, DB-3A, DB-3B, DB-2, V-4 e V-6 exibem maior efeito citotóxico específico contra as diversas linhagens tumorais humanas e animais, *in vivo*, como pode ser comprovado por resultados já que as IC_{50%} das linhagens tumorais SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino foram respectivamente, 4,02 e 3,78 mg/mL, enquanto os valores de IC_{50%} nas linhagens humanas normais FN1 e HUVEC foram respectivamente, 4,82 e 5,08 mg/mL, foram semelhantes nos

casos de melanoma-a e melanoma murino, estudados na patente 3. Os dados estão apresentados nas figuras **2, 3, 4 e 5.** e apresentam valores de concentração inibitória 50% (IC50) menores que os demais compostos testados. Nos estudos realizados por Galvonas (2008), não foram descritos especificamente os resultados da atividade do composto V6 em fibroblastos e células endoteliais humanas, que conforme as figuras 4 e 5 mostram, respectivamente uma IC50% de 4,82mg/mL e 5,08mg/mL , nos dois casos , mostrou que a morte de fibroblastos decai com a diminuição da concentração, o que mostra que em pequenas concentrações a viabilidade dos fibroblastos foi preservada, no decaimento natural destas células durante o experimento.

O composto V6 apresentou valores de IC50% menores para as linhagens tumorais de adenocarcinoma mamário e melanoma comparados às linhagens normais de células endoteliais e fibroblastos. Este fato indica uma menor quantidade requerida do composto para tratamento antitumoral, como poder analisado nas figuras 3 e 4..

Como também sabemos a vanilina atua como um agente antioxidante, pois inibe a oxidação protéica e peroxidação lipídica em células normais (KOGURE, 2002).

Entretanto, em células tumorais tratadas com o composto V6 este efeito é antagônico, pois há um aumento significativo na produção de radicais livres peroxidados. Em células normais, o composto V6 demonstrou potencial citoprotetor com elevação na quantidade de radicais livres sintetizados apenas nas maiores concentrações estudadas. Kamat e col(2000), estudaram a ação de derivados da vanilina em células de carcinoma hepático na estimulação da

produção de espécies reativas de oxigênio, provocando notáveis quebras na dupla fita do DNA.

Nos estudos realizado por Galvonas (2008), os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio nos melanócitos melan-a e nas células de melanoma Tm5 foram estimados utilizando-se o composto dihidroetídio (DHE) que fluoresce na presença de ânion superóxido no interior da célula. A atividade antioxidante dos compostos foi verificada utilizando-se um composto que fluoresce na presença de ânion superóxido. Os níveis intracelulares de ânion superóxido foram determinados nas linhagens melan-a e Tm5 tratadas ou não com os compostos V4 e V6 (40µg/ml) através do fluoróforo DHE. A linhagem de melanoma (Tm5) apresenta níveis intracelulares elevados de ânion superóxido comparado à linhagem não tumorigênica de melanócitos (melan-a). O tratamento com o composto V6, mas não V4, resultou numa redução significativa dos níveis intracelulares de ânion superóxido tanto na linhagem de melanócitos quanto na de melanoma. Dados da literatura mostram que níveis intracelulares de ânion superóxido podem contribuir com a resistência das células à apoptose, portanto, sua diminuição em células de melanoma poderia torná-las mais suscetíveis à morte. Neste caso, este poderia ser um dos mecanismos pelo qual o composto V6 sensibiliza as células de melanoma aos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos bleomicina e carboplatina. No experimento pode-se avaliar esta situação em uma idéia do que ocorre em relação aos fenômenos descritos já que os radicais livres peroxidados, foram significantes nas concentrações de 10 a 0,25 mg do composto V6 quando analisados pelo controle da linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama murino , como mostra a figura 6 e no caso da

linhagem de melanoma humano os radicai livres peroxidados foram significantes nas concentrações de 10 a 1 mg, como mostra a figura 7.

Os resultados obtidos indicam uma importante capacidade antitumoral destes compostos derivados da vanilina, tendo em vista a grande capacidade metastática e invasiva do melanoma e a sua tolerância aos tratamentos quimio- e radioterápicos, ambos os compostos podem ser promissores para utilização em terapias tendo em vista sua baixa toxicidade.

Nas concentrações de 0.030 e à 0.015 mg/mL, não foram observados efeitos citotóxicos, alterações na adesão celular ou formação de debris, não ocorreu estímulo de proliferação. Sendo assim, o composto V6 em células tumorais mostrou-se inibidor na densidade e na resposta proliferativa das células tumorais, o que corrobora com os achados de Galvonas (2007).

Em células normais, endoteliais e fibroblastos o tratamento como composto fenólico V6 não se mostrou com a mesma citotoxicidade, que em células tumorais. Não há relação entre dose e efeito. Foi evidenciado somente nas concentrações de 1.0 e 0.5mg/mL, uma discreta perda de células aderidas ao substrato da placa de cultura. Não foram evidenciados efeitos tóxicos, com a retração dos prolongamentos citoplasmáticos, modificações no citoesqueleto e a modificação da forma celular. Efeitos tóxicos, como vacuolização, picnose e fragmentação do núcleo, não foram documentadas. Os dados estão ilustrados nas figuras 11 e 13. Nestes tipos celulares nota-se diminuição significativa na densidade de células nas concentrações de 1.0 à 0.5 mg/mL, perda da adesão celular ao substrato da placa de cultura, retração dos prolongamentos citoplasmáticos e no citoesqueleto, com a formação de células arredondadas,

nas demais concentrações (0.025 à 0.015 mg/mL), não foram observadas alterações celulares ou formação de debris ou mesmo efeitos de toxicidade.

Os tratamentos das células tumorais de melanoma humano SKMEL-28 e adenocarcinoma de mama murino apresentaram potencial citotóxico no tratamento com o composto fenólico V6. Foram observadas alterações na perda da adesão celular, formação multi-agregados celulares e debris, como observados nas avaliações por microscopia óptica nas figuras 21 a 29.

Xiao e col. (2008) demonstraram alterações morfológicas com conformação apoptótica em células de câncer de mama tratadas com derivados da vanilina.

Os aspectos gerais para o estudo de mecanismos da apoptose são importante marcadores da ação de um candidato a composto antitumoral, como demonstrado por Marveti(2011) e Losler(2009), a alterações no potencial de membrana mitocondrial disparam o gatilho do mecanismo de apoptose, o que fica claro em nossos resultados com a caspase 3 fosforilada.

A diminuição de ciclina D1, marcador do checkpoint G1/S, indica diretamente diminuição da fase de G1 de proliferação que reflete no desenvolvimento tumoral. Como poder ser demonstrado em nossa hipótese a seguir:

Modulação da apoptose pelo uso do composto V6

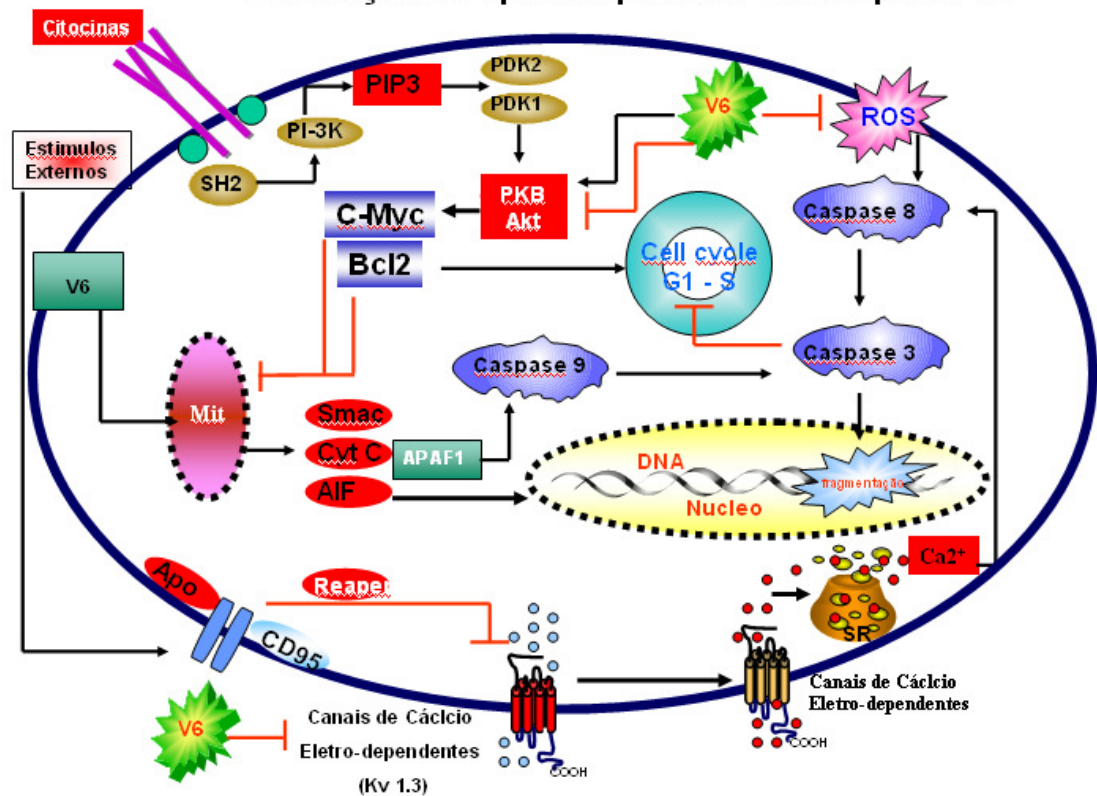


Figura 46- Sugestão da modulação da apoptose pelo Composto V6

Yan e colaboradores encontraram após tratamento com análogos da vanilina, diminuição na fase G1 e indução de apoptose em células de leucemia humana. As linhagens tumorais de mama e melanoma tratadas com V6 apresentaram diminuição na fase de proliferação e aumento na quantidade de DNA fragmentado. As células endoteliais e fibroblastos normais não apresentaram aumento na quantidade de morte celular. Ainda, a linhagem de fibroblastos humanos apresentou moderada elevação na população de células em proliferação, demonstrando a baixa toxicidade do composto V6.

Yan e col. (2006) relataram a ação pró-apoptótica de derivados da vanilina em células de leucemia humana Jurkat.

Neste mesmo trabalho, há relatos sobre as diferentes formas de indução de morte celular de acordo com a linhagem tratada com a vanilina e seus análogos. A linhagem de adenocarcinoma mamário apresentou aumento na quantidade de caspase-3 fosforilada, indicando ativação da via de morte celular programada – apoptose, como sugerimos no esquema o mecanismo na figura 46.

Entretanto, este efeito não foi demonstrado em células de melanoma, corroborando com os dados publicados por Yan e col (2006) e confirmando as diferentes vias de morte celular de acordo com a linhagem estudada.

O composto V6 mostrou-se seletivo a linhagens tumorais e apresenta baixa toxicidade quando comparado com as linhas de células normais, estes resultados sugerem que novos testes antitumorais possam ser realizados utilizando este composto fenólico.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Após a realização dos testes descritos e análise dos resultados podemos concluir que o composto polifenólico V6 apresentou:

- Citotoxicidade seletiva para as linhas tumorais de adenocarcinoma de mama (Ehrlich) e melanoma humano SKMEL-28 de forma representativa e que apresenta baixa toxicidade nas linhagens normais, representando um bom indicio de terapia antitumoral;
- O composto V6 atua na modulação do marcador de proliferação Ciclina D1, indicando uma atividade antiproliferativa em células tumorais;
- Em relação a ação do composto fenólico V6 sobre o potencial de membrana mitocondrial em células tumorais, está claro que este composto pode ativar a via extrínseca de caspase 3 e promover a apoptose de forma seletiva nas linhagens tumorais estudadas.
- Com base nos resultados obtidos, o composto V6 possivelmente atua nas células tumorais modulando o ciclo celular, com diminuição de ciclina D1, além de aumentar a quantidade de radicais livres peroxidados e caspase 3 fosforilada, corroborando com a diminuição do potencial elétrico mitocondrial que auxilia na indução de apoptose.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

ADAMS, B.K.; FERST, E.M.; DAVIS, M.C.; HEROLD, M.; KURTKAYA, S.; HOLLINGSHEAD, M.G.; KAUR, G.; SAUSVILLE, E.A. ; RICKLES, F.R.; SNYDER, J. P.; LIOTTA, D.C.; SHOJI, M. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents **Bioorg.Med.Chem.**v.12. p. 3871-3883. 2004.

ANGELO, P.M. e JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007

ARAUJO, T.F; PARDI. P.C- Análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos após administração de composto fenólico polifuncional em animais de experimentação. III Jornada de Iniciação Científica da Universidade Bandeirante de São Paulo. 2010

BHATT KV, HU R, SPOFFORD LS, APLIN AE. Mutant B-RAF signaling and cyclin D1 regulate Cks1/S-phase kinase-associated protein 2-mediated degradation of p27Kip1 in human melanoma cells. **Oncogene**. 2007;26(7):1056–66.

BOHLMANN F, BÜHMANN U. Synthese von natürlich vorkommenden Hydroxyacetophenon-Derivaten. **Chem. Ber.**; v.105: 863-873,1972

BRAVO, L. POLYPHENOLS: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

CERRUTTI, P.; ALZAMORA, S. M.; **Int. J. Food Microbiol.** **1996**, 29, 379.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.854, p.435-442, 1998.

DARZYNKIEWICZ Z, TRAGANOS F, STAIANO-COICO L, KAPUSCINSKI J, MELAMED MR. Interactions of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.* 1982;42:799-806.

FARTHING, D.; SICA, D.; ABERNATHY, C.; FAKHRY, I.; ROBERTS, J. D.; ABRAHAM, D. J.; SWERDLOW, P.; *J. CHROMATOGR., B: Biomed. Sci. Appl.* **1999**, 726, 303.

FECHER LA, AMARAVADI RK, SCHUCHTER LM, FLAHERTY KT. Drug Targeting of Oncogenic Pathways in Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3):599-618.

FERGUSON, L. R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 1994, 307 (1), 395–410.

JEMAL, A. , BRAY, F. , M. MELISSA, FERLAY, J. , WARD , E., FORMAN , D.
Global Cancer statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians, [v.61, Issue 2](#), p.
69–90, 2011

HORI H, YOSHIHIRO U, AKIHITO H, FUJITA T, SYUNSUKE T, NAGASAWA
H. First Total Synthesis of Artepillin C Established by *o,o*-Diprenylation of *p*-
Halophenols in Water. J. Org. Chem.; v,.67, pp.2355-2357, 2002

KAMAT, J. P.; GHOSH, A.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Vanillin as an antioxidant
in rat liver mitochondria: inhibition of protein oxidation and lipid peroxidation
induced by photosensitization. Mol. Cell. Biochem. 2000, 209, 47–53.

KOGURE K, GOTO S, NISHIMURA M et al. Mechanism of potent
antiperoxidative effect of capsaicin. Biochim Biophys Acta 2002: 1573: 84–92.

LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SAKURAI, H.; KAWASAKI, N.; CHOO, M. K.;
SAITOH, Y.; AOZUKA, Y.; SINGHIRUNNUSORN, P.; RUCHIRAWAT, S.;
SVASTI, J.; SAIKI, I. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis
of mouse breast cancer cells. Eur. J. Pharm. Sci. 2005, 25, 57–65.

LOSLER S; SCHLIEF S; KNEIFEL C; THIEL E; SCHREZENMEIER H;
ROJEWSKI MT, Antimony-trioxide- and arsenic-trioxide-induced apoptosis in
myelogenic and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of
mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular
glutathione redox system. [Ann Hematol](#); v.88, n.11, p.1047-58, 2009.

MARTINS, E.R; DEMAZO, L.C.; ALIBERTIS, J.C.;KATZ, S.;QUINCOCES. J.A; MESTRINER, C.L, SANTOS, M.R.M.; Modulação e expressão de genes em microorganismos patogênicos: Ação de substancias bioativas em Leishmania (L.) amazonensis. II Jornada de Iniciação Científica da Universidade Bandeirante de São Paulo. 2009

MARVERTI G; LIGABUE A; MONTANARI M; GUERRIERI D; CUSUMANO M; DI PIETRO ML; TROIANO L; DI VONO E; IOTTI S; FARRUGGIA G; WOLF F; MONTI MG; FRASSINETI C Characterization of the cell growth inhibitory effects of a novel DNA-intercalating bipyridyl-thiourea-Pt(II) complex in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. [Invest New Drugs](#); v.29, n.1, pp.73-86, 2011 .

MASUDA T, JITOE A, ISOBE J, NAKATANI N, YONEMORI S. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Curcumin-Related Phenolics from Rhizomes of *Curcuma Domestica*. *Phytochemistry*; v.32, n.6, pp. 1557-1560, 1993

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

NEWMAN DJ, CRAGG GM, HOLBECK S, AND SAUSVILLE EA. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2:279–308 2002 (OECD GUIDELINE

FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, p. 14, 2001).

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351-8.

OPDYKE, D. L. J. Fragrance raw materials monographs. Vanillin. Food Cosmet. Toxicol. 1977, 15, 633–638.

PISCO L, KORDIAN M, PESEKE K, FEIST H, MICHALIK D, ESTRADA E, CARVALHO J, HAMILTON G, RANDO D, QUINCOCES J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. Eur J Med Chem. 2006 Mar;41(3):401-7. Epub 2006 Jan 27

QUINCOCES SUÁREZ, J.; MARIA, D.A.; PARDI, P.C.; FAIÃO FLORES, F. ; PEREIRA SANTOS, R.; GONÇALES RANDO, D.](Pharmaceutical Composition And Use Of The Pharmaceutical Composition For The Treatment, Prophylaxis Or Prevention Of Neoplastic Diseases In Humans And Animals Wipo Patent Application Wo/2010/142007.

QUINCOCES, J.; RANDO, D. G.; MARIA, D. A.; MARTINS, C. A. S.; PARDI, P. C.; DE SOUZA, P. O. Brazilian Patent: PI 0602640-0 (06.07.2006), (PCT/BR 2007/000175), (06.07.2007). S.S. KUMAR, K.I. PRIYADARSINI, K.B. SAINIS,

Inhibition of peroxynitrite-mediated reactions by vanillin, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 139–145.

ROMAGNOLI R; BARALDI PG; CRUZ-LOPEZ O; LOPEZ CARA C; CARRION MD; BRANCALE A; HAMEL E; CHEN L; BORTOLOZZI R; BASSO G; VIOLA .G Synthesis and antitumor activity of 1,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as cis-restricted combretastatin analogues. [J Med Chem](#) v.53, n.10, p. 4248-58, 2010

SCHWARTZ GK, SHAH MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. J Clin Oncol. 2005;23(36):9408–21.

SHAUGHNESSY, D. T.; SCHAAPER, R. M.; UMBACH, D. M.; DEMARINI, D. M. Inhibition of spontaneous mutagenesis by vanillin and cinnamaldehyde in *Escherichia coli*: dependence on recombinational repair. Mutat. Res., 602 (1-2), 2006 54–64,

SHAUGHNESSY, D. T.; WOODROW, S. R.; DEMARINI, D. M.; The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites Mutat. Res. **2001**, 480, 55.

SOARES S. E. - Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev. Nutr. v.15 n1 , 2002 p:201-208,

XIAO Y, BI C, FAN Y, CUI C, ZHANG X, DOU QP.. L-glutamine Schiff base copper complex as a proteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cancer cells. Int J. Oncol. Nov;33(5): 2008 1073-9,

YAN YQ, XU QZ, WANG L, SUI JL, BAI B, ZHOU PK. Vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde-elicited apoptosis and G2/M arrest of Jurkat cells proceeds concurrently with DNA-PKcs cleavage and Akt inactivation. *Int J. Oncol* 29(5): 2006 1167-72.