



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato,  
frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum*  
(Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e  
VERO.**

MÍRIAN LETÍCIA CARMO BASTOS

BELÉM / PA  
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato,  
frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum*  
(Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e  
VERO.**

Autora: Mírian Letícia Carmo Bastos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM / PA  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat,**

---

B327a Bastos, Mírian Letícia Carmo.  
Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e  
alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares  
ACP02, HepG2 e VERO / Mírian Letícia Carmo Bastos. - 2017;  
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto  
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Belém, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Co-orientação: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia.

1. Câncer. 2. Atividade antitumoral. 3. Citotoxicidade. 4. Apoptose . 5.  
Alcaloide. I. Dolabela, Maria Fani , orient. II.

CDD 615.4

---

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Mírian Letícia Carmo Bastos**

**Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Banca Examinadora

---

Profa Dra Maria Fani Dolabela (orientadora)  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

Prof Dr Marcelo de Oliveira Bahia  
Instituição: Universidade Federal do Pará (co- orientador)

---

Profa Dra Tatiane Cristina Mota  
Instituição: Escola Superior da Amazônia

---

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos  
Instituição: Universidade Federal do Pará

À minha família.

À minha querida prima Rosemary (*in memoriam*)

À quem convive com a luta diária contra o câncer.

## AGRADECIMENTOS

No final desta etapa são tantos a quem transmito meus sinceros agradecimentos, pelo companheirismo, estímulo e auxílio nessa jornada. Agradeço a cada um que contribuiu diretamente ou indiretamente com esse trabalho.

À Professora Dra. Maria Fani Dolabela, por sempre me receber de braços abertos durante todos os anos que convivemos. Agradeço, sobretudo, por todo o apoio na minha vida acadêmica, as oportunidades, as orientações, a base científica, a confiança depositada e a amizade. Saiba que todas essas experiências foram de grande relevância para a minha vida profissional e crescimento pessoal. Sou eternamente grata!

Ao Professor Dr. Marcelo de Oliveira Bahia, por ter aceitado a parceria na minha orientação e proporcionando a minha experiência no Laboratório de Citogenética Humana (LCH). Agradeço pelos momentos em que o senhor mostrou com calma e delicadeza o caminho a seguir.

Agradeço a todos do LCH: Professores Rommel Burbano, Marcelo Bahia, Adriana Guimarães, Carol Rosal e André Kayat, agradeço por me receberem como aluna “legítima” desse laboratório e pela confiança depositada em mim. Agradeço também a todos os alunos de graduação, mestrado, doutorado e pós doutorado, em especial à Loreninha, Daniele, Felipe, Tatiane e Juliana, pela ajuda que vocês me deram durante o tempo que estive no laboratório.

Também agradeço aos grandes amigos que fiz nessa jornada dentro do LCH: Ingrid, Laís, Emerson, Camila e Jorge. Jamais esquecerei o nosso cotidiano com momentos de desespero (pelos problemas de cada dia; rsrrs), de incentivo (quando o ensaio não dava certo) e de vibração pelos resultados positivos. Agradeço, sobretudo, pela receptividade e momentos de felicidade. Obrigada pelo carinho e trabalho em equipe. Vocês são maravilhosos.

Minha gratidão a todos do Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas (LFDN), especialmente ao Alexandre, Erica Vanessa, Lara, Analu, Dayse Brandão, Luiz, Jhessica Peniche, Márcio Miranda, Juliana Correa. Agradeço também ao PET-Farmácia/ UFPA e aos que participaram direta ou indiretamente dessa pesquisa. Obrigado por serem pessoas tão prestativas e dispostas a orientar e trocar conhecimentos. Agradeço por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Agradeço aos amigos que contribuíram grandemente com o desenvolvimento desse trabalho, seja apoiando, auxiliando ou desenvolvendo a pesquisa. Vocês tornaram-se meus grandes amigos: Thiago Freitas (Thi Muricata), Valdicley Vale (Cavaleiro Jedi), Heliton Brigido (Zeraado) e meu grande parceiro de pesquisa João Victor Silva da Silva (Sr. viciado em pré-dosificação de placas). Vocês foram essenciais nessa fase.

À Amandinha e Hiromi, por contribuírem de maneira tão positiva no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por serem tão dedicadas e por proporcionarem meu crescimento a partir da nossa parceria. Meu carinho por vocês é muito grande.

Às amigas que tive o prazer de fazer no mestrado, e às que se fortaleceram a partir dele: Maisa, Rafaelli, Diandra, Fernanda, Stefânia, Milena, Natasha e Erica Patrícia. Obrigada pelos grandes momentos de trabalho e diversão (Bendito seja o Workshop do PPGCF).

Agradeço à prof. Dra. Marta Chagas e Prof. Dr. José Luiz Fernandez Vieira pela coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências farmacêuticas e pela parceria na realização do Workshop do PPGCF.

Agradeço aos professores que contribuíram, a partir do exame de qualificação e defesa para o direcionamento dessa pesquisa, apoiando cientificamente este trabalho: Flávio de Vasconcelos, Sandro Percário e Tatiane Cristina Mota.

Agradeço à parceria dos laboratórios da Faculdade de farmácia: Laboratório de Parasitologia, Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Fitoquímica e Laboratório de Toxicologia.

Às secretárias do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA, Brasília e Cliciane, pelo apoio e paciência durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida

Agradeço ao Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas, na pessoa de Jorge Dores Rissino (Seu Jorge). Parte dessa pesquisa só pôde ser realizada através dessa parceria. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar com dedicação e boa vontade, principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos Rosana, Ivaldo e James, minha gratidão. O incentivo, a amizade, o amor e o companheirismo de vocês são essenciais em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus amiguinhos de Tucuruí "Só os amigos - Nayana, Marisa, Bianca, Bruno, Fabrício, Ezequiel e Rafael" pela amizade, parceria e apoio durante essa fase.

Ao Bruno Magno, pela amizade e por me aturar na convivência do dia a dia. Obrigada pela companhia. És, além de amigo, um grande irmão pra mim.

Ao Davi Sales, meu grande amor e amigo, são os infinitos agradecimentos. Você foi o grande incentivador para a realização dessa etapa. Obrigada por me apoiar nas decisões. Sou muito grata pela paciência e compreensão pelos momentos que estive ausente. Agradeço por Deus tê-lo colocado em meu caminho.

Finalmente agradeço com todo o meu amor àqueles que estiveram comigo desde o início, em todos os momentos da minha vida, incentivando, auxiliando e que nunca me deixaram desistir nos obstáculos: minha família. Aos meus pais José Bastos e Maria Carmo, minha gratidão será eterna. Aos meus irmãos Lívia, Maiara, Ádria, Marquinho e Márcio, agradeço pelos momentos de felicidade, carinho, amor, companheirismo e por vocês sempre me apoiarem, desejando sucesso. Amo vocês.

Agradeço a Deus pela minha vida e por conseguir alcançar mais esse objetivo pois sem ele nada seria possível.

“Os bons e os maus resultados dos nossos ditos e obras vão se distribuindo, supõe-se que de forma bastante uniforme e equilibrada por todos os dias do futuro, incluindo aqueles infindáveis, em que já cá não estaremos para poder comprová-los, para congratular-nos, ou pedir perdão, aliás, há quem diga que isso é que é a imortalidade que tanto se fala.”

(Jose Saramago - Ensaio sobre a cegueira)

## RESUMO

BASTOS, M. L.C. **Atividade Antitumoral, citotoxicidade e seletividade de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 108 p. Universidade Federal do Pará, Belém, Belém, 2017.

O presente estudo avaliou a atividade antitumoral de *G. sericeum* em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma gástrico primário paraense (ACP02), a seletividade e o mecanismo de morte celular. O pó obtido das cascas de *G. sericeum* foi submetido a maceração exaustiva com etanol e a solução concentrada em evaporador rotativo até resíduo. Para o fracionamento do extrato de *G. sericeum* utilizou-se extração sob refluxo e partição ácido: base. A fração alcaloídica (FAGS), obtida da partição ácido:base, foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel o metanol, dando origem a subfração F6FAGS. Esta subfração foi submetida ao fracionamento através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Semipreparativa, isolando o alcaloide indólico F3F6FAGS. A atividade antitumoral e a citotoxicidade do extrato etanólico, frações, subfrações e F3F6FAGS foram avaliadas através do ensaio de viabilidade celular com o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]) em células ACP02, células de hepatoma humano (HepG2) e em linhagem de células normais de rim de macaco verde africano (VERO). Foram consideradas ativas como antitumoral as amostras com concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) menor que 100  $\mu\text{g/mL}$  em células ACP02. Foram consideradas citotóxicas as amostras com concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) menor que 100  $\mu\text{g/mL}$  em células HepG2 e VERO. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre os valores da  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  e foram consideradas seletivas as amostras com IS maior que 2, demonstrando que essa atividade é duas vezes mais seletiva para células tumorais. As amostras mais seletivas foram submetidas à quantificação de morte celular com corantes fluorescentes Hoechst 33342 (HO), Iodeto de Propídeo (PI) e Fluoresceína Diacetato (DAF) em 24 e 72 horas de exposição. Todas as amostras foram ativas ou moderadamente ativas para atividade antitumoral e apresentaram moderada atividade citotóxica ou não foram citotóxicas. A FAGS e F3F6FAGS tiveram menor  $CI_{50}$  (FAGS = 18,29  $\mu\text{g/mL}$  e F3F6FAGS = 12,06  $\mu\text{g/mL}$ ), maior  $CC_{50}$  (FAGS- $CC_{50}$  = 173,3  $\mu\text{g/mL}$  para VERO e 299,45  $\mu\text{g/mL}$  para HepG2 e F3F6FAGS  $CC_{50}$  476  $\mu\text{g/mL}$  para células renais e  $CC_{50}$  503,5  $\mu\text{g/mL}$  para células hepáticas) e foram mais seletivas (F3F6FAGS- IS = 39,4 para VERO e IS = 41,74 para HepG2 e FAGS- IS = 9,5 para VERO e IS = 16,37 para HepG2). A FAGS apresentou maior efeito apoptótico e necrótico em 24 e 48h, com o aumento da taxa de necrose nas maiores concentrações e no maior do tempo de exposição. Para o alcalóide, a apoptose e necrose mostraram-se concentração e tempo- dependentes, com menor índice de necrose. Esses resultados sugerem seletividade de F3F6FAGS para câncer gástrico. Porém, a maior citotoxicidade e a menor seletividade da FAGS, provavelmente, estão relacionadas ao sinergismo de seus alcaloides para apoptose e necrose.

**Palavras-chave:** Câncer, *G. sericeum*, Citotoxicidade, Atividade antitumoral, Apoptose.

## ABSTRACT

BASTOS, M. L.C. **Antitumor activity, cytotoxicity and selectivity of *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae)**. Dissertation (Master's degree) - Graduate Degree Program in Pharmaceutical Sciences, 108 p. Universidade Federal do Pará, 2017.

This study evaluated the antitumor activity of *G. sericeum* in primary gastric adenocarcinoma (ACP02), the selectivity and the mechanism of cell death. The *G. sericeum* bark powder was submitted to the exhaustive maceration with ethanol, which the resultant solution was concentrated on rotaevaporator until residue. For the fractionation of *G. sericeum* extract was used the fractionation under reflux and acid-basic partition. The alkaloid fraction (FAGS) obtained from the acid-basic partition was submitted to the open chromatography column (OCC), using Sephadex LH – 20 as stationary phase and the methanol as mobile phase, resulting in the subfraction F6FAGS. This subfraction was submitted to semi-preparative high performance liquid chromatography (HPLC) and the indole alkaloid (F3F6FAGS) was isolated. The cytotoxicity and antitumor activity of the ethanol extract, its fractions and F3F6FAGS were assessed through cell viability assay with MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]) in tumor-cell lines: ACP02, hepatocellular carcinoma (HepG2) and normal VERO cells (African green monkey). The samples with inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) below 100 µg/mL were considered active for antitumor activity in ACP02. The samples with IC<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL were considered cytotoxic for cell lines HepG2 and VERO. The selectivity index (SI) was obtained from the ratio between the CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values and the samples were considered selective with SI higher than two, indicating that this activity is twice selective for tumor cells. The most selective samples were submitted to quantification of cell death with fluorescent dyes Hoechst 33342 (HO), Propidium Iodide (PI) and Fluorescein Diacetate (FDA) during 24 and 72 hours of exposure. All samples were active or moderately active for antitumor activity and exhibited moderate cytotoxic activity or were not cytotoxic. The FAGS and indole alkaloid had lower IC<sub>50</sub> (FAGS = 18, 29 µg/mL e F3F6FAGS = 12, 06 µg/mL) bigger CC<sub>50</sub> (FAGS-CC<sub>50</sub> = 173, 3 µg/mL for VERO and 299,45 µg/mL for HepG2 and F3F6FAGS CC<sub>50</sub> 476 µg/mL for renal cells and CC<sub>50</sub> 503,5 µg/mL for hepatic cells) and were more selective (F3F6FAGS- SI = 39,4 for VERO and SI = 41,74 for HepG2 and FAGS- SI = 9,5 for VERO and SI = 16,37 for HepG2). The FAGS had greater apoptosis and necrosis in 24h and 48h with increased necrosis in the higher concentrations and with the increase of the exposure time. For alkaloid, apoptosis and necrosis were shown concentration and time-dependent, with a lower necrosis rate. These results suggest some selectivity of the F3F6FAGS alkaloid for gastric cancer. However, the bigger cytotoxicity and the lower selectivity of FAGS are probably related to the synergism of its alkaloids for apoptosis and necrosis.

**Keywords:** *G. sericeum*, Antitumor Activity, Cytotoxicity, selectivity, Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Estrutura química dos alcaloides da Vinca	23
<b>Figura 2:</b>	Estrutura química da elipticina	24
<b>Figura 3:</b>	Estrutura química da alstonina	25
<b>Figura 4:</b>	Estrutura química dos alcaloides isolados de <i>G. sericeum</i>	26
<b>Figura 5:</b>	Fotomicrografia da linhagem celular ACP02 em cultivo (10x)	30
<b>Figura 6:</b>	Características morfológicas de células necróticas e apoptóticas	40
<b>Figura 7:</b>	Estrutura química da Camptotecina e seus derivados	42
<b>Figura 8:</b>	Linhagens celulares usadas nos ensaios	56
<b>Figura 9:</b>	Fotografias de folhas e tronco de <i>G. sericeum</i>	57
<b>Figura 10:</b>	Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico de cascas de <i>G. sericeum</i>	59
<b>Figura 11:</b>	Partição ácido: base do extrato etanólico de <i>G. sericeum</i> .	60
<b>Figura 12:</b>	Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; MTT] por enzimas mitocondriais	62
<b>Figura 13:</b>	Síntese do processo de obtenção de amostras e esquema dos ensaios biológicos desenvolvidos.	67
<b>Figura 14:</b>	Gráfico de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição à FAGS e F3F6FAGS em linhagem ACP02	70
<b>Figura 15:</b>	Visualização macroscópica do resultado do teste de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição à amostras de <i>G. sericeum</i> em linhagem ACP02.	71
<b>Figura 16:</b>	Visualização macroscópica do resultado do teste de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição ao alcaloide indólico isolado de <i>G. sericeum</i>	71
<b>Figura 17:</b>	Estrutura química do alcaloide geissospermina e seus	77

derivados

**Figura 18:** Micrografias de células da linhagem ACP02 após 83  
exposição à doxorrubicina, FAGS e F3F6FAGS na  
realização do ensaio de Apoptose por marcação  
fluorescente

**Figura 19** Frequência de apoptose e necrose em células ACP02 em 87  
24 e 48h de exposição à FAGS

**Figura 20:** Frequência de apoptose e necrose em células ACP02 em 89  
24 e 48h de exposição ao alcaloide F3F6FAGS

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1:</b>	Interpretação dos resultados baseado na faixa do $CI_{50}$	63
<b>Quadro 2:</b>	Interpretação dos resultados de citotoxicidade	63
<b>Tabela 1:</b>	Atividade Antileishmania de <i>G. sericeum</i> e <i>G. vellosii</i>	48
<b>Tabela 2:</b>	Estudos em cromatografia em camada delgada de <i>G. sericeum</i>	69
<b>Tabela 3:</b>	Atividade antitumoral de <i>G. sericeum</i> em linhagem de câncer gástrico	70
<b>Tabela 4:</b>	Citotoxicidade de alcaloides de <i>G. sericeum</i> em linhagem THP-1	72
<b>Tabela 5:</b>	Avaliação da citotoxicidade de <i>G. sericeum</i>	75
<b>Tabela 6:</b>	Avaliação da seletividade do efeito antitumoral de <i>G. sericeum</i>	79

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b>	Percentual de células viáveis	63
<b>Equação 2:</b>	Percentual de células mortas	63
<b>Equação 3:</b>	Índice de Seletividade	65
<b>Equação 4:</b>	Determinação de viabilidade celular para detecção do padrão de morte celular	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP01	Adenocarcinoma gástrico primário 1
ACP02	Adenocarcinoma gástrico primário 2
APC	Gene Polipose Adenomatosa do cólon
CDH	Gene que codifica a molécula de adesão Caderina-E)
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%
CG	Câncer Gástrico
CGDH	Câncer Gástrico Difuso Hereditário
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50%
CLAE- DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjos de Diodos
DAF	Fluoresceína Diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECF	Epirrubicina, cisplatina e fluorouracila infusional
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EEGS	Extrato etanólico de <i>G. sericeum</i>
EEGV	Extrato etanólico de <i>G. vellosii</i>
FAGS	Fração de alcaloide de <i>G. sericeum</i>
F6FA	Fração 6 obtida a partir da fração de alcaloides
F3F6FAGS	Subfração obtida a partir da fração 6 de <i>G. sericeum</i> – identificada como alcaloide indólico
F3F6FAGV	Subfração obtida a partir da fração 6 de <i>G. vellosii</i> – identificada como alcaloide indólico
F4F6FAGV	Subfração obtida a partir da fração de alcaloides de <i>G. vellosii</i>
F7F6FAGS	Subfração obtida a partir da fração de alcaloides de <i>G. sericeum</i>
FNGS	Fração de neutros de <i>G. sericeum</i>
FrAcOETGS	Fração Acetato de etila de <i>G. sericeum</i>
FrDCMGS	Fração diclorometânica de <i>G. sericeum</i>
FrHexGS	Fração hexânica de <i>G. sericeum</i>
FrMeOHGS	Fração metanólica de <i>G. sericeum</i>

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FU	Fluorouracila
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
HO	Hoechst 33342
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IS	Índice de seletividade
K 1	Cepas de <i>Plasmodium falciparum</i> resistentes a cloroquina
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectro de Massa
LNCaP	Linhagem tumoral de câncer da próstata humano
L1210	Linhagem celular de leucemia
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MGC-803	Linhagem celular de tumor gástrico
MCF-7	Linhagem tumoral de câncer de mama
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NF-KB	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i>
OMP	Proteínas de membrana externas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PELF	Epirrubicina, cisplatina, leucovorin e fluorouracila
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PSA	Antígeno prostático específico
P1534	Linhagem celular de leucemia
P388	Linhagem celular de leucemia
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
RT	Radioterapia
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3
T9 - 96	Cepas de <i>P. falciparum</i> sensíveis à cloroquina
THP- 1	Células de leucemia diferenciadas em macrófagos
TOP	Topoisomerase
TPP	Timidina trifosfato

VacA	Citotoxina vacuolar A
VERO	Linhagem de células oriundas de Rim de Macaco verde africano <i>Cercopithecus aethiops</i>
W2	Clone de <i>Plasmodium falciparum</i> resistente a cloroquina
X5563	Linhagem celular de mieloma

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

>	Maior
<	Menor
%	Porcentagem
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramma
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
nm	Nânometro
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotação Por Minuto
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	49
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	49
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	49
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
<b>4.1 Material</b> .....	50
4.1.1 EQUIPAMENTOS .....	50
4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO.....	51
4.1.3 OUTRAS SOLUÇÕES .....	54
4.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO .....	55
4.1.5 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	57
<b>4.2 Métodos</b> .....	58
4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO DO EXTRATO E ALCALOIDE .....	58
4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL .....	61
4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PADRÃO DE MORTE CELULAR UTILIZANDO CORANTES FLUORESCENTES.....	64
<b>4.3 Análise Estatística</b> .....	66
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>5.1 Estudo Fitoquímico</b> .....	68
<b>5.2 Avaliação da Atividade Antitumoral em linhagem de câncer gástrico (ACP02)</b> .....	69
<b>5.3 Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células renal (VERO) e hepática (HepG2) e seletividade para atividade antitumoral</b> .....	73

<b>5.4 Avaliação do padrão de morte em linhagem de câncer gástrico ACP02 submetida ao tratamento com FAGS e F3F6FAGS. ....</b>	<b>80</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

## 1.INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que ocorre em todos os continentes, estima-se que a cada três pessoas, uma será diagnosticada com câncer (WHO, 2014). Estimativas apontam para a ocorrência, de aproximadamente, 21,4 milhões de novos casos/ ano no mundo, 596.070 novos casos/ ano no Brasil e cerca de 20 mil desses novos casos correspondem a malignidades gástricas (FACINA 2014; BRASIL, 2015).

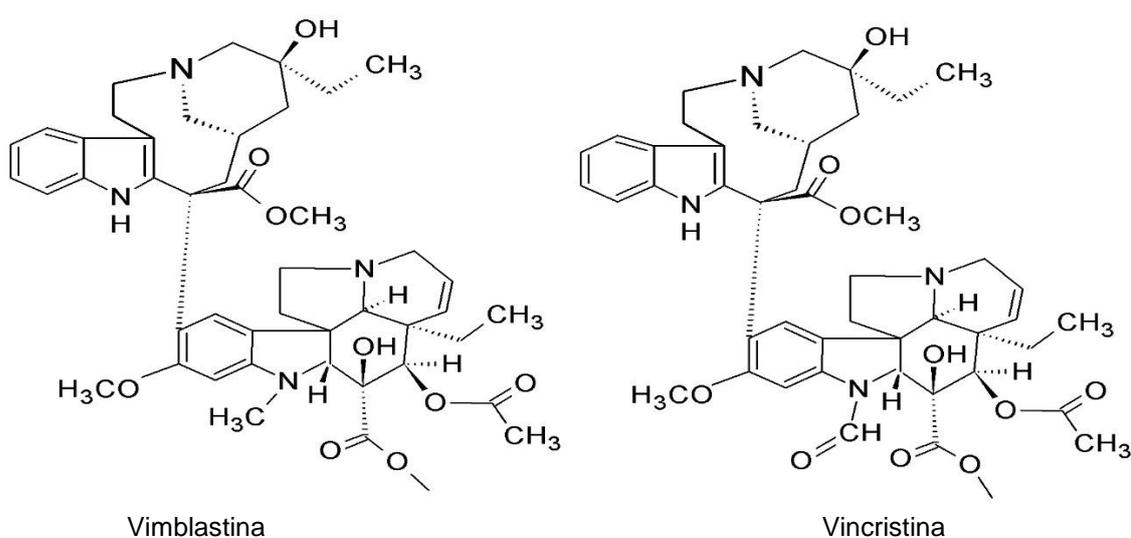
Nos últimos 50 anos, houve um avanço significativo no tratamento do câncer, sendo introduzidos na terapêutica mais de 70 novos medicamentos. Um desafio a ser vencido é o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, devido à relativa semelhança entre células malignas e normais do corpo (BRANDÃO et al. 2010). Os fármacos disponíveis destroem as células tumorais e células normais com maior taxa de mitose, como, por exemplo, as células sanguíneas. A consequência desta baixa seletividade são as inúmeras reações adversas e tóxicas (OLIVEIRA e ALVES, 2002; FERREIRA et al. 2014). Um câncer muito frequente submetido a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos com eventos adverso severos, é o câncer gástrico, sendo a taxa de sobrevivência inferior a 25% (DURÃES et al. 2014).

Um dos maiores problemas para o sucesso da quimioterapia do câncer é o desenvolvimento de resistência. Este fenômeno ocorre em cerca de 90% dos casos de câncer metastático (LONGLEY e JOHNSTON, 2005; HUBER et al. 2010). Esta resistência a múltiplos fármacos pode estar relacionada: ao transporte ativo do fármaco através da membrana plasmática (Bomba de efluxo; DIETEL, 1991; HUBER et al. 2010), alteração nas enzimas-alvo (BECK, 1990; HUBER et al. 2010), alteração no metabolismo do fármaco (MORROW e COWAN, 1990; HUBER et al. 2010), aumento na reparação do DNA (HAMMOND et al. 1989; HUBER et al. 2010) e a célula se torna incapaz de sofrer apoptose (HANNUN, 1997; HUBER et al. 2010). No caso do câncer gástrico, as células tumorais sofrem mutações durante a quimioterapia, desenvolvendo resistência ao tratamento (YI et al. 2012; VIEGAS, 2015), sendo necessário a associação de fármacos, que nem sempre aumentam a sobrevida

dos pacientes, e ainda contribuem para eventos adversos mais severos (KIM, 2003; KANG et al. 2008; VIEGAS, 2015).

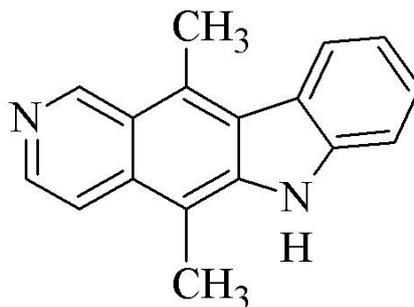
Outro problema relacionado à quimioterapia é o custo elevado do tratamento, sendo este influenciado: pelos fármacos utilizados no tratamento, a frequência de administração dos medicamentos na quimioterapia, a duração do tratamento e as despesas hospitalares. Em média, o custo de um tratamento quimioterápico por oito semanas pode chegar a R\$ 98.000,00 (COMICB, 2015).

Mediante aos problemas expostos, a busca por novos fármacos de menor custo, mais seletivos e que atuem em tumores resistentes a multidrogas é urgente. Na busca de novos fármacos anticâncer as plantas representam uma fonte, visto que vários fármacos se originaram de produtos naturais (VARANDA, 2006; CARDOSO, 2014). Por exemplo, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) é uma planta utilizada na medicina tradicional de Madagascar como hipoglicemiante. Durante a validação deste uso observou-se que o extrato suprimia a medula óssea nos animais. Posteriormente, foram isolados dessa planta alcaloides bisindólicos (Figura 1) vimblastina e vincristina que, atualmente, são utilizados para o tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al. 2010).



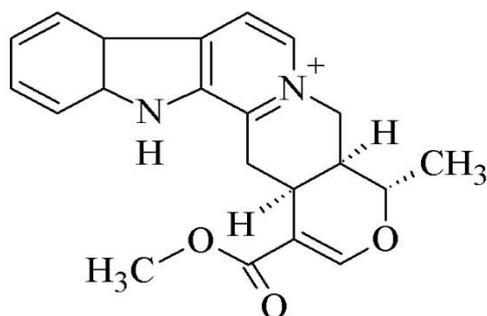
**Figura 1-** Estrutura química dos alcaloides da Vinca

Outro alcaloide indólico com reconhecida atividade anticâncer é a elipticina (Figura 2), isolado de *Bleekeria vitensis*, da família Apocynaceae (MANS et al. 2000), o qual inibe a enzima Topoisomerase (TOP) II; PAOLETTI et al. 1980).



**Figura 2** - Estrutura química da elipticina

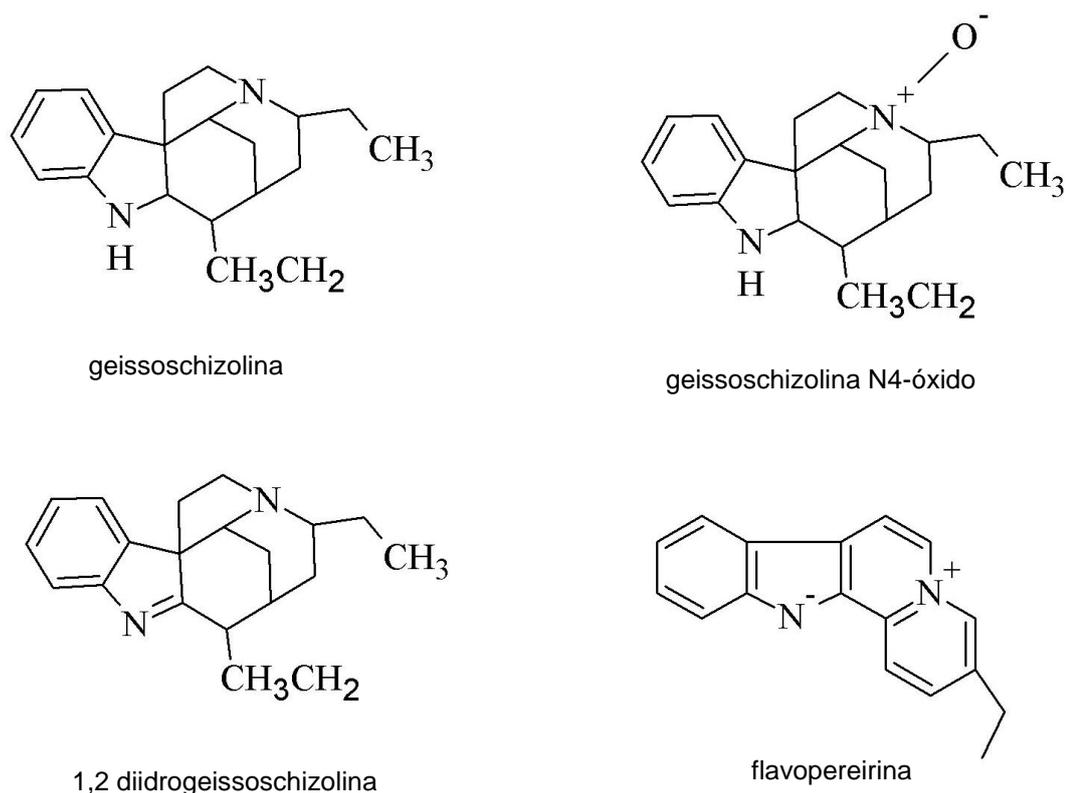
Diferentes espécies de Apocynaceae, que possuem alcaloides indólicos e  $\beta$ -carbolínicos são promissoras para o tratamento do câncer (STEELE et al. 2002; CARDOSO et al. 2003), como os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos flavopereirina (isolado de *Geissospermum vellosii*; Figura 4) e alstonina (isolado de *Rauwolfia vomitoria*; Figura 3), os quais foram utilizados como componentes de uma formulação natural para ser usada na prevenção e tratamento de câncer de próstata. Sabendo que esses alcaloides exibem diferentes mecanismos de ação na prevenção e controle do câncer, os desenvolvedores desse agente fitoterapêutico estabeleceram que o mecanismo de ação desta formulação natural baseia-se na indução de apoptose através da desestabilização do DNA das células tumorais, sendo específico para essas células. Afirma-se que o agente fitoterapêutico desenvolvido reduz os níveis de antígeno prostático específico (PSA), um importante marcador metabólico para este tipo de câncer. Esse agente também atenua os sintomas da hiperplasia prostática benigna (HALL e BELJANSKI, 2005).



**Figura 3** - Estrutura química da alstonina

No entanto, muitas espécies ricas nestes alcaloides, ainda carecem de estudo, como, por exemplo, a *Geissospermum sericeum*. Desta espécie já foram isolados os alcaloides indólicos geissoschizolina e dois derivados: geissoschizolina N4-óxido, 1,2- diidrogeissoschizolina e o alcaloide  $\beta$  - carbolínico flavopereirina (Figura 4; STEELE et al. 2002).

A geissoschizolina, seus derivados geissoschizolina N4-óxido, 1,2 diidrogeissoschizolina e flavopereirina mostraram ativos para a linhagem de células humanas KB. Para geissoschizolina e geissoschizolina N4-óxido a  $CI_{50}$  foi  $> 40\mu M$ , enquanto que a  $CI_{50}$  do derivado 1,2-deiidrogeissoschizolina foi  $40\mu M$ . Flavopereirina também mostrou atividade citotóxica moderada ( $CI_{50}$   $10,7\mu M$ ), sendo este alcaloide, no referido estudo, o mais ativo. A citotoxicidade de flavopereirina já havia sido citada anteriormente, devido à sua capacidade para inibir seletivamente a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) em células tumorais, em comparação com células saudáveis (STEELE et al. 2002).



**Figura 4** - Estrutura química dos alcaloides isolados de *G. sericeum*

Apesar destes resultados promissores, estes alcaloides têm sido pouco avaliados para a atividade antitumoral e nenhum trabalho avaliou a atividade de *Geissospermum* e seus alcaloides sobre tumores gástricos. A investigação da atividade antitumoral de *G. sericeum* e os mecanismos de morte celular, como apoptose e necrose são muito importantes, uma vez que os alcaloides desta espécie podem apresentar atividade semelhante aos alcaloides da *Vinca* (vincristina e vimblastina) ou ao alcaloide elipticina.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Etimologicamente, a palavra câncer possui origem grega. Surgiu a partir da “karkínos” que quer dizer caranguejo. Foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460 -377 a.C.), o pai da medicina. O câncer foi detectado em múmias egípcias, comprovando que ele já ocorria há mais de 3 mil anos antes de Cristo. No sentido patológico, o câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças genéticas que possuem em comum o crescimento desordenado de células e propagação descontroladas no corpo de formas anormais das próprias células corporais que perderam a sua identidade celular (ALMEIDA et al. 2005).

A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e dependente de fenômenos genéticos e epigenéticos que culminam no surgimento de clones de células imortalizadas que adquirem a capacidade de se multiplicar autonomamente e de invadir os tecidos vizinhos (metástase). Ainda que haja particularidades para cada neoplasia, algumas características do processo são comuns aos diferentes tipos de câncer (BOGLIOLO, 2009).

O processo de carcinogênese geralmente é lento. Para que uma célula tumoral origine um tumor detectável pode durar anos. É um processo que passa por vários estágios antes de chegar a um tumor: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão. No estágio de iniciação as células sofrem ação de um agente carcinogênico, que promove modificação em alguns de seus genes. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, entretanto ainda não é possível se detectar um tumor. No estágio de promoção, a célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio (ALMEIDA et al. 2005).

No último estágio, chamado estágio de progressão, há a multiplicação descontrolada e irreversível das células geneticamente modificadas. Nesse estágio o câncer já está instalado e começam a surgir as primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA et al. 2005). Infelizmente, o

diagnóstico é feito no 3º estágio, e algumas vezes em estágio avançado da doença, reduzindo a probabilidade de cura (SARMENTO, 2016).

O câncer é considerado pela Organização Mundial de Saúde um problema de saúde pública e estimativas indicam que as mortes ocasionadas por essa doença são crescentes em todo o mundo. Para o ano 2050, são estimados 27 milhões de novos casos e 17,5 milhões de mortes pelo câncer em todo o mundo. Este problema é considerado maior em países em desenvolvimento. Estima-se que nas próximas décadas 80% dos mais de 20 milhões de novos casos de câncer estimados para 2025 estejam nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2015).

É possível observar a existência de um perfil da magnitude de determinados tipos de câncer em países em desenvolvimento que se assemelha ao perfil em países desenvolvidos, principalmente com relação aos cânceres de próstata, mama e intestino; entretanto, ainda persistem os cânceres relacionados com condições socioeconômicas menos favoráveis, como, por exemplo, o do colo do útero e o do estômago (BRASIL, 2015).

Em 2012 60% dos casos de câncer ocorreram em países em desenvolvimento. Quando se fala em mortalidade, a situação agrava-se: dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Entre os tipos de câncer mais incidentes no mundo está o câncer gástrico (CG). As taxas de incidência desse câncer variam. Japão e Coreia são responsáveis pelas maiores taxas. Cerca de dois terços dos CG ocorrem nos países em desenvolvimento, situados no Leste da Ásia, Europa Oriental, América do Sul e América Central. Já o Sul da Ásia, América do Norte, África Oriental, Austrália e Nova Zelândia são áreas de baixa incidência (CREW e NEUGUT, 2006). Uma razão para esta variação é a etiologia complexa dependente de uma combinação entre o meio ambiente, hospedeiro e fatores genéticos (PINHEIRO et al. 2015).

Em 1975, o câncer de estômago era a neoplasia mais comum no mundo, entretanto, houve uma mudança substancial e esse tipo de câncer tornou-se o quinto tumor maligno mais comum no mundo no ano de 2012. No ano supracitado houve 951.000 casos de CG com 723.000 óbitos em decorrência da doença em todo o mundo (FERLAY et al. 2015).

O declínio na prevalência ao longo das décadas foi considerado uma vitória que pode estar relacionada aos avanços tecnológicos para o diagnóstico de doenças do trato gastrointestinal, uso de antibióticos no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* e mudança na maneira de conservação de alimentos, ou seja, houve maior inserção de refrigeração dos alimentos e conseqüentemente diminuição do uso do sal como conservante (ARREGI et al. 2004). Embora a incidência de câncer gástrico esteja declinando, a taxa de mortalidade em todo o mundo continua elevada (FUCCIO et al. 2010). Em 2015, por exemplo, este tipo de câncer foi a segunda causa de morte relacionada ao câncer no mundo (PINHEIRO et al. 2015).

Em ambos os sexos, a incidência de Adenocarcinoma de estômago aumenta a partir de 35-40 anos e em intensidades diferentes, ocorrendo com mais frequência em homens (BRASIL, 2013). Estimou-se para o Brasil 12.920 casos novos de câncer de estômago em homens e 7.600 em mulheres, para o biênio 2016/2017. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,04 casos novos a cada 100 mil homens e 7,37 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Norte e Nordeste. É o quarto tipo mais frequente nas Regiões Sul e Centro-Oeste. Já na Região Sudeste, ocupa a quinta posição. Para as mulheres, é o quarto tipo de câncer mais frequente na Região Norte. Nas Regiões Sul e Nordeste, ocupa a quinta posição. Nas demais Regiões, Sudeste e Centro-Oeste, ocupa a sexta posição (BRASIL, 2013).

De acordo com as estimativas do INCA para o ano de 2016, no Estado do Pará a incidência câncer gástrico foi de 460 casos em homens para cada 100 mil habitantes. Desses, 160 casos/ 100mil habitantes se concentraram na capital. A incidência em mulheres foi de 230 casos de câncer gástrico a 100mil habitantes mulheres. Desses, 100/100mil habitantes concentraram-se na capital do Estado (BRASIL, 2015).

Visando caracterizar os cânceres de estômago do Pará, um estudo *in vitro*, estabeleceu e caracterizou citogeneticamente células tumorais de adenocarcinoma gástrico paraense, entre elas, a linhagem tumoral de adenocarcinoma gástrico primário (ACP02), que em cultura manteve

características genéticas semelhantes ao tumor que lhe deu origem, configurando modelo de estudo para carcinogênese nessa população.

A linhagem ACP02 foi classificada como tipo difuso e encenada como T3N2M0 (estadiamento). A cultura foi imortalizada *in vitro* por transformação espontânea, sendo que estas células crescem desorganizadas em monocamada, semelhante aos fibroblastos com algumas aglomerações e divisões heterogêneas (bipolar e multipolar). Possui ciclo celular de aproximadamente 30 horas com máxima confluência em 72 horas (Figura 5). As características morfológicas dessa linhagem são compatíveis com outra linhagem de adenocarcinoma gástrico, estabelecida anteriormente (ACP01; LEAL et al. 2009).



**Figura 5** - Fotomicrografia da linhagem celular ACP02 em cultivo (10x)

A linhagem ACP02 exibiu um cariótipo com várias alterações cromossômicas clonais, sendo a trissomia 8 a alteração mais frequente. Também apresentou a trissomia 7 e a deleção do braço curto do cromossomo 17p. Estas alterações cromossômicas são comumente observadas em linhagens celulares de câncer gástrico primário de indivíduos do norte do Brasil

(LEAL et al, 2009). No CG, a proliferação das células não é controlada pelos processos que normalmente regulam a divisão celular e o crescimento dos tecidos (GOMES, 2008). Sem a regulação do ciclo celular, essas células que sofreram alterações se dividem excessivamente formando aglomerados celulares que podem ser chamados de tumores ou neoplasias (RAMOS, 2012). Alterações nos proto-oncogenes podem torná-los oncogenes (RIBEIRO et al. 2003), sendo que as principais alterações ocorrem na estrutura do gene, resultando na síntese de um produto gênico anormal (oncoproteína), tendo função aberrante e regulação da expressão gênica, resultando no aumento ou produção imprópria da proteína promotora de crescimento estruturalmente normal (ROBBINS et al. 1996).

No caso do CG, após a infecção por *H. pylori* ocorre ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares em células epiteliais, tais como: proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), fator de transcrição nuclear kappa (NF- $\kappa$ B), ativador de proteína WNT/ $\alpha$ -catenina, fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3 (STAT3) e ciclooxigenase 2. Estas alterações na sinalização celular afetam o funcionamento da célula, tendo como consequência a produção elevada de citocinas inflamatórias, alteração das taxas de apoptose, proliferação e diferenciação de células epiteliais e, mais importante, resultam na transformação oncogênica de células epiteliais (DING et al. 2010; BARBOSA e SCHINONNI, 2011).

Os fatores de virulência bacteriano como a citotoxina *cagA*, a *VacA* (citotoxina vacuolar A) e as OMP (proteínas de membrana externas) são responsáveis por muitos destes efeitos (DING et al. 2010; BARBOSA e SCHINONNI, 2011). A *VacA* é uma toxina secretada que entra na membrana das células epiteliais, induz a formação de vacúolo e afeta as mitocôndrias, levando as células à apoptose (FUCCIO et al. 2010). Em síntese, *H. pylori* pode induzir alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e a modificação das histonas, que são importantes na transformação oncogênica (DING et al. 2010; BARBOSA e SCHINONNI, 2011).

Por outro lado, *cagA*, ao entrar na célula epitelial, induz sinais de proliferação e motilidade, bem como produção de citocinas. Vários mecanismos pelos quais *cagA* induz a mudanças de transformação de uma célula

hospedeira foram descritas, tais como a sua interação com a proteína SHP-2, uma tirosina fosfatase citoplasmática (MEINE, 2006). Uma vez no interior da célula, a fosforilação da proteína *cagA* leva a uma desregulação das vias da proteína SHP2, ocasionando uma desregulação das funções das células epiteliais, induzindo uma hiperproliferação celular e promovendo a transformação do seu fenótipo celular, um importante pré-requisito para uma transformação neoplásica (FUCCIO et al. 2010).

São inúmeros os fatores genéticos e epigenéticos envolvidos na carcinogênese do câncer gástrico, dentre estes destacam-se: alterações epigenéticas de hipermetilação aberrante dos genes *HAI2* *SPINT2* (DONG et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2010) e *MINT31 p16<sup>INK4a</sup>* (KIM et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2010). A perda das funções dos genes codificados pelo *locus INK4-ARF* e alterações moleculares no *INK4 / ARF* (*locus* localizado no cromossoma humano 9p21), que abrange 35 quilobases e codifica 5 genes supressores (*p16<sup>INK4A</sup>*, *p15<sup>INK4B</sup>*, *p14<sup>ARF</sup>*, *p16<sup>INK4A $\gamma$</sup>*  e *P12*), estão envolvidas na patogênese e progressão do carcinoma gástrico (PINHEIRO et al. 2015; SHERR, 2012). Pinheiro e colaboradores (2015) estudaram as principais alterações em *INK4/ARF* destacando a ativação do gene *p16<sup>INK4a</sup>* por hipermetilação, sendo esta considerada um mecanismo importante para a iniciação e o desenvolvimento de CG e, junto com a deleção do cromossomo 9p21, podem ser usados como marcador de carcinogênese nesse tipo de câncer (PINHEIRO et al. 2015).

Estudos mostram que a presença da inflamação crônica na mucosa gástrica, muitas vezes, está associada ao padrão de metilação aberrante em genes supressores tumorais (ou anti-oncogenes), que por sua vez está associado ao câncer gástrico, ou seja, a inflamação crônica aumenta a probabilidade de formação do câncer gástrico (ALMEIDA et al. 2005). Vários são os genes supressores de tumores conhecidos (SERRANO et al. 2014), sendo a perda destes genes relacionada ao desenvolvimento de tumores humanos, pois a função fisiológica destes genes é regular o crescimento da célula e impedir a formação de tumor (ROBBINS et al. 1996).

O gene supressor de tumor p53 é o alvo isolado mais comum de alterações genéticas em humanos (ROBBINS et al. 1996). Outros exemplos de genes supressores de tumores são os genes envolvidos no câncer de mama

familiar BRCA1 e BRCA2 (VENKITARAMAN, 2014) e genes envolvidos na carcinogênese de células gástricas, como o gene APC (Adenomatosa Polipose do Cólon; SMITH et al. 2006). Dentre estes genes destacam-se três supressores tumorais: gene polipose adenomatosa, p<sup>15INK4B</sup> e p<sup>16INK4A</sup> (BORGES et al. 2013). Além disso, a instabilidade genética e alterações em citocinas e fatores de crescimento contribui para a complexidade dos processos envolvidos na carcinogênese gástrica (SMITH et al. 2006).

Além dos proto-oncogenes e genes supressores de tumor, atuando normalmente no ciclo celular há uma terceira categoria de genes, que controlam a morte celular programada, chamada apoptose (GOMES, 2008). Portanto, soma-se a estes sistemas de defesa a habilidade de comunicação intercelular, capaz de detectar células vizinhas defeituosas e induzir morte celular nestas células (TUBIANA, 2008), processo que se mostra importante para a prevenção de carcinogênese.

Mesmo quando são expostas, as células iniciadas reagem ao acúmulo de danos causados por agentes químicos e físicos por, pelo menos, três mecanismos: reação contra ROS (espécies reativas de oxigênio) gerada pela injúria provocada por stress oxidativo; eliminação das células lesadas (mutadas ou instáveis), promovendo apoptose ou morte celular durante a mitose; estimulação de sistemas de reparo de DNA (GOMES, 2008).

As razões que levam os genes que regulam o ciclo celular a perderem suas funções são complexas e multifatoriais. Dentre estas razões podem-se citar predisposições genéticas hereditárias e agentes físicos, químicos e biológicos. (RIBEIRO et al. 2003). Processos oxidativos e orgânicos estão implicados nas várias etapas que conduzem ao desenvolvimento da carcinogênese, sendo que com o decorrer da idade há acúmulo de danos oxidativos nas células, declínio da atividade antioxidante (levando a mais e mais mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor) e do sistema imune e maior probabilidade de ocorrência de câncer (HEGEDUS, 2000).

No caso de câncer gástrico, além dos fatores genéticos, existem fatores ambientais que têm papel importante na etiologia desse câncer. Entre estes fatores e já relatada anteriormente, destaca-se a infecção pelo *H. pylori*, sendo que regiões com baixa prevalência da infecção por *H. pylori* tendem a ter uma

incidência relativamente baixa de câncer gástrico. O *H. pylori* é especificamente adaptado para sobreviver no ambiente hostil (pH ácido) e sua colonização resulta no desenvolvimento de gastrite em indivíduos infectados. A fixação das bactérias às células epiteliais induz uma resposta inflamatória, resultando no recrutamento de neutrófilos, linfócitos B e T, macrófagos e células plasmáticas, a maioria dos quais gera grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, implicados em danos em células epiteliais e carcinogênese (FUCCIO et al. 2010). Mas a variação na taxa de câncer gástrico não pode ser explicada inteiramente pelo *H. pylori*, visto que as populações em muitas partes da África e Índia têm uma elevada prevalência de *H. pylori*, mas baixa incidência de câncer gástrico (MARTEL et al. 2013; COVER, 2016).

Outros fatores também podem contribuir neste processo, como a ingestão ou a formação intragástrica de compostos nitrosos ou outras substâncias genotóxicas, dieta pobre em produtos de origem vegetal e dieta rica em sal, consumo de alimentos defumados ou em conserva e exposição a drogas, como tabagismo (OASHIMA et al. 1989; LYNCH et al. 1999; FUCCIO et al. 2010). Também, a idade avançada, sexo masculino, história familiar de câncer gástrico e polipose adenomatosa são fatores que podem contribuir neste processo (FUCCIO et al. 2010). Por isso, este tipo de câncer é uma condição heterogênea que representa várias doenças (SHAH e AJANI, 2010).

Além disso, independentemente da exposição a agentes, as células sofrem processos de mutação espontânea, que alteram seu desenvolvimento normal (GOMES, 2008). Mutações genéticas germinativas (hereditárias) no gene supressor tumoral CDH (gene que codifica a molécula de adesão Caderina-E) foram encontradas em famílias brasileiras com histórico de CGDH (Câncer Gástrico Difuso Hereditário; MOREIRA-NUNES et al. 2014).

O tipo de CG mais comum (mais de 90% dos casos) é o adenocarcinoma, sendo o termo câncer gástrico utilizado como seu sinônimo (BRASIL, 2013). Esse câncer é classificado de acordo com o local de origem do tumor e a aparência patológica da lesão. Lauren (1965) compôs uma classificação histológica, que é amplamente aplicada. De acordo com esta classificação os adenocarcinomas gástricos são divididas em dois tipos: intestinais ou difusos (LAUREN, 1965).

Tumores gástricos do tipo intestinais são compostos de células malignas que são unidos para formar estruturas semelhantes a glândulas funcionais do trato gastrointestinal. O tipo de tumor difuso é o menos comum e compreende células que carecem de coesão e já não são capazes de função gástrica (LAUREN, 1965). O tumor tipo difuso apresenta-se com padrão infiltrativo, com extensão submucosa e metástases precoces, acomete mais mulheres em idade jovem e de tipo sanguíneo A e está associado ao pior prognóstico pela sua disseminação intra e transmural. O tipo intestinal apresenta-se como um tumor mais diferenciado, acomete mais homens, em especial idosos, e evolui principalmente de lesões pré-malignas (BRASIL, 2013).

Geralmente os tumores intestinais progridem através de uma série de passos sequenciais. Estes passos começam com gastrite, que progride para atrofia das mucosas (gastrite atrófica), seguido por metaplasia intestinal, displasia e carcinoma com posterior disseminação metastática. O câncer gástrico tipo difuso também está associado com infecção por *H. pylori*, porém, ainda não foi demonstrada associação deste com gastrite atrófica (SMITH et al. 2006).

A classificação de Lauren (1965) é amplamente e rotineiramente usada por patologistas, epidemiologistas e clínicos para a avaliação de adenocarcinoma gástrico, particularmente com respeito à sua incidência e etiologia, embora tenha valor limitado em relação às decisões terapêuticas (YAKIREVICH e RESNICK, 2013). Infelizmente, a classificação histológica individual do adenocarcinoma gástrico não é clara e o tumor frequentemente é uma mistura de tipos de tecido intestinal e difuso (SMITH et al. 2006).

Não há uma padronização para o diagnóstico, estadiamento e tratamento do CG no Brasil. Devido à extensão do país, às diferenças de recursos disponíveis de assistência médica e à escassez de profissionais treinados, a sobrevivência dos doentes é muito baixa (ZILBERSTEIN et al. 2013). Para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos indivíduos com adenocarcinoma do estômago no Brasil utiliza-se as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas - Adenocarcinoma de Estômago (BRASIL, 2013).

O CG tem seu prognóstico e tratamento definidos pela localização e estadiamento do tumor e pelo número de linfonodos ressecados e acometidos. O diagnóstico é feito geralmente a partir de uma queixa clínica relacionada a

sintomas do trato digestivo alto (plenitude gástrica, sangramento digestivo alto ou baixo, náusea e vômito) ou a sintomas constitucionais (perda de peso, anorexia e astenia). A anamnese e o exame físico nortearão a investigação diagnóstica subsequente. É importante observar que o diagnóstico clínico do CG é difícil, porque não há sintomas patognomônicos. Além disso, pode cursar assintomático, inclusive na sua fase mais avançada, já com metástases, dificultando o tratamento (BRASIL, 2013).

O tratamento é multidisciplinar e envolve cirurgia, RT (radioterapia) e quimioterapia, na tentativa de modificar a história natural da doença. O momento em que cada uma das opções terapêuticas será instituída, combinadas ou não, e a sequência dos tratamentos, são alvo de estudos há décadas. Variações de técnicas cirúrgicas e radioterápicas, agentes quimioterápicos e combinações desses agentes e características populacionais tornam difícil a comparação entre os resultados dos estudos. O tratamento mais efetivo ainda não foi estabelecido e a decisão de como tratar deve ser definida levando-se em consideração a experiência e os recursos humanos e tecnológicos da instituição ou a preferência do paciente e de seu médico. O câncer de estômago deve ter um tratamento cirúrgico sempre que possível (BRASIL, 2013). A quimioterapia tem sido empregada como neoadjuvante ou adjuvante no tratamento. Atualmente, preconiza-se, além da ressecção do tumor, o emprego de quimioterápicos em tumores T3/T4 ou N1/N2/N3 (SANTOS et al. 2015).

No caso de recidiva, a quimioterapia com medicamentos não utilizados na primeira linha em monoterapia ou combinados podem ser indicados. A radioterapia ou quimioterapia têm duração específica e devem ser interrompidas no caso de sinais clínicos, laboratoriais ou de imagem que indiquem progressão da doença ou na presença de efeitos colaterais que comprometam a efetividade do tratamento. Nessa última situação, o tratamento alternativo menos tóxico deve ser o proposto (OKINES et al. 2010), se indicado (BRASIL, 2013).

O tratamento do adenocarcinoma gástrico no Ocidente pode ser considerado, de uma maneira geral, como paliativo, visto que as recidivas são o seguimento mais provável e a sobrevida em cinco anos atinge em média somente 20% dos casos, computando-se todos os estágios em conjunto

(SOUZA et al. 2011). Nenhum esquema exclusivo de quimioterapia foi definido como mais benéfico em estudos de metanálise (JEUNG et al. 2009; BRASIL, 2013) e a tolerância do tratamento pelo paciente deve ser avaliada de acordo com o estado do paciente. A maioria dos esquemas envolve fluorouracila (FU) e seus similares (BRASIL, 2013). O FU foi o agente quimioterápico mais extensivamente estudado para câncer gástrico metastático. Comparando quimioterapia combinada com dois medicamentos à terapia com um único agente, houve sobrevida a favor de regimes de combinação (WAGNER et al. 2006).

Nos pacientes com ressecção do tumor com linfonodos comprometidos tem sido recomendada a quimioterapia com FU e ácido folínico associado a RT, esquema que aumenta a sobrevida e diminui o índice de recorrência. Nos tumores localmente avançados e irressecáveis (não podem ser completamente removidos) a quimioterapia sistêmica (semelhante à indicada para tumores metastáticos), poderia aumentar os índices de ressecabilidade. Nos pacientes com tumor considerado irressecável, FU e cisplatina tem sido a combinação mais frequentemente utilizada, porém, a sobrevida em média é de apenas nove meses (MINCIS e MINCIS, 2008).

Em pacientes com diversos graus de comprometimento, a quimioterapia perioperatória com o esquema de medicamentos: epirrubicina, cisplatina e fluorouracila infusional (ECF) mostrou benefício na sobrevida dos pacientes (CUNNINGHAM et al. 2006). Um estudo de revisão sistemática e metanálise realizado por Wagner e colaboradores (2006) para avaliar a eficácia e tolerabilidade da quimioterapia em pacientes com câncer gástrico avançado demonstrou que os melhores resultados de sobrevivência são atingidos com esquemas de três drogas contendo FU, uma antraciclina, e cisplatina. Entre estes, os regimes incluindo FU em bolus, numa combinação de quatro drogas: epirrubicina, cisplatina, leucovorin e FU – em bolus (PELF) exibiram uma taxa mais elevada de mortes por reação tóxica comparado com os regimes utilizando uma infusão contínua de FU, tais como epirrubicina, cisplatina, e FU-de infusão contínua, sugerindo aumento da toxicidade para o PELF.

O principal tratamento do adenocarcinoma gástrico é a ressecção do tumor, seja ela cirúrgica ou endoscópica (MINCIS e MINCIS, 2008) e a associação do tratamento adjuvante à cirurgia é responsável pelo aumento da

sobrevida dos pacientes, relatado em vários trabalhos (CUNNINGHAM et al. 2006; SOUZA et al. 2011) mostrando que a terapêutica com antineoplásicos está entre as medidas mais adotadas.

Alguns agentes quimioterápicos, além de interromper o metabolismo celular, são capazes de induzir alquilação do DNA, bem como reestabelecer o processo de apoptose (TAKEI et al. 2005). Fármacos anticarcinogênicos podem atuar por diferentes mecanismos, impedindo a capacidade proliferativa celular. Estas podem atuar em elementos do citoesqueleto, prejudicando a divisão celular, promover citotoxicidade capaz de destruir a célula por necrose ou apoptose (MARSH e LIU, 2009; NOBILI et al. 2009; ROSALES-HERNANDEZ et al. 2009).

Os medicamentos usados no tratamento do carcinoma gástrico atuam por diferentes mecanismos de ação e alguns culminam na indução de apoptose. A FU atua tanto no DNA quanto no RNA, atuando como antimetabólito, inibindo a biossíntese do DNA e RNA. *In vivo*, a FU é convertida no metabolito ativo 5-fluorodexoiuridina-monofosfato. Esse metabolito interage com a enzima timidilato sintetase provocando a supressão da timidina trifosfato (TTP; um dos quatro nucleótidos trifosfatos utilizados na síntese de DNA) e, assim, impede a síntese do DNA. Além disso, a 5-FU inibe o processamento do ácido ribonucleico (RNA) e se incorpora no DNA, no local em que há a supressão do TTP. Outros metabolitos do FU incorporam-se tanto ao RNA como ao DNA (NCI<sup>1</sup>, 2017). A FU demonstrou indução de apoptose *in vitro* em linhagens de células de câncer do colo retal (MHADAT et al. 2014), células de câncer oral (TONG et al. 2000) e linhagens tumorais de células gástricas (OSAKI et al. 1997).

A cisplatina exerce as suas propriedades citotóxicas por reação com o DNA, que eventualmente culmina com apoptose irreversível (TANIDA et al. 2012). Depois de sofrer hidrólise, a Cisplatina reage com o DNA para produzir ligações intra e intercadeias. A citotoxicidade da cisplatina se correlaciona com a parada celular na fase G2 do ciclo celular com inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose (PUBCHEM<sup>1</sup>, 2017).

Outro fármaco que induz morte celular por apoptose é a epirubicina (LO et al. 2008). Este fármaco atua interagindo com o DNA por diferentes mecanismos: intercalação, quebra da cadeia de DNA e inibição da enzima

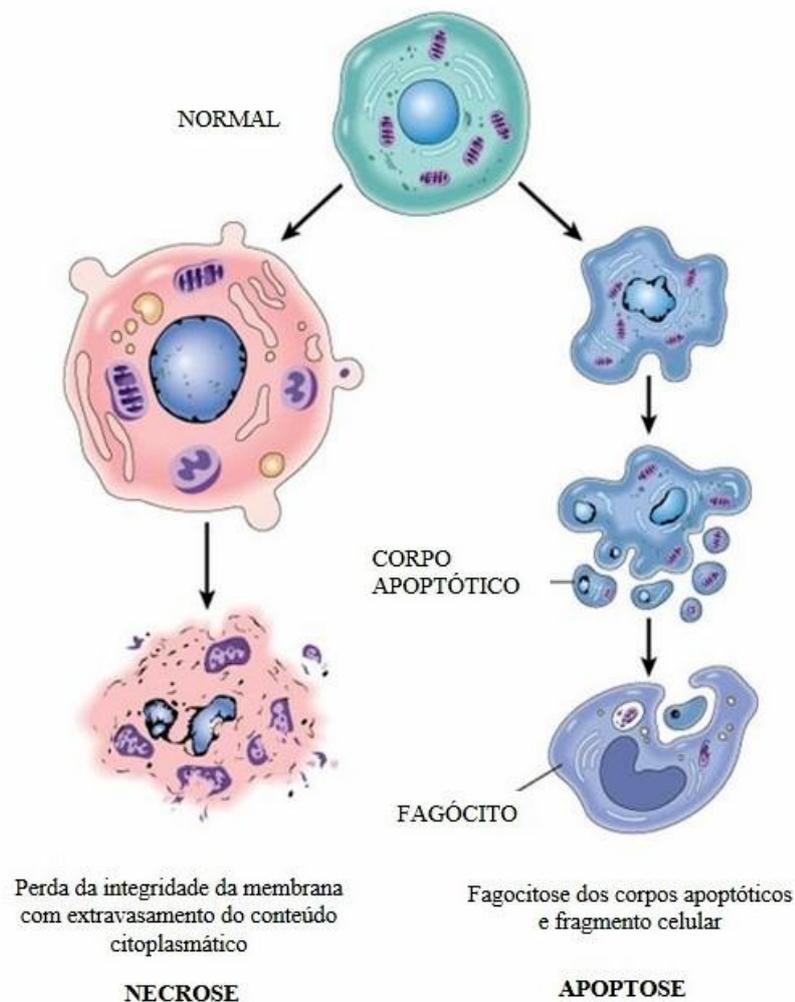
topoisomerase II (PUBCHEM<sup>2</sup>, 2017). Em estudo com células de adenocarcinoma de colón e intestino de rato, houve um aumento da indução de apoptose quando associado epirrubicina ao ácido glicólico (agente gastrointestinal que estimula o fluxo de bile para o duodeno ou estimula a produção de bile pelo fígado). O ácido glicólico aumentou a citotoxicidade da epirrubicina intensificando a apoptose induzida por epirrubicina (LO et al. 2008).

Agentes quimioterápicos como capecitabina, oxaliplatina, docetaxel, irinotecan, S-1 (uma fluoropirimidina) também são usados no tratamento do CG (AJANI et al. 2007; SCHUBERT, 2007; LORDICK et al. 2010). Desses agentes, o alcaloide irinotecano atua induzindo apoptose celular, este é convertido no metabólico 7-etil-10-hidroxi-camptotecina por uma enzima conversora de carboxilesterase, que inibe a atividade da topoisomerase I (TOP 1) estabilizando o complexo TOP 1 – DNA, resultando em rupturas de DNA que inibem a replicação sua replicação e provocam a morte celular apoptótica (NCI<sup>2</sup>, 2017).

A morte celular por apoptose é um fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam em sua morte (BOGLIOLO, 2009). Pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular chamados receptores da morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Estas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que possuem papel fundamental no processo de morte celular (PAROLIN e REASON, 2001).

Morfologicamente, a célula em apoptose se encolhe e o citoplasma fica mais denso; a cromatina torna-se condensada e disposta em grumos acoplados à membrana nuclear (BOGLIOLO, 2009). Há a compactação das organelas citoplasmáticas (BOHM e SCHILD, 2003) retração, condensação da cromatina, cariorrexe e o eventual brotamento da membrana plasmática (KERR et al. 1972). O brotamento termina com a fragmentação da célula em numerosos brotos, que passam a constituir os corpos apoptóticos (KERR et al. 1972; BOGLIOLO, 2009). Em seguida os corpos apoptóticos são fagocitados

por macrófagos ou por células vizinhas (BÖHM E SCHILD, 2003; KERR et al. 1972; Figura 6).



**Figura 6** - características morfológicas de células necróticas e apoptóticas  
**Fonte:** Adaptado de Grivicich et al. 2007

As alterações morfológicas são muito importantes para a diferenciação da morte celular por apoptose e outro tipo de morte celular clássica, chamada necrose. Na necrose as células incham e se rompem, liberando o material citoplasmático e atraindo leucócitos para a região, o que caracteriza uma resposta inflamatória. Também se destaca o fato de que a necrose, causada por injúria, resulta na morte de grupos de células, contrastando com a apoptose

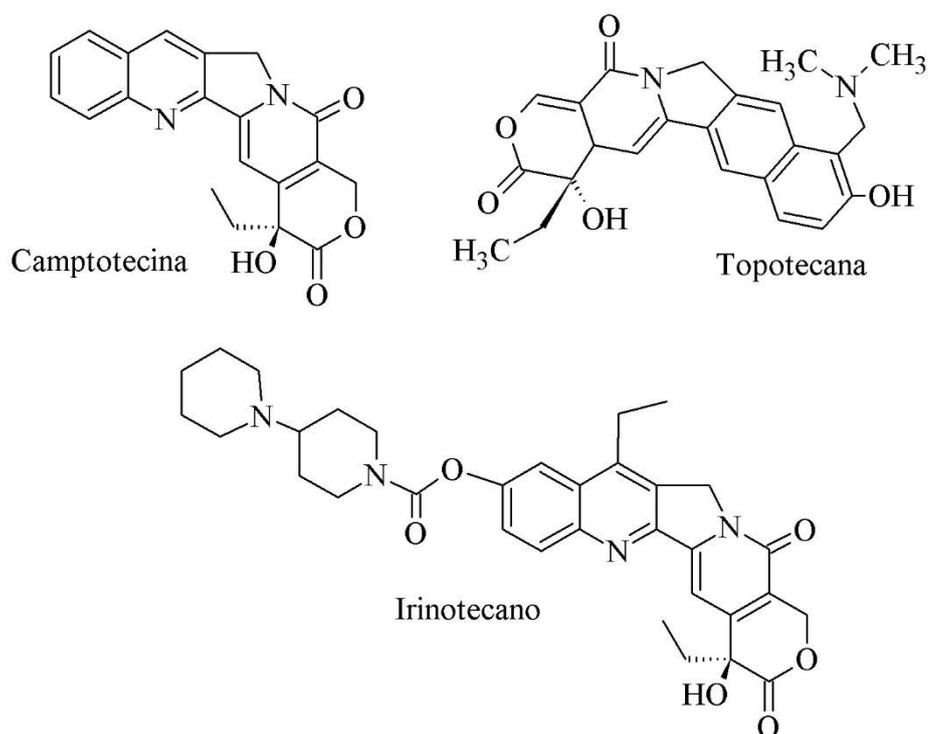
que acomete morte de células individuais (Figura 6; ZIEGLER E GROSCURTH, 2004).

As células malignas possuem capacidade de reduzir a resposta frente a agentes indutores de apoptose, sendo que esta redução pode envolver a inativação do caminho pró-apoptótico ou ativação do caminho anti-apoptótico resultando na falha resposta (HANAHAN e WEINBERG, 2000; MORRISON et al. 2008). Diferentes mecanismos de resistência têm sido descritos para as células tumorais, sendo a consequência desta resistência a falha terapêutica. Logo, buscar novos fármacos que atuem em células tumorais resistentes a múltiplas drogas é extremamente urgente, em especial para câncer de pior prognóstico como por exemplo câncer gástrico difuso.

As plantas medicinais são consideradas promissoras como fonte de novos fármacos antitumorais, ou seus compostos podem ser usadas como protótipos para a obtenção de novos fármacos (BRANDÃO et al. 2010). Dentre os compostos de origem natural, promissores como antitumoral, destacam-se os alcaloides, sendo sua atividade relacionada a inibição mitose, da desmontagem de microtúbulos e estabilização do complexo TOP 1 –DNA (MARQUES e LOPES, 2015). Atualmente, existem alcaloides utilizados para o tratamento do câncer, como: vimblastina, vincristina, elipticina e camptotecina (ÁVILA et al. 2006; VIEGAS et al. 2006; SERTEL et al. 2011; MOLLICA et al. 2012; KIM et al. 2015 MARQUES e LOPES, 2015).

A camptotecina (Figura 7) foi isolada de *Camptotheca acuminata Decne* (família Cornaceae). Apesar de apresentar resultados promissores em estudos pré-clínicos (LIN et al. 2014), apresentou baixa atividade anticancerígena e toxicidade renal em ensaios clínicos, sendo necessário alterações estruturais que levem a obtenção do irinotecano e topotecano (Figura 7), agentes que atuam inibindo a TOP1

Estes agentes foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer de cólon, sendo mais tarde usado também para câncer de pulmão e ovário (KIM et al. 2015).



**Figura 7-** Estrutura química da Camptotecina e seus derivados.

Os alcaloides antineoplásicos obtidos da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (família Apocynaceae) chamados alcaloides da *vinca* (Figura 1): vimblastina e vincristina são usados atualmente no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e também, leucemia linfoblástica aguda infantil (VIEGAS et al. 2006).

Outro alcaloide da família Apocynaceae com atividade anticâncer é a elipticina, que já foi obtida das espécies *Ochrosia elliptica* e *Blekeeria vitensis*. A atividade antineoplásica da elipticina seu derivado, o eliptinum (9-metoxielipticina) já foi relatada em células de leucemia L1210, P388 e P1534, células X5563 de mieloma e células de linfossarcoma de Gardner (BLASKÓ e CORDELL, 1988; MANS et al. 2000). Estudos demonstram que a elipticina e derivados, principalmente eliptinium, são particularmente ativos em células MCF-7 de câncer de mama (KUO et al. 2005). Entretanto, apresentam como efeito adverso xerostomia, associada com perda de peso e toxicidade renal (DADOUN e CRAGUENEZ-VIOTTE, 1990; TOPCU, 2001).

As elipticinas podem atuar por diferentes mecanismos de ação, tais como intercalação do DNA e inibição da TOP 2. Também podem interromper o ciclo celular por regulação da expressão de algumas quinases, tais como ciclina B1 e Cdc2. Além disso, podem agir através da fosforilação da ciclina Cdc2, induzindo a apoptose e favorecendo geração de radicais livres citotóxicos (TOPCU, 2001)

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes de compostos químicos úteis para a medicina (DI STASI e HIRUMA LIMA, 2002). Ela é caracterizada, em termos de metabolismo secundário, pela produção de alcaloides indólicos (semelhante a elipticina), bisindólicos (semelhante a vimblastina e vincristina) e beta-carbolínico (RAPOPORT et al. 1957; BOLZANI et al. 1987; STEELE et al. 2002; PEREIRA et al. 2007), porém a maioria das espécies carecem de estudos para a atividade antitumoral.

Dentre as espécies pertencentes a esta família destaca-se a *Geissospermum sericeum*, sendo considerada uma das 10 espécies mais importantes da Amazônia em termos medicinais (OLIVEIRA et al. 2003). Estudo fitoquímico realizado com esta espécie isolou os seguintes alcaloides: geissoschizolina, geissoschizolina N<sup>4</sup> – óxido e 1,2-deidrogeissoschizolina e flavopereirina (Figura 4; STEELE et al. 2002).

Em virtude do uso popular para o tratamento da malária (BRANDÃO et al. 1992; JÁCOME et al. 2003; MILLIKEN, 1997; CAMARGO, 2012) e a vasta bibliografia do potencial antimalárico dos alcaloides, os primeiros estudos biológicos realizados com esta espécie avaliaram a atividade antimalárica. Steele e colaboradores (2002) realizaram estudo para avaliar atividade antiplasmódica em cepas resistentes (K1) e sensíveis à cloroquina (T9-96), testando os compostos isolados de *G. sericeum*: geissoschizolina, geissoschizolina N<sup>4</sup> – óxido e 1,2-diidrogeissoschizolina e flavopereirina. Dos quatro compostos de teste, o alcaloide β-carbolínico flavopereirina teve a atividade mais antiplasmódica contra cepas K1 e T9-96 de *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub>) 11,53 e 1,83μM, respectivamente, sendo o mais ativo para a atividade antimalárica e também foi o mais ativo no ensaio de citotoxicidade.

Um estudo avaliou a atividade antileishmania da espécie *G. sericeum* usando formas promastigotas da espécie de *Leishmania amazonenses* tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico, frações obtidas a

partir do extrato etanólico, subfrações e alcaloides indólico (F3F6FAGS) e  $\beta$ -carbolínico (flavopereirina) obtidas das cascas de *G. sericeum*. Todas as amostras foram ativas e o fracionamento aumentou a atividade. As frações mais promissoras de *G. sericeum* foram a fração diclorometano (3,92  $\mu\text{g/mL}$ ; 24h; 28,62  $\mu\text{g/mL}$ - 72h) e fração alcaloídica (4,22  $\mu\text{g/mL}$  – 24h; 0,99  $\mu\text{g/mL}$  – 72h). Para o autor, essas são as frações de *G. sericeum*, que devem possuir maiores teores de alcaloides (SILVA-SILVA, 2016).

No estudo de Silva-Silva (2016) o alcaloide indólico F3F6FAGS apresentou menor atividade inibitória sobre a forma promastigota (24h 78,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 48h 52,07  $\mu\text{g/mL}$ ; 72h 43,53  $\mu\text{g/mL}$ ). O autor sugere que o alcaloide indólico não seja o constituinte envolvido na atividade antipromastigota. E que o alcaloide responsável pela atividade antipromastigota de *G. sericeum* seja a flavopereirina (24h 0,23  $\mu\text{g/mL}$ ; 48 h 2,34  $\mu\text{g/mL}$ ; 72h 0,15  $\mu\text{g/mL}$ ) com atividade superior ao controle positivo anfotericina B (24h 0,42  $\mu\text{g/mL}$ ; 48h 1,79  $\mu\text{g/mL}$ ; 72 h 0,35  $\mu\text{g/mL}$ ; SILVA-SILVA, 2016).

Nenhum estudo, até o presente, havia avaliado a atividade antitumoral de *G. sericeum*. No entanto, formulação contendo os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos flavopereirina e alstonina de *Rauwolfia vomitoria* inibiu o câncer de próstata por indução de apoptose através da desestabilização do DNA das células neoplásicas, de maneira seletiva para estas células. Alega-se que este medicamento natural, reduz os níveis de antígeno prostático específico, um importante marcador metabólico para esse tipo de câncer (HALL e BELJANSKI, 2005). Este resultado leva algumas reflexões: o extrato de *G. sericeum*, suas frações e outros alcaloides possuem atividade antitumoral em outros tipos de câncer? Ou a atividade está limitada ao câncer de próstata? No caso de ativo em outras linhagens tumorais, o mecanismo responsável pela atividade é a indução de apoptose?

Poucos estudos de *G. sericeum* avaliaram a atividade citotóxica da espécie e de seus alcaloides. O alcaloide geissoschizolina e seus derivados (geissoschizolina N<sup>4</sup> - óxido e 1,2-diidrogeissoschizolina) tiveram CC<sub>50</sub> > 40  $\mu\text{g/mL}$  e o alcaloide flavopereirina CC<sub>50</sub> 10,7  $\mu\text{g/mL}$ , considerado muito ativo (STEELE et al. 2002).

A citotoxicidade do extrato etanólico, frações obtidas a partir do extrato etanólico, subfrações e alcaloides indólico (F3F6FAGS) e  $\beta$ -carbolínico

(flavopereirina) obtidos das cascas de *G. sericeum* foi avaliada em células de leucemia THP-1 diferenciadas em macrófagos. As frações obtidas por extração sob refluxo (fração hexânica, fração diclorometano, fração de acetato de etila e fração metanólica) foram menos citotóxicas que as frações obtidas por partição ácido-base (fração de neutros e fração de alcaloides). A fração de alcaloides de *G. sericeum* apresentou uma citotoxicidade significativa ( $CC_{50}$  57,59  $\mu\text{g/mL}$ ). A flavopereirina (24h  $CC_{50}$  255  $\mu\text{g/mL}$ ; 48h  $CC_{50}$  533  $\mu\text{g/mL}$ ; 72h  $CC_{50}$  734  $\mu\text{g/mL}$ ) e o alcaloide indólico F3F6FAGS (24h  $CC_{50}$  232  $\mu\text{g/mL}$ ; 48h  $CC_{50}$  420  $\mu\text{g/mL}$ ; 72h  $CC_{50}$  455  $\mu\text{g/mL}$ ) mostraram-se pouco tóxicos para as células THP-1. O aumento do tempo de exposição reduziu a citotoxicidade (SILVA-SILVA, 2016).

No gênero *Geissospermum* a espécie mais estudada é a *G. vellosii* com a maioria dos estudos biológicos voltados à atividade antimalárica (BERTANI et al. 2005; BRANDÃO, 2012; MUÑOZ et al. 2000; SANTOS e VOLPATO, 2015; MBEUNKUI et al. 2012), entretanto, a atividade antitumoral dessa espécie já foi estudada em linhagens de câncer de próstata e câncer de ovário (BEMIS et al. 2009; CHANG et al. 2014; YU e CHEN, 2014) e células de leucemia THP-1 (SILVA-SILVA, 2016).

Para avaliar a atividade antimalárica, foi realizado estudo *in vivo* onde o extrato etanólico de *Geissospermum vellosii* na concentração de 22,5 mg/kg, inibiu o crescimento do clone de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (cepas W2) em 35% (BERTANI et al. 2005). Outro estudo avaliou a atividade *in vitro* e este extrato mostrou-se promissor como antimalárico, tendo  $CI_{50}$ = 11  $\mu\text{g/mL}$  (clone W2),  $CI_{50}$ = 3,1  $\mu\text{g/mL}$  (clone F32) e  $CI_{50}$ = 2,0  $\mu\text{g/mL}$  (clone Indochina; BRANDÃO, 2012). No estudo de Brandão (2012), O extrato etanólico de *G. vellosii* foi submetido a partição ácido-base, obtendo-se fração de neutros e fração alcaloídica. As frações foram ativas em clone W2 de *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50}$ = 8,87  $\mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50}$ = 2,63  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

Em estudo realizado com camundongos infectados com *Plasmodium berghei* (dose 100mg/kg), o extrato etanólico de *G. vellosii* não reduziu a parasitemia e por isso foi considerado inativo (MUÑOZ et al. 2000). Quando se utilizou doses maiores do extrato (125, 250 e 500 mg/kg de peso do animal, 3 dias de tratamento), no quinto dia não houve redução significativa na parasitemia. No entanto, no oitavo dia, constatou-se redução parasitária, com

53%, 61% e 75%, respectivamente, considerando-se potencialmente ativos frente ao *P. berghei*, não sendo considerada tóxica (SANTOS e VOLPATO, 2015). A atividade antiplasmódica (clone de *P. falciparum* sensível a cloroquina D10) do extrato metanólico de *G. vellosii* foi avaliada, sendo este muito ativo ( $CI_{50}$ = 2,22  $\mu$ g/mL; MBEUNKUI et al. 2012).

Os estudos supracitados também visaram identificar a(s) substância(s) responsável(eis) pela atividade. Foram isolados alcaloides dos extratos (etanólico e metanólico) e estes foram avaliados em clones de *P. falciparum*, sendo obtidas as seguintes  $CI_{50}$ : diidroflavopereirina (derivado de flavopereirina;  $CI_{50}$ = 3,02  $\mu$ M (MUÑOZ et al. 2000) geissolosimina ( $CI_{50}$ = 0,66  $\mu$ g/mL), geissospermina ( $CI_{50}$ = 0,65  $\mu$ g/mL), geissoschizolina ( $CI_{50}$ = 0,89  $\mu$ g/mL), geissoschizona ( $CI_{50}$ = 1,78  $\mu$ g/mL) e vellosiminol ( $CI_{50}$ = 1,04  $\mu$ g/mL; MBEUNKUI et al. 2012). Os autores relacionaram a atividade antiplasmódica de *G. vellosii* aos alcaloides.

A atividade antitumoral *in vivo*, contra o a linhagem celular LNCaP (câncer da próstata humano), do extrato obtido das cascas de *G. vellosii* enriquecido com alcaloides  $\beta$ -carbolínico (não especificados no estudo) foi avaliada. O extrato inibiu fortemente o crescimento de células LNCaP de maneira dose-dependente e demonstrou indução de apoptose (BEMIS et al. 2009). A hipótese dos autores é que extrato enriquecido com alcaloide  $\beta$ -carbolínico possui efeito anticancerígeno sobre células de câncer de próstata metastático. O extrato inibiu o crescimento celular e induziu apoptose, parcialmente através da inibição da ativação de fator nuclear kappa B (NF-kB; que induz proliferação celular desordenada de células prostáticas) em células de câncer de próstata (CHANG et al. 2014).

Outro estudo realizado também avaliou câncer de próstata utilizando o extrato obtido das cascas de *G. vellosii* enriquecido com alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (não especificados no estudo). *In vitro*, o extrato inibiu significativamente o crescimento celular na linhagem LNCaP, sendo observado inibição significativa do crescimento tumoral nas concentrações de 100 ou 500  $\mu$ g/mL e a inibição ocorre dependente da concentração. O extrato também induziu apoptose nessas células. O extrato foi avaliado *in vivo*, utilizando camundongos nudes. Os resultados demonstraram redução significativa do

crescimento tumoral nas doses de 10 (80%) e 20 mg/kg (75%; BEMIS et al. 2009).

O extrato hidroalcoólico obtido de cascas de *G. vellosi* inibiram, de forma tempo dependente, o crescimento de diferentes linhagens celulares de câncer de ovário ( $CI_{50}$ = 180-235  $\mu$ g/mL). Semelhante aos estudos anteriores, parece que a morte celular está relacionada apoptose, sendo que o aumento do tempo de exposição das células elevou a taxa de apoptose, ambos de forma dependente da dose e do tempo (YU e CHEN, 2014).

O extrato etanólico, frações obtidas a partir do extrato, subfrações e alcaloides indólico (F3F6FAGV) e  $\beta$ -carbolínico (flavopereirina) obtido das cascas de *G. vellosii* foram submetidos à avaliação de citotoxicidade. As frações obtidas por extração sob refluxo (fração de hexânica, fração diclorometano, fração de acetato de etila e fração metanólica) foram mais citotóxicas que as frações obtidas por partição ácido-base (fração de neutros e fração de alcaloides) em células de hepatoma humano (HepG2). O extrato etanólico e as frações obtidas por partição ácido-base, a subfração F6 da fração de alcaloides, a flavopereirina e o alcaloide indólico foram consideradas moderadamente citotóxicas em células THP -1. Os alcaloides não foram testados em HepG2 (SILVA-SILVA, 2016). O presente estudo irá avaliar a atividade do alcaloide indólico isolado no estudo de Silva-Silva (2016).

O estudo de Silva-Silva (2016) analisou as espécies *G. sericeum* e *G. vellosii*. Foi observado que essas espécies possuem composição química muito semelhantes. As frações obtidas por partição pelo pH foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD), sendo detectada, possivelmente, a presença de alcaloides nas duas espécies. A fração de alcaloides das espécies foram escolhidas para novo fracionamento. Das subfrações geradas, foram isolados os alcaloides. As subfrações (F3F6FAGV e F4F6FAGS) obtidas a partir da fração de alcaloides de *G. vellosii* e subfrações (F3F6FAGS e F7F6FAGS) obtidas a partir da fração de alcaloides de *G. sericeum* foram submetidas a análise cromatográfica e espectrométrica: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) semipreparativo, Cromatografia Líquida acoplada a Espectro de Massa (LC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Dessa maneira, foi observado que as subfrações F3F6FAGV e F3FAGS correspondem as mesmas

substâncias, um alcaloide indólico ainda não descrito na literatura. As subfrações F4F6FAGV e F7F6FAGS tratam-se da mesma substância, o alcaloide  $\beta$ -carbolínico (flavopereirina), confirmando a semelhança química entre as duas espécies. Para a atividade antileishmania também houve semelhança na resposta das duas espécies. Todas foram consideradas ativas; (Tabela 01; SILVA-SILVA, 2016).

**Tabela 1-** Atividade Antileishmania de *G. sericeum* e *G. vellosii*

Amostra	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<i>G. sericeum</i>	<i>G. vellosii</i>
Extrato etanólico	3,92	13,59
Fração hexânica	60,91	84,30
Fração diclorometano	3,92	5,55
Fração de acetato de etila	8,55	12,32
Fração metanólica	5,00	1,70
Fração de neutros	22,91	34,59
Fração de alcaloides	4,22	6,22

Fonte: SILVA-SILVA, 2016

No nosso trabalho, a análise de *G. sericeum* se baseia na semelhança entre essas duas espécies, uma vez que a atividade antitumoral do extrato, frações, subfrações e alcaloide indólico isolado por Silva-Silva (2016) podem se comportar de maneira semelhante à atividade antileishmania quando for submetida à avaliação da atividade antitumoral de células gástricas, assim como a espécie *G. sericeum* pode ter atividade antitumoral semelhante à atividade de *G. vellosii*, que já foi identificada em outros tipos de câncer, como ovário e próstata, pois essa atividade foi associada aos alcaloides presentes nessa espécie (BEMIS et al. 2009; CHANG et al. 2014; YU e CHEN, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a seletividade do extrato, frações, subfrações e alcaloide isolado de *G. sericeum* em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração do extrato, frações, subfrações e alcaloide isolado de *G. sericeum* que inibe 50% da proliferação da linhagem tumoral gástrica ACP02;
- Determinar a concentração citotóxica 50% do extrato, frações, subfrações e alcaloide isolado de *G. sericeum* em linhagens celulares HepG2 e VERO;
- Avaliar se o fracionamento interfere na atividade antitumoral, citotoxicidade e seletividade do extrato, frações, subfrações e alcaloide isolado de *G. sericeum*;
- Investigar se o mecanismo envolvido na atividade antitumoral de *G. sericeum* está relacionado à indução de apoptose celular.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento – Quimis;
- Autoclave – Phoenix;
- Balança analítica – Bio precisa, modelo FA2104 Eletronic Balance;
- Banho-maria – Novatécnica Equipamentos para Laboratório;
- Banho de ultrasson – Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Brason;
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada – Improved;
- Capela – Quimis;
- Centrífuga refrigerada – Cientec Equipamentos para Laboratório, modelo CT-600R;
- Coluna cromatográfica;
- Contador manual de células - DIGETIMER;
- Deionizador – Banstead, modelo EasyPure II
- Dessecador de vidro;
- Equipamento de Fluxo Unidirecional –COMPACT BIOLOGIC 130
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) – Byosistens com Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA, modelo HF212 UV;
- Leitor de Microplacas – Molecular Devices, Synergy HT
- Estufa – Medicate Produtos Médicos, modelo Md 12;
- Evaporador rotatório, Fisatom;
- Incubadora CO<sub>2</sub> – Thermo scientific – modelo Series 8000WJ;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100µL e de 100-1000µL – Paguepet;
- Microscópio Óptico Eclipse, modelo E200-NIKON;
- Microscópio Optico Invertido Microscópio invertido – NIKON ECLIPSE TS 100
- Microscópio de Fluorescência OLYMPUS BX 41- FL- III

- Microscópio EVOS XL CORE
- Phmetro de bancada – Quimis Q400RS;
- Sistema de Filtração a vácuo 250mL, membrana 0,22µm – TPP – Switzerland.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-DAD), modalidade analítica, equipado com injetor automático, mod. 2695; detector de arranjos de diodos (DAD) - Waters®.

#### 4.1.2 MATERIAL DE CONSUMO

##### 4.1.2.1 Solventes e reagentes

- Acetato de etila, Ácido acético, Ácido clorídrico, Ácido fórmico, Ácido fosfórico, Ácido sulfúrico, Clorofórmio, Diclorometano, Éter etílico, Hidróxido de amônio, Metanol (Isofar®);
- Acetonitrila grau CLAE, Metanol grau CLAE (Tedia Company®);
- Água deionizada (Sistema Milli-Qplus);
- Álcool grau 96° (Álcool Etílico hidratado) – Santa Cruz LTDA
- Clorofórmio-D4 deuterado (Merck®);
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Sigma Aldrich.

##### 4.1.2.2 Material para meio de cultura e outros

- Bicarbonato de sódio - Sigma Aldrich;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, 500 mg) - Sigma-Aldrich
- Corante Azul de Tripán solução (0,4% P/ V 100mL) – Sigma Aldrich;
- Estreptomicina – Sigma Aldrich;

- Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) com glutamina e 25 MM HEPES, isento de bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich;
- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolium 500mg – Sigma Aldrich;
- Penicilina G – Sigma Aldrich;
- Solução tampão HEPES (*4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid*) – Sigma Aldrich;
- Solução tampão fosfato-salino PBS (phosphate buffered saline)
- Soro fetal bovino– Gibco;
- Tripsina – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA; 1X) – Gibco.

#### 4.1.2.3 Fases estacionárias

- Coluna de fase reversa RP 18 (5  $\mu$ M) 12,5 cm LiChrocart 125-4 (Meck Millipore®);
- Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) para coluna cromatográfica (Merck);
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash (Merck);
- Sephadex LH-20;

#### 4.1.2.4 Material plástico, de metal e de vidro

- Cubeta de quartzo;
- Garrafas de cultura de células 75cm<sup>2</sup> – TPP – Switzerland;
- Garrafas de cultura de células 25cm<sup>2</sup> – SPL Life Sciences;
- Placas de cultura de células de 96 poços – TPP.

#### 4.1.2.5 Vidrarias

- Balão volumétrico de 250mL, 500mL, 1000mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600mL, 1000mL – Satelit;
- Erlenmeyes de 250, 2000mL – Vidrolabor;
- Funil de separação de 1000mL – Schott Duran;
- Pipetas de vidro graduadas de 1mL, 5mL, 10mL, - Vidrolar;
- Pipeta Pasteur descartável;
- Proveta de 50mL, 200mL, 500mL e 1000mL – Vidrolex;

#### 4.1.4.6 Preparo do Meio de Cultivo

Para o preparo do meio de cultura RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute médium* (Sigma), foram utilizados:

RPMI	10 g
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Penicilina (1,650 U/mg)	0,06 g $\cong$ 99 U
Estreptomicina	0,1 g
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 mL
Tampão HEPES	5,98 g

O meio foi preparado com a mistura destes compostos em constante agitação em agitador magnético. Foi ajustado o pH deste meio para a faixa de 7,2 a 7,4. Depois foi filtrado em membrana de 0,22 $\mu$ m, em condições estéreis e acondicionados em frascos estéreis a 4°C. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio foi considerado completo após a adição de soro fetal bovino.

### 4.1.3 OUTRAS SOLUÇÕES

#### 4.1.3.1 Preparo da solução tampão fosfato-salino PBS (10X; *phosphate buffered saline*)

Os componentes foram misturados e após total dissolução dos sais, a solução foi filtrada em membrana estéril de 0,22 $\mu$ m. A solução foi armazenada a 4°C.

Cloreto de sódio	8 g
Fostato de sódio monohidrogenado heptahidratado	21,07 g
Fostato monopotássico	6 g
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 mL

#### 4.1.3.2 Preparo da solução de tripsina

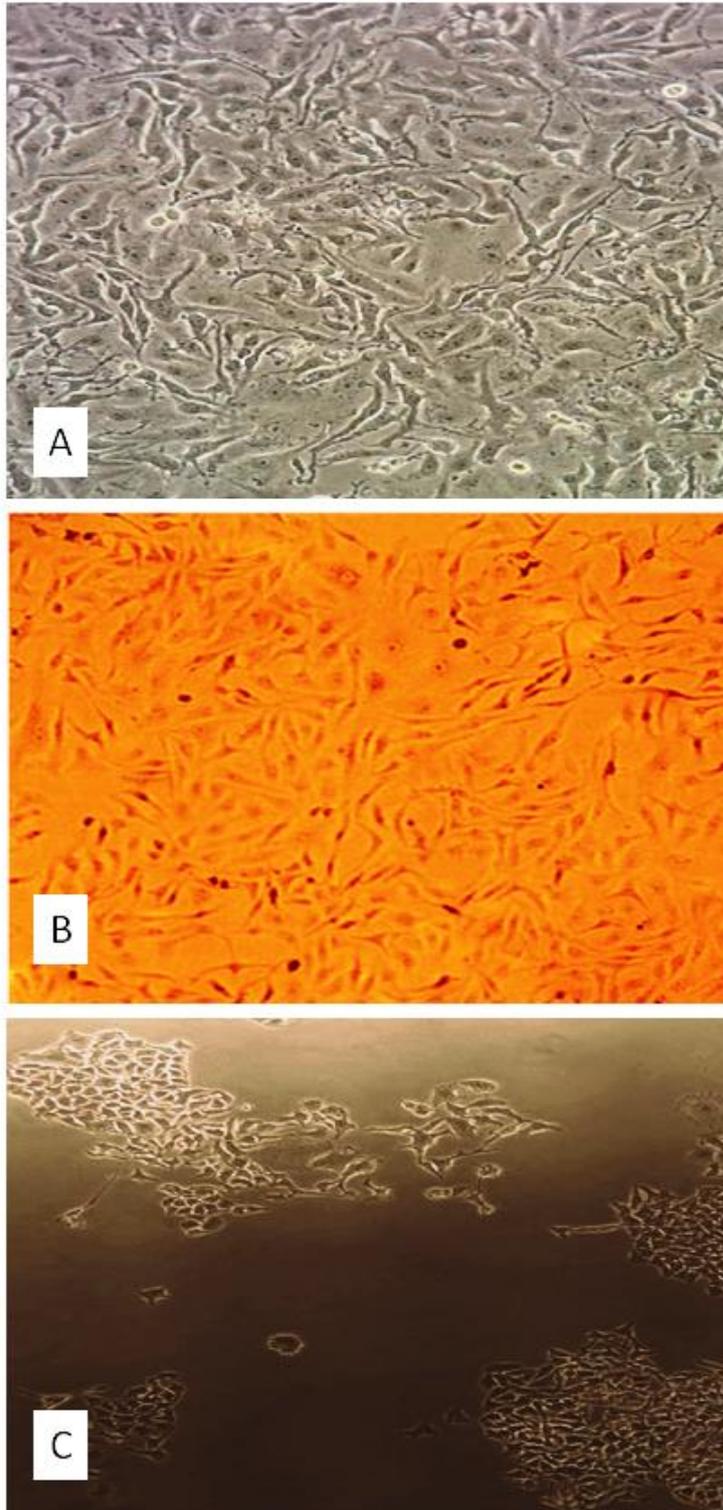
Tripsina	0,125 g
EDTA	0,02 g

Estes componentes foram misturados em 100 mL de solução salina PBS. Após solubilizar os componentes, foi verificado o pH (faixa de 7 - 7,4). A solução foi filtrada em membrana de 0,22 $\mu$ m, em condições estéreis e armazenada a 4°C.

#### 4.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 4.1.4.1 Modelo experimental

Para os testes citotóxicos foram utilizadas: linhagem tumoral de Adenocarcinoma Gástrico Primário (ACP02; figura 8 – A ), linhagem celular permanente de células oriundas de Rim de Macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* (VERO; figura 8 – B ). Estas células foram cedidas pelo Laboratório de Citogenética Humana (LCH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará - UFPA; outra linhagem celular utilizada em nossos ensaios a de Hepatocarcinoma Humano (HepG2; figura 8 – C), à qual foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para o ensaio de apoptose foi utilizada linhagem tumoral ACP02.



**Figura 8** - Linhagens celulares usadas nos ensaios.  
**Legenda:** A- linhagem ACP02; B-linhagem VERO; C- linhagem HepG2

#### 4.1.4.2 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em garrafas, em meio RPMI-1640 completo (item 4.1.4.6) e mantidas em estufa de gás CO<sub>2</sub> a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram soltas das garrafas de cultivo através da exposição à tripsina por 3 minutos, coletadas em tubos de 15mL, centrifugadas a 1500 – 2000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, ressuspensas em meio RPMI-1640, quantificadas em Câmara de Neubauer e semeadas em placas ou garrafas, conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. As células foram expostas às amostras testes e realizados os procedimentos experimentais.

#### 4.1.5 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Geissospermum sericeum* Miers foram coletadas no dia 26/04/2013, período da manhã, na região de Volta Grande do Xingu, em Belo Monte, Terra do meio, serra do Pardo, município de Altamira, Estado do Pará, sendo identificadas pela Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira. Uma exsicata foi depositada no Museu Paraense Emílio Goeldi (João Murça Pires).



**Figura 9** – Fotografias de folhas e tronco de *G. sericeum*

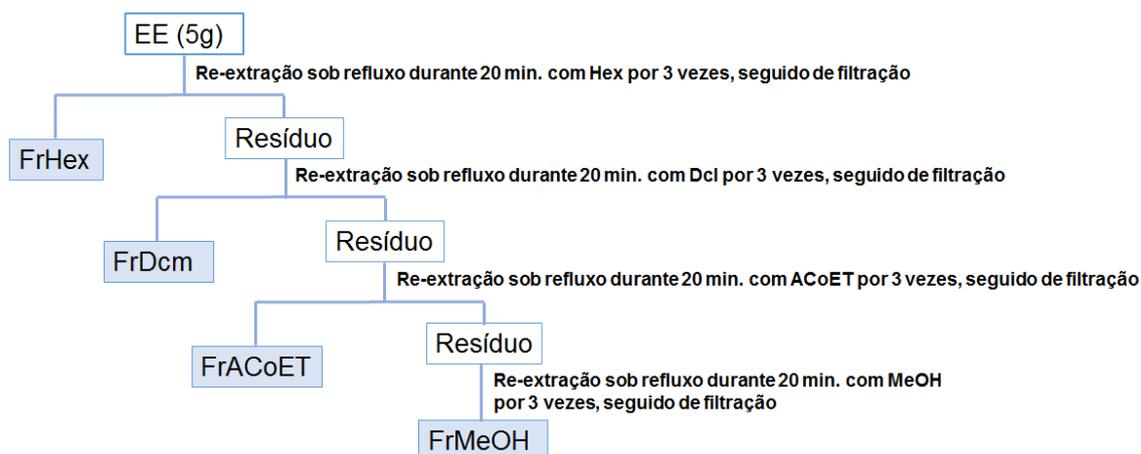
**Fonte:** Rafaela Cabral dos Santos Trindade- Arquivo Pessoal

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO DO EXTRATO E ALCALOIDE

O processamento do material vegetal, obtenção do extrato, isolamento, identificação e caracterização do alcaloide, foram realizados por Silva-Silva (2016) e mais detalhes podem ser consultados em seu trabalho. Assim, será exposto de maneira breve, apenas para o entendimento de como foram obtidas as amostras para o desenvolvimento do presente trabalho. As cascas dos troncos de *G. sericeum* foram lavadas em água corrente para retirada de impurezas e, posteriormente, secas em estufa com ventilação a ar forçado por 7 dias. Em seguida, triturou-se o material em moinho de facas, obtendo-se o pó das cascas do qual foi preparado o extrato etanólico. Este extrato foi preparado por maceração exaustiva (8 vezes, volume final de 16L). A solução extrativa foi recolhida a cada 24h. Essa solução foi concentrada até resíduo em evaporador rotativo (T=50° C).

Para o fracionamento do extrato (EEGS) utilizou-se as seguintes metodologias: re- extração sob refluxo (VALE et al. 2015), partição ácido: base e coluna cromatográfica aberta. No método de re-extração sob refluxo, o EEGS foi submetido a um sistema de refluxo e solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). O extrato etanólico (5g) foi colocado em balão de fundo redondo, acrescentado o solvente (100 mL) e aquecendo-o (40°C) sob refluxo por 20 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes em cada solvente (VALE et al. 2015; Figura 10).

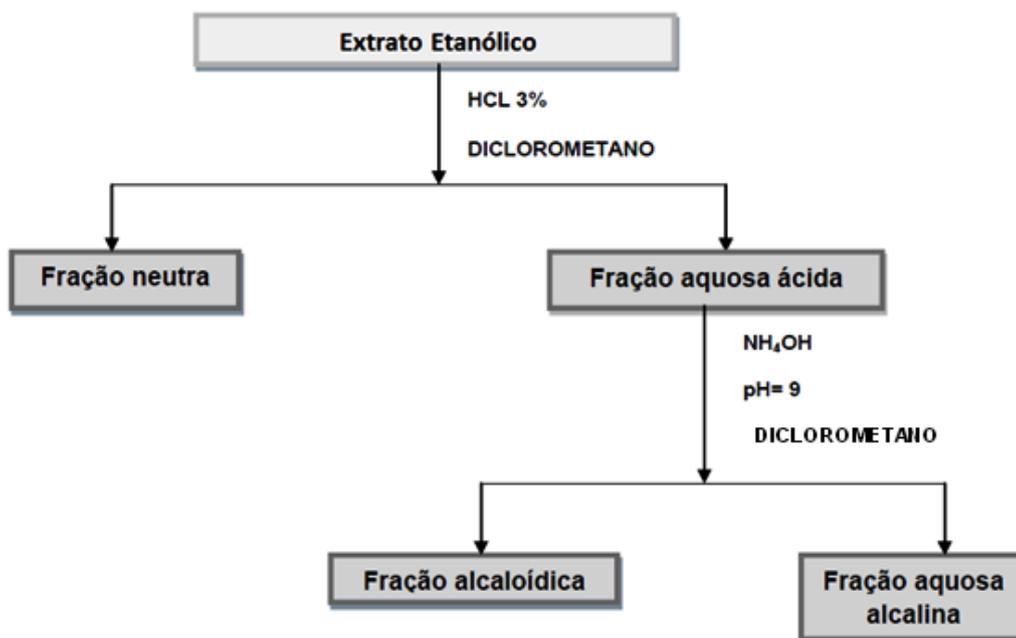


**Figura 10** - Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico de cascas de *G. sericeum*.

**Legenda:** EE-extrato etanólico; FrHex – fração hexânica do extrato etanólico; FrDCM – fração diclorometânica do extrato etanólico; FrACoET – fração acetato de etila do extrato etanólico; FrMeOH – fração metanólica do extrato etanólico.

**Fonte:** SILVA-SILVA, 2016.

As frações obtidas da re- extração sob refluxo foram: FrHexGS (fração de hexanos de *G. sericeum*), FrDCMGS (fração diclorometano de *G. sericeum*), FrAcOETGS (fração acetato de etila de *G. sericeum*) e FrMeOHGS (fração metanólica de *G. sericeum*). A segunda estratégia de fracionamento utilizada foi à partição ácido: base. O EEGS foi solubilizado em álcool etílico (10mL), então foi adicionado à solução de ácido clorídrico (HCl; 3%v/v) até pH 3,0. Adicionou-se diclorometano (cerca de 250mL x 3), então recolheu-se a fração diclorometano (Fração de Neutros; FNGS). Na solução aquosa ácida foi adicionado hidróxido de amônio até pH 9. Depois, adicionou-se diclorometano (250mL x 3), em seguida coletou a fração diclorometano (Fração Alcaloídica; FAGS: Figura 11; SILVA-SILVA, 2016).



**Figura 11** - Partição ácido: base do extrato etanólico de *G. sericeum*.  
**Fonte:** SILVA-SILVA, 2006.

A FAGS foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta (dimensões: 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel o metanol, sendo obtida a subfração 6 da FAGS (F6FAGS).

O EEGS e as frações (FAGS e FNGS) e subfração F6FAGS, foram analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

A partir da análise em CCD e CLAE-DAD, a subfração F6FAGS foi selecionada para fracionamento em CLAE-DAD semipreparativa, onde 100mg da amostra foi solubilizada em metanol grau CLAE (2 mL) sob sonicação. Em seguida, 500  $\mu$ L do diluído foram injetados, aplicados sucessivamente até a utilização de 100mL. Para realização das análises em CLAE-DAD semipreparativa, utilizou-se coluna SunFire™ em temperatura de eluição de 16-19 °C, tempo de eluição de 10 min. Foi coletada a subfrações isolada F6FAGS (F3F6FAGS) e sua análise trabalho foi realizada acompanhando a faixa de comprimento de onda de 325nm, registrando-se cromatogramas nos

comprimentos de onda de 212, 254, 340 e 420 nm. A eluição foi realizada em sistema isocrático de água e acetonitrila.

Em seguida, a caracterização da subfração F3F6FAGS em alcaloide indólico foi realizada por análise em espectrometria de Massa e RMN. Para identificação da substância isolada foi utilizado método espectroscópico de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e Carbono 13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $\text{C}^{13}$ ), 1D e 2D. No caso do  $^1\text{H}$  RMN, a análise foi feita a 25 °C, utilizando-se o tetrametilsilano, como referência interna. Foi utilizado o metanol deuterado para solubilizar as amostras.

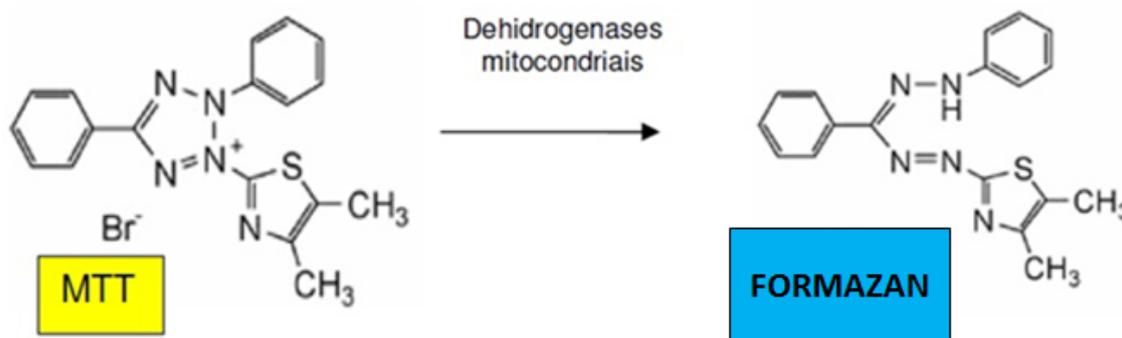
#### 4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

##### 4.2.2.1 Ensaio de viabilidade celular (método MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSSMAN et al. (1983). Utilizando-se placas de 96 poços, foram semeadas células VERO ( $8 \times 10^3$  células/mL meio RPMI-1640); ACP02 ( $8 \times 10^3$  células/mL meio RPMI -1640) e HepG2 ( $1 \times 10^4$  células/mL meio RPMI-1640). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Depois de 24h de incubação as células foram expostas ao tratamento em triplicata com sete concentrações decrescentes (500 $\mu\text{g/mL}$ ; 250 $\mu\text{g/mL}$ ; 125 $\mu\text{g/mL}$ ; 62,5 $\mu\text{g/mL}$ ; 31,25 $\mu\text{g/mL}$ ; e 15,625  $\mu\text{g/mL}$  e 7,812 $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras em teste: EEGS, FNGS, FAGS, FrHexGS, FrDCMGS, FrAcOETGS, FrMeOHGS e F3F6FAGS. Também foi realizada uma triplicata para controle negativo, contendo apenas meio a 10% SFB. As placas foram novamente incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24h de tratamento foi adicionado 10 $\mu\text{L}$  da solução brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, 5mg/mL; Figura 12) para 100  $\mu\text{L}$  de meio contido nos poços. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 horas. Foi então desprezado o sobrenadante e adicionado

100µL de DMSO (dimetilsulfóxido) a todos os poços para dissolver os cristais de formazana. As placas foram homogeneizadas para a completa dissolução dos cristais. Após aproximadamente 1 hora, as absorbâncias dos poços foram quantificadas em leitor espectrofotômetro de microplacas, utilizando um comprimento de onda de referência de 570nm.



**Figura 12-** Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; MTT] por enzimas mitocondriais.

Fonte: GOMES, 2008.

Os valores de  $CC_{50}$  (concentração citotóxica 50%) foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de três experimentos independentes. Para o cálculo da viabilidade celular, foi realizada a equação 1 (GALUCIO, 2014):

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{Absorbância das células}}{\text{Absorbância das células sem tratamento}} \times 100 \quad (1)$$

Ou seja, para o cálculo das células mortas foi utilizada a equação 2:

$$\% \text{ células mortas} = \frac{\text{Absor.das céls.sem tratamento} - \text{absor.Das céls.Tratadas}}{\text{Absor.das céls.sem tratamento}} \times 100 \quad (2)$$

Para a avaliação da atividade antitumoral foram utilizados os valores de  $CI_{50}$  (concentração inibitória 50% - concentração que inibe o crescimento celular em 50%) e para avaliar a citotoxicidade de células não-tumorais foram usados os valores  $CC_{50}$  (concentração citotóxica 50%- concentração que mata 50% das células). Esses valores foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de três experimentos independentes para cada amostra.

A  $CI_{50}$  foi determinada por regressão linear (programa *GraphPad Prism* versão 6.0) e expressa em ativo, moderadamente ativo e inativo (SARMENTO, 2016).

**Quadro 1-** Interpretação dos resultados baseado na faixa do  $CI_{50}$ .

$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

Fonte: FIGUEIREDO (2009) adaptado por SARMENTO, 2016.

A  $CC_{50}$  foi determinada por regressão linear (programa *GraphPad Prism* versão 6.0) e classificada em citotóxico, moderadamente citotóxico e não citotóxico (Quadro 2; SILVA-SILVA, 2016).

**Quadro 2 -** Interpretação dos resultados de citotoxicidade

$CC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	Resultados
Menor ou igual a 100	Citotóxico
Entre 101-500	Moderadamente citotóxico
Acima de 500	Não citotóxico

Fonte: SILVA-SILVA, 2016.

#### 4.2.2.1.1 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste

composto em testes clínicos (BOGO, 2012). A seletividade do extrato, frações e alcaloide indólico de *G.sericeum* foi realizada de acordo com Suffines e Pezzuto (1991). O IS do extrato, frações e substância isolada foram obtidos a partir da razão entre os valores da  $CC_{50}$  das células não tumorais e  $CI_{50}$  das células tumorais expresso na equação 3:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}} \quad (3)$$

Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 para indicar se a amostra é duas vezes mais ativa em células tumorais do que células normais.

#### 4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PADRÃO DE MORTE CELULAR UTILIZANDO CORANTES FLUORESCENTES

Este ensaio foi realizado apenas para a linhagem celular ACP02. As amostras usadas foram F3F6FAGS e FAGS, pois obtiveram os melhores resultados de atividade antitumoral e seletividade. Para a avaliação das células apoptóticas de forma diferencial em relação às normais e necróticas, três corantes fluorescentes foram empregados: o Hoechst 33342 (HO) que liga-se ao DNA corando-o em azul, o Iodeto de Propídeo (PI) que tem por finalidade determinar as células que perderam a integridade da membrana, uma indicação de apoptose ou necrose corando-as em vermelho e o corante Fluoresceína Diacetato (DAF) que cora em verde o citoplasma das células viáveis e em estágio de apoptose. O ensaio foi baseado no protocolo experimental do LCH.

Inicialmente foi realizado um teste para determinar a concentração de células necessárias para o ensaio. Dessa maneira foram cultivadas  $0,25 \times 10^6$  células em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> e posteriormente incubadas por 24

horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. Após 24 horas de incubação, realizou-se o tratamento em três diferentes concentrações para as duas amostras. Para a FAGS as concentrações foram 4,5 µg/mL, 9 µg/mL e 18 µg/mL. Para a F3F6FAGS as concentrações foram 3µg/mL, 6 µg/mL e 12 µg/mL. Para o controle positivo foi utilizada a doxorrubicina a 1 µM. Uma garrafa sem tratamento, apenas com células (0,25x10<sup>6</sup>) e meio de cultivo foi utilizada para controle negativo. As garrafas foram novamente incubadas por 24 horas (e 48 horas em diferente ensaio) em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após 24 ou 48 horas foi realizada a colheita do material. O meio de cada garrafa foi transferido para tubo cônico de 15mL para coletar as células que se desprenderam da garrafa e posteriormente foi feita a lavagem das garrafas com 3mL PBS (1x). Esse procedimento foi repetido para retirar os resquícios de SFB, sendo essas soluções transferidas para os tubos. Em seguida as células foram soltas das garrafas com 3mL de tripsina, com posterior inativação (PBS + meio contidos no tubo cônico) e todo o conteúdo foi transferido para o tubo cônico para centrifugação a 1500rpm por 5min. O sobrenadante foi desprezado deixando-se apenas uma pequena quantidade para ressuspender as células. Um mix de corantes foi preparado com volume final de 100 µl (25 µl de PI; 50 µl de DAF; 10 µl de HO e 15 µl de PBS), cujas concentrações utilizadas foram de 5 µg/ml para PI, 15 µg/ml para DAF e 2 µg/ml para HO. Então, 100 µl da suspensão celular foi misturada a 2 µl do mix de corantes e a mistura foi colocada em banho-maria a 37°C durante 5 minutos. Na sequência, em uma lâmina foram adicionados 15 µl da suspensão celular de cada amostra e coberta com lamínula. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC) quantificando-se 300 células por grupo. As células foram avaliadas de acordo com a coloração e morfologia em:

**Células viáveis:** citoplasma verde e núcleo azul intacto

**Células apoptóticas:** núcleo azul condensado e fragmentado, núcleo vermelho condensado e fragmentado, sem diferenciação entre apoptose precoce e tardia;

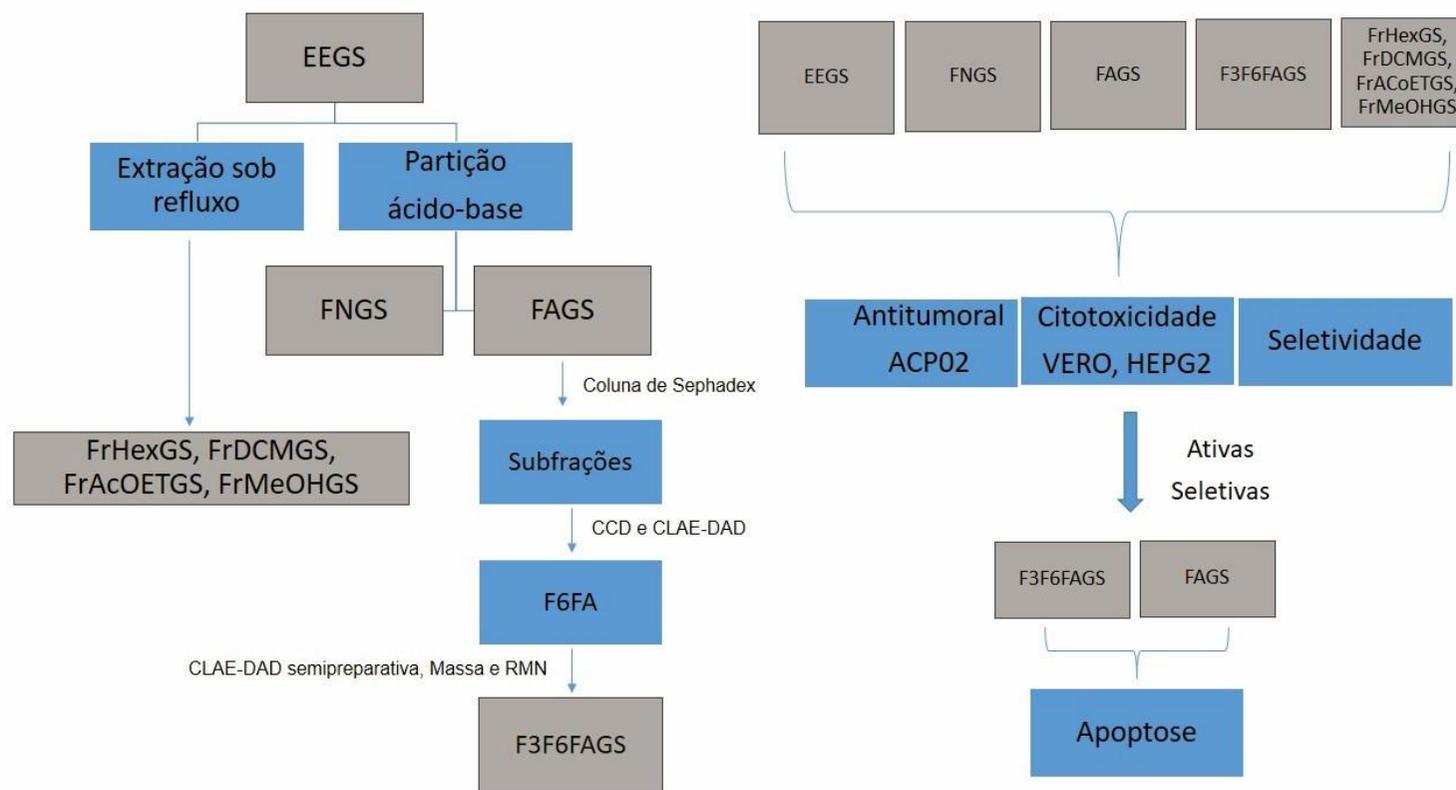
**Células necróticas:** núcleo intacto vermelho.

Para determinação da viabilidade utilizou-se a seguinte equação (4):

$$\%viáveis = \frac{\text{Células viáveis} \times 100}{\text{Total de células contadas}} \quad (4)$$

### 4.3 Análise Estatística

Para a comparação dos vários parâmetros, os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste *Tukey* do programa *Bioestat 5.0* (AYRES *et al*, 2007). Em todas as análises o nível de significância foi de  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ . A concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ) e a concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) foram calculadas através do programa *GraphPad Prism 6.0*



**Figura 13-** Síntese do processo de obtenção de amostras e esquema dos ensaios biológicos.

**Legenda:** EEGS: extrato etanólico; FNGS: Fração de neutros; FAGS: Fração alcaloídica; FrHexGS: Fração Hexânica; FrDCMGS: Fração Diclorometânica; FrAcOETGS: Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS: Fração Metanólica; F6FA: Subfração 6 da Fração Alcaloídica; F3F6FAGS: alcalóide indólico; CCD: Cromatografia em Camada Delgada; CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos; RMN- Ressonância Magnética Nuclear; ACP02: linhagem celular de adenocarcinoma gástrico primário paraense; VERO: linhagem celular normal de rim de macaco verde africano; HepG2: linhagem celular de hepatoma humano.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo Fitoquímico

O extrato etanólico obtido das cascas de *G. sericeum* foi submetido a partição ácido: base, sendo obtidas duas frações: FNGS e FAGS; Figura 9). Estudos em CCD destas amostras revelaram que o processo extrativo não foi eficiente para a separação de alcaloides, pois ambas amostras revelaram positivo para alcaloides (Ultravioleta e Dragendorff; Tabela 2). Do gênero *Geissospermum* já foram isolados alcaloides indólicos,  $\beta$ -carbolínicos e bisindólicos. Os alcaloides bisindólicos podem sofrer alterações na sua estrutura através de partição ácido: base (RAPPAPORT et al. 1957), isto é, uma clivagem ácida originando 2 alcaloides.

Em virtude disso, o extrato foi submetido a outra forma de fracionamento, a re-extração sob refluxo. As frações FrDCMGS e FrMeOHGS revelaram-se positivas em ultravioleta e reagente de Dragendorff. Enquanto que, as frações FrHexGS e FrAcOETGS não revelaram positivas, sugerindo que não contenham os alcaloides (SILVA-SILVA, 2016; Tabela 2).

Os alcaloides na forma livre possuem menor polaridade, sendo solúvel em solventes orgânicos de média polaridade, como, por exemplo, clorofórmio e diclorometano. Enquanto que, alcaloides na forma combinada (sal) apresentam elevada polaridade e por isso se solubilizam em metanol (SIMÕES e SCHENKEL, 2004; Tabela 2).

**Tabela 2-** Estudos em cromatografia em camada delgada de *G. sericeum*

Amostra	Ultravioleta	Reagente Dragendorf	Sugestivo
EEGS	+	+	Alcaloides
FNGS	+	+	Alcaloides
FAGS	+	+	Alcaloides
FrHexGS	-	-	Sem alcaloides
FrDCMGS	+	+	Alcaloides
FrAcOETGS	-	-	Sem alcaloides
FrMeOHGS	+	+	Alcaloides

**Legenda:** EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica - FrHexGS – Fração Hexânica; FrDCMGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS – Fração Metanólica.

**Fonte:** SILVA-SILVA, 2016.

## 5.2 Avaliação da Atividade Antitumoral em linhagem de câncer gástrico (ACP02)

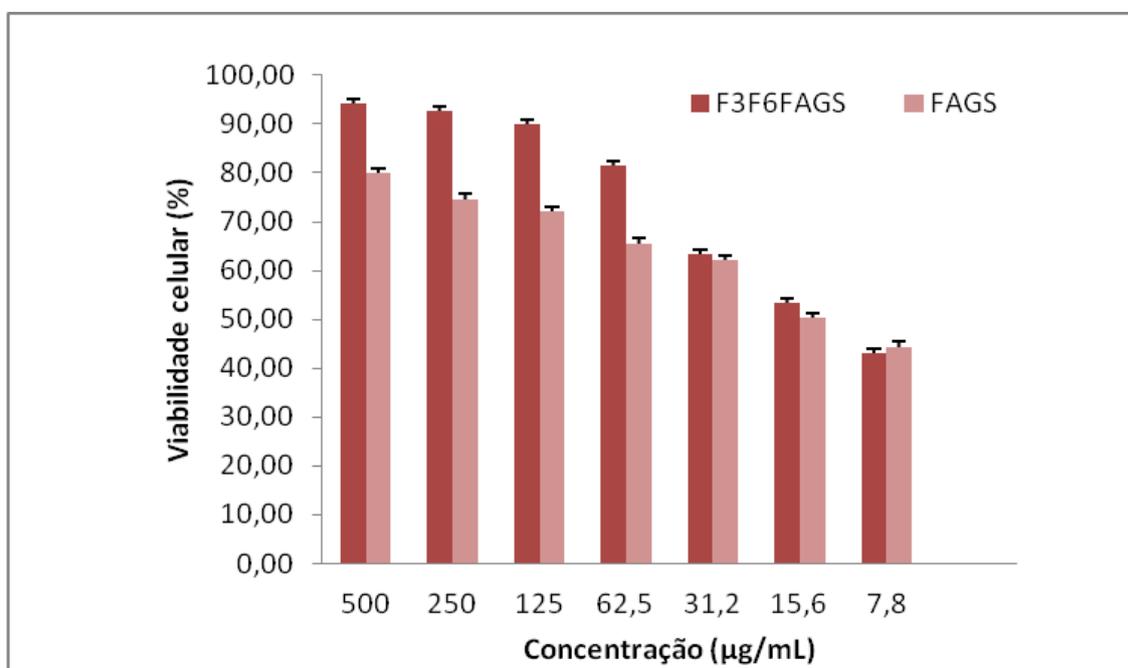
Este trabalho segue a premissa de que a atividade antitumoral está relacionada aos alcaloides: indólico,  $\beta$  – carbolínico e bisindólico. Também, esperava-se que o fracionamento contribuísse para a atividade antitumoral. e acreditava-se que a FrMeOHGS possuía menor potencial antitumoral que a FAGS e a FrDCMGSas, devido a maior polaridade dos alcaloides na forma combinada, presentes na FrMeOHGS.

O EEGS se mostrou moderadamente promissor para a atividade antitumoral (adenocarcinoma gástrico; Tabela 3), no entanto a FAGS mostrou-se muito promissora, reforçando a hipótese de que os alcaloides são promissores como antitumorais. A FNGS, que provavelmente deve possuir menor teor de alcaloides, apresentou atividade antitumoral similar ao EEGS (Tabela 3). O alcaloide indólico F3F6FAGS teve sua atividade próxima à atividade da FAGS (Tabela 3; Figura 14; Figura 15; Figura 16). Este resultado sugere que, o alcaloide indólico seja responsável pela atividade antitumoral, uma vez esse alcaloide foi isolado a partir da fração rica em alcaloides – FAGS (Figura 13).

**Tabela 3-** Atividade antitumoral de *G. sericeum* em linhagem de câncer gástrico

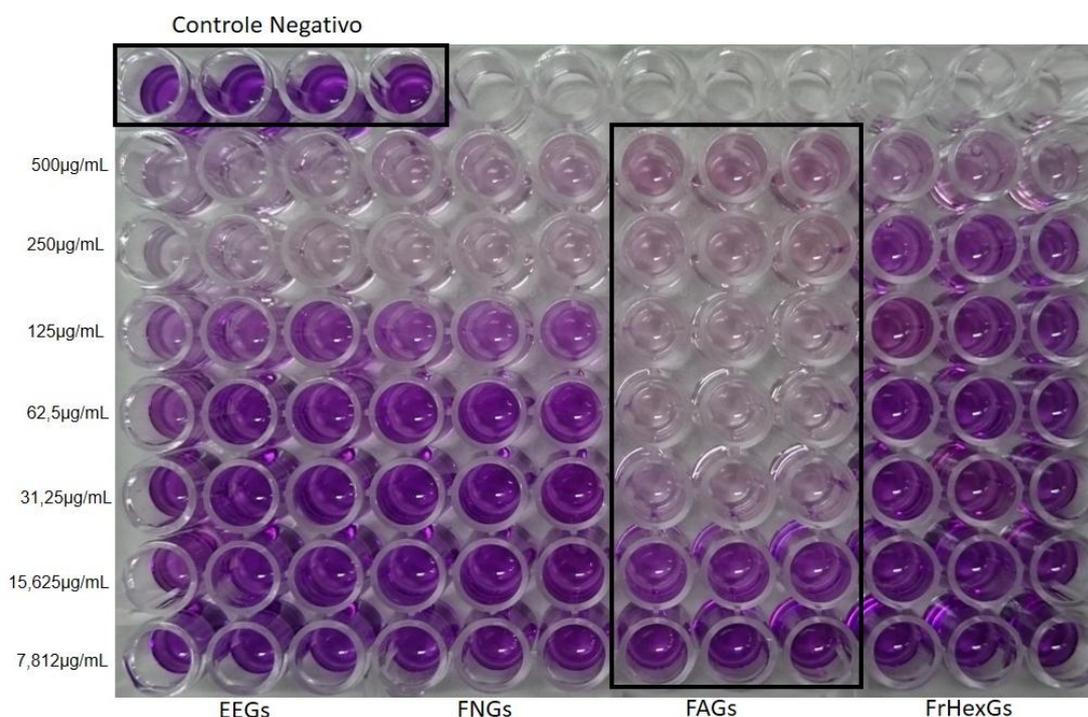
Amostra	CI <sub>50</sub> + DP (µg/mL)	Classificação
EEGS	131,55 ± 0,49	Moderadamente ativo
FNGS	114,45 ± 0,21	Moderadamente ativa
FAGS	18,29 ± 0,02	Ativa
F3F6FAGS	12,06 ± 0,04	Ativa
FrHexGS	77,63 ± 0,21	Ativa
FrDCMGS	78.265 ± 0.03	Ativa
FrAcOETGS	108,6 ± 0,28	Moderadamente ativa
FrMeOHGS	128,4 ± 0,56	Moderadamente ativa

**Legenda:** CI<sub>50</sub> < 100µg/mL- ativo; CI<sub>50</sub> entre 100 a 200µg/mL- moderadamente ativo; CI<sub>50</sub> > 200µg/mL- inativo (FIGUEIREDO, 2009. Adaptado por SARMENTO, 2016); EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcalóidica; F3F6FAGS – alcaloide indólico; FrHexGS – Fração Hexânica; FrDCMGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS – Fração Metanólica.



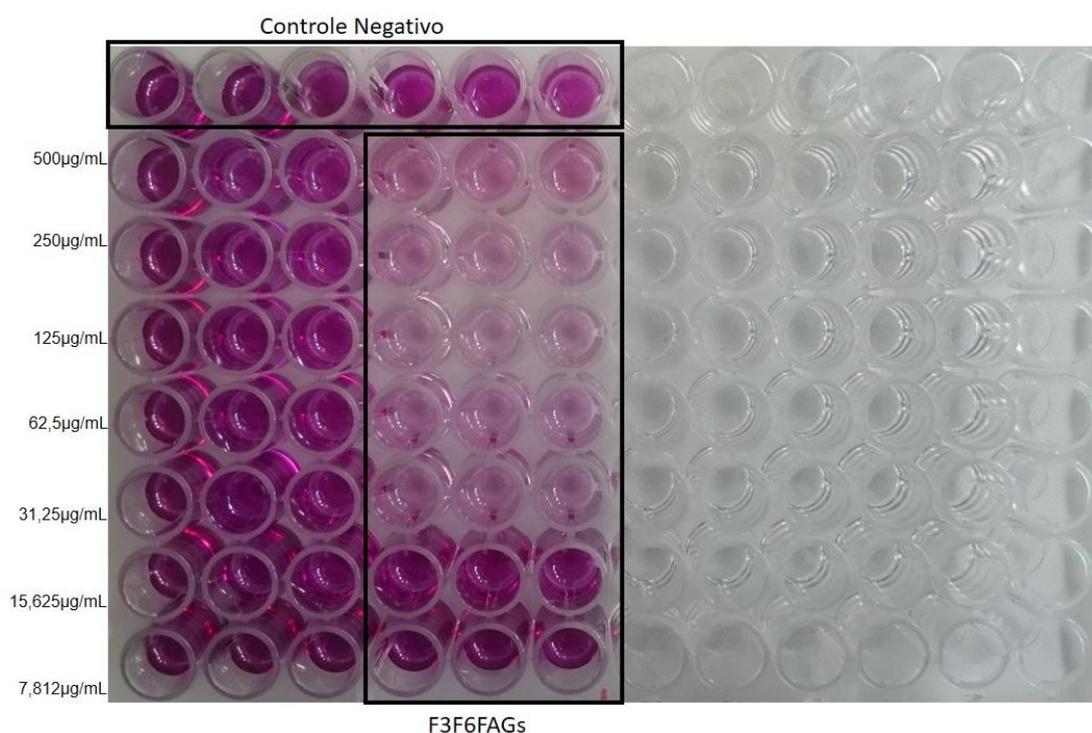
**Figura 14** -Gráfico de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição à FAGS e F3F6FAGS em linhagem ACP02.

**Legenda:** FAGS – fração alcalóidica; F3F6FAGS – alcaloide indólico.



**Figura 15-** Visualização macroscópica do resultado do teste de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição à amostras de *G. sericeum* em linhagem ACP02.

**Legenda:** EEGS – extrato etanólico; FNGS – fração de neutros; FAGS – fração alcaloídica; FrHEXGS – fração hexânica



**Figura 16 -** Visualização macroscópica do resultado do teste de viabilidade celular pelo método MTT em linhagem tumoral ACP02 após 24 horas de exposição ao alcaloide indólico isolado de *G. sericeum*

**Legenda:** F3F6FAGS – alcaloide indólico.

Outro estudo avaliou a citotoxicidade da flavopereirina e do alcaloide indólico F3F6FAGS em linhagem THP1 modificado em macrófago. Foi observado maior citotoxicidade dos alcaloides após 24h de tratamento e menor citotoxicidade no tempo de 72h de exposição. Neste estudo observou-se que a flavopereirina apresentou menor citotoxicidade que o alcaloide indólico (SILVA-SILVA, 2016; Tabela 4), isto reforça a hipótese que, talvez, o alcaloide indólico seja mais promissor.

**Tabela 4** – Citotoxicidade de alcaloides de *G. sericeum* em linhagem THP-1

Alcaloides	CI <sub>50</sub> ± DP (µg/mL)		
	24h	48h	72h
F3F6FAGS	232,000 ± 0,690	420,600 ± 0,780	455,900 ± 0,289
Flavopereirina	225,500 ± 0,904	533,300 ± 0,153	734,000 ± 0,860

**Legenda** – F3F6FAGS: alcaloide indólico; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória

**Fonte:** SILVA-SILVA, 2016

O extrato etanólico também foi submetido ao fracionamento sob refluxo (SILVA-SILVA, 2016) e as frações geradas foram submetidas a avaliação da atividade contra o tumor de células gástricas (ACP02), sendo as frações de menor polaridade (FrHexGS e FrDCMGS; Tabela 3) mais promissoras que as frações de maior polaridade (FrAcOETGS e FrMeOHGS; Tabela 3). Inicialmente, acreditava-se que a fração diclorometano poderia conter alcaloides bisindólicos e estes poderiam apresentar atividade similar ou superior ao alcaloide indólico.

Os alcaloides bisindólicos, vimblastina e vincristina, interferem na mitose na fase de metáfase ao se ligarem a tubulina, portanto, impedem a formação do fuso mitótico (KALIDASS et al. 2010), apresentando, dessa forma, ação citotóxica (CREASEY, 1979; KALIDASS et al. 2010). Infelizmente, não foi possível realizar estudos fitoquímicos nesta fração, não sendo possível comprovar/negar esta hipótese. De fato, a fração diclorometano apresentou menor atividade antitumoral que a fração de alcaloides (contém alcaloides indólico e β- carbolínico).

A FrHexGS, que provavelmente não possui alcaloides (Tabela 1) mostrou-se ativa contra as células tumorais gástricas (Tabela 3). Esta fração deve possuir constituintes de baixa polaridade, como, por exemplo, os

esteroides. Li e colaboradores (2010) demonstraram que esteroides foram ativos no tumor gástrico (MGC-803).

A FrDCMGS mostrou-se ativa para o câncer gástrico, entretanto, esta atividade foi menos pronunciada que a FAGS (Tabela 3). Estes resultados sugerem que, provavelmente estas frações possuam teores diferentes de alcaloides ou possuam alcaloides diferentes. Infelizmente, nenhum estudo fitoquímico comparando estas duas frações foi realizado até o momento, como, por exemplo, CLAE-DAD ou LC-MS.

A FrMeOHGs, que se revelou positiva para alcaloides, não apresentou atividade antitumoral. Alcaloides de maior polaridade não atravessam livremente a membrana celular, por isso, não podem se ligar ao seu alvo de ação (topoisomerase II, tubulina, etc.). O comportamento dessa fração pode estar relacionado a essa característica química.

Quando se analisa os resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a fração mais promissora foi a FAGS (Tabela 2), logo somente esta foi submetida a novos fracionamentos (SILVA-SILVA, 2016) visando o isolamento do marcador responsável por esta atividade. Desta fração foi isolado o alcaloide indólico (F3F6FAGS), que foi ativo ( $CI_{50}$  12,06  $\mu\text{g/mL}$ ) com atividade semelhante à FAGS ( $CI_{50}$  18,29  $\mu\text{g/mL}$ ), entretanto, com menor  $CI_{50}$  que essa fração (Tabela 3).

### **5.3 Avaliação da citotoxicidade em linhagens de células renal (VERO) e hepática (HepG2) e seletividade para atividade antitumoral**

Os fármacos utilizados na quimioterapia do câncer em geral são pouco seletivos, pois são tóxicos para as células tumorais e para células normais. Após uma sessão de quimioterapia, o paciente apresenta alterações hematológicas, mais tardiamente observam-se efeitos tóxicos renais, hepáticos, cardíacos, sistema nervoso entre outros (FERREIRA et al. 2014).

Sabe-se que há dificuldade na adesão do tratamento do câncer em decorrência dos efeitos adversos, que podem ser atribuídos à toxicidade dos medicamentos (GUERRA, 2005), levando à repulsa do paciente ao tratamento.

Nesse sentido, é importante a busca por substâncias que atuem seletivamente em células tumorais. Um parâmetro para avaliar se há diferença na nocividade entre linhagens de células normais e células tumorais é o índice de seletividade (IS) indicando o potencial uso deste composto em futuros testes clínicos. Nesse estudo, foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais.

Muitas vezes, o fracionamento do extrato etanólico obtido de plantas contribui para o aumento da atividade biológica (GALUCIO, 2014), porém a citotoxicidade para células renais, hepáticas e hematológicas pode aumentar e pode reduzir o índice de seletividade (GALUCIO, 2014; VANDRESSEN et al, 2017.). Mediante o exposto, avaliou-se a citotoxicidade das amostras sobre células VERO e HepG2.

Em contraste com outras linhas celulares, as células HepG2 possuem a capacidade de manter a atividade de enzimas de fase I e fase II, as quais desempenham um papel essencial na ativação de detoxificação de agentes pro- mutagenos e pro- carcinógenos (KNASMULLER et al. 1998). Esta linhagem mantém muitas das funções especializadas normalmente perdidas pelos hepatócitos primários em cultura, tais como a secreção de proteínas principais do plasma (MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004), conseqüentemente pode-se avaliar a citotoxicidade de substâncias e seus metabólitos. Logo, a escolha deste hepatoma se fundamentou na seguinte premissa: muitas vezes a toxicidade não está relacionada ao fármaco, mais sim ao seu metabólito (PEREIRA, 2007), logo é importante avaliar a toxicidade do fármaco e seu(s) metabólito(s).

Linhagens celulares renais são descritas como ferramentas importantes para o estudo de produtos terapêuticos que induzem nefrotoxicidade (PFALLER e GSTRAUNTHALER, 1998; PRICE et al. 2004; LINCOPAN et al. 2005). Quando o objetivo é obter novo fármaco antitumoral, o ideal, é avaliar o candidato em um painel de diferentes linhagens tumorais e normais (SPIELMANN et al. 1999; CRUZ et al. 2004), pois as diferentes linhagens podem apresentar perfis diferentes de sensibilidade (MIRANDA, 1992; MATUO, 2011; ATCC, 2017). As células VERO são células normais de rins,

órgão responsável pela excreção da maioria dos fármacos e metabólitos, logo avaliar o potencial citotóxico para células renais é muito importante.

De modo geral, a célula VERO foi mais sensível aos efeitos deletérios do EEGS, frações e alcaloide, do que as células hepáticas. O EEGS apresentou toxicidade moderada para célula VERO e não foi tóxico para a célula HepG2 (Tabela 5). O mecanismo exato desta seletividade de toxicidade para células renais não foi investigado no presente estudo.

**Tabela 5-** Avaliação da citotoxicidade de *G. sericeum*

Amostra	CC <sub>50</sub> ± DP (µg/mL)		Classificação
	VERO	HepG2	
<b>EEGS</b>	113,65 ± 0,35	472,55 ± 0,63	VERO: moderada citotoxicidade HepG2: não citotóxico
<b>FNGS</b>	130,1 ± 0,42	259,3 ± 0,42	VERO: moderada citotoxicidade HepG2: não citotóxico
<b>FAGS</b>	173,3 ± 0,32	299,45 ± 0,35	VERO: moderada citotoxicidade HepG2: não citotóxico
<b>F3F6FAGS</b>	476 ± 0,54	503,5 ± 0,28	VERO: não citotóxico HepG2: não citotóxico
<b>FrHexGS</b>	9,856 ± 0,06	375,15 ± 0,77	VERO: Citotóxico HepG2: não citotóxico
<b>FrDCMGS</b>	10,48 ± 0,64	155,8 ± 0,28	VERO: citotóxico HepG2: moderada citotoxicidade
<b>FrAcOETGS</b>	16,84 ± 0,53	252,05 ± 0,21	VERO: citotóxico HepG2: não citotóxico
<b>FrMeOHGS</b>	6,815 ± 0,77	247,3 ± 0,42	VERO: citotóxico HepG2: não citotóxico

**Legenda:** CC<sub>50</sub>< 100µg/mL- citotóxico; CC<sub>50</sub> entre 100 a 200µg/mL – moderada citotoxicidade; CC<sub>50</sub>> 200µg/mL – não citotóxico (FIGUEIREDO, 2009 adaptado por SARMENTO, 2016); EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica; F3F6FAGS – alcaloide indólico; FrHexGS – Fração Hexânica; FrDCMGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS – Fração Metanólica.

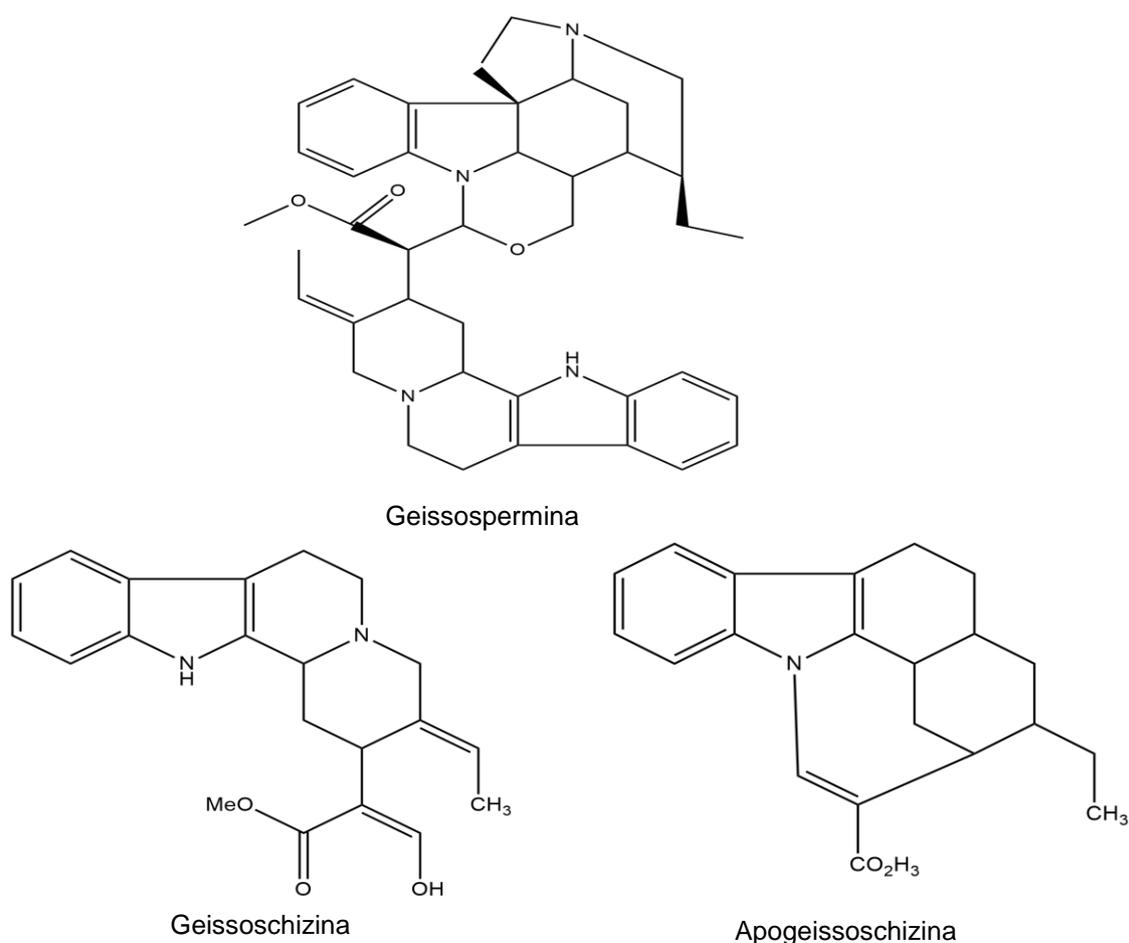
A FNGS e a FAGS tiveram perfis de citotoxicidade semelhante ao EEGS, apresentando-se moderadamente tóxicas para células VERO e não exibiram toxicidade para HepG2 (Tabela 5). Em síntese, este fracionamento parece não contribuir de forma significativa para a citotoxicidade, pois essas amostras apresentaram o mesmo perfil que o extrato.

Já o alcaloide F3F6FAGS não foi citotóxico para células renais ( $CC_{50}$  476  $\mu\text{g/mL}$ ) nem para células hepáticas ( $CC_{50}$  503,5  $\mu\text{g/mL}$ ; Tabela 5) portanto, o fracionamento da FAGS contribuiu para o aumento da atividade biológica (diminuição da  $CI_{50}$  18,29  $\mu\text{g/mL}$  da FAGS para  $CI_{50}$  12,06  $\mu\text{g/mL}$  do F3F6FAGS; Tabela 3) assim como contribuiu para a diminuição da citotoxicidade tanto nas células renais (aumento da  $CC_{50}$  de 173,3  $\mu\text{g/mL}$  da FAGS para  $CC_{50}$  476  $\mu\text{g/mL}$  do F3F6FAGS; Tabela 5) quanto nas células hepáticas (aumento da  $CC_{50}$  299,45  $\mu\text{g/mL}$  do FAGS para  $CC_{50}$  503,5  $\mu\text{g/mL}$  do F3F6FAGS; Tabela 5).

As quatro frações obtidas sob refluxo (FrHexGS, FrDCMGS, FrAcOETGS, FrMeOHGS; Figura 13; SILVA-SILVA, 2016) demonstraram elevada toxicidade para células VERO. Em relação a HepG2, apenas a FrDCMGS apresentou toxicidade moderada (Tabela 5).

Na FrMeOHGS e FrDCMGS foram detectados alcaloides (Tabela 2), no entanto apresentaram perfis diferente de atividade antitumoral (Tabela 3) e de citotoxicidade (Tabela 5). Este fato pode estar relacionado com os teores diferentes de alcaloides e outros metabólitos nestas frações, por isso, as respostas biológicas são diferentes.

Conforme dito anteriormente, em espécies do gênero *Geissospermum* já foram isolados alcaloides bisindólicos (RAPPAPORT, et al. 1957) e a partição ácido - base pode alterar a estrutura destes alcaloides. Rappaport e colaboradores (1957) obtiveram os alcaloides indólicos geissoschizina e apogeissoschizina a partir da clivagem ácida do alcaloide bisindólico geissospermina (Figura 17). Outra hipótese levantada neste trabalho é que na fração de alcaloide contenham apenas alcaloides livres, enquanto que a fração diclorometano possa conter alcaloides bisindólicos, que não tenham sofrido clivagem ácida.



**Figura 17** - Estrutura química do alcaloide geissospermina e seus derivados.

Outro alcaloide bisindólico pertencente à família Apocynaceae é a vimblastina. A principal via de eliminação desse alcaloide é através do metabolismo de fase 1 (CYP450) originando um metabólito desacetilado (DYNAMED, 2016). Muitas vezes, estes metabólitos são mais reativos e mais citotóxicos. No presente trabalho, quando se avaliou a citotoxicidade sobre células hepáticas não se observou elevado efeito citotóxico. A fração com maior potencial citotóxico hepático foi a FrDCMGS, sugerindo novamente que esta deve conter os alcaloides bisindólicos.

O alcaloide bisindólico, vimblastina é lentamente eliminado por via renal, já havendo descrito na literatura os seguintes efeitos tóxicos renais: destruição celular rápida, resultando no aumento do catabolismo de purinas, elevação do ácido úrico e nefrotoxicidade (DYNAMED, 2016).

No caso das demais frações (FrHexGS, FrAcOETGS e FrMeOHGS), os metabolitos envolvidos nesta citotoxicidade para as células VERO precisam ser investigados, pois resultados preliminares sugerem que as frações hexânica e acetato de etila não possuam alcaloides (Tabela 2). A maioria dos estudos fitoquímicos realizados com espécies pertencentes ao gênero *Geissospermum* visavam o isolamento de alcaloides (MUÑOZ et al. 2000; STEELE et al. 2002; MBEUNKUI et al. 2012; SANTOS e VOLPATO, 2015; SILVA-SILVA, 2016) porém outros metabólitos podem estar presentes nestas espécies como por exemplos terpenos e flavonoides.

No estudo fitoquímico realizado por Souza (2009), no extrato metanólico das folhas de *Himatanthus drasticus*, pertencente à mesma família da espécie *G. sericeum*, constatou-se a presença de flavonoides (quercetina e rutina), terpenos, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. No látex obtido de *H. drasticus* foram encontrados terpenos (sitosterol e amirina).

A toxicidade de terpeno em células VERO foi avaliada utilizando óleo essencial de *Diospyros hispida* (Ebenaceae) contendo o sesquiterpeno (E) nerolidol. Esse óleo demonstrou moderada citotoxicidade (CC<sub>50</sub> 163µg/mL; LUGO, 2015). A toxicidade de flavonoides em células VERO já foi descrita na literatura. Em estudo realizado por Jasinski (2016) o extrato etanólico de *Baccharis glaziovii* (Asteraceae) foi identificado com uma mistura de compostos sugerindo a presença de flavonoides. Dele foi obtido a fração diclorometano, que se mostrou citotóxica para células VERO (CC<sub>50</sub> 34,72µg/mL). Dessa fração, foi isolado o flavonoide 5,7,4 -tri-hidroxi-flavona, chamada de apigenina como composto majoritário.

Algumas vezes, frações mais polares, como, por exemplo a metanólica, revelam positivamente em reagente de Dragendorff sugerindo a presença de alcaloides. Porém, estudos fitoquímicos mais detalhados levam ao isolamento de flavonoides glicosilados (BRIGIDO, 2016). Tal fato pode estar ocorrendo no presente estudo (resultado falso positivo para a fração metanólica; Tabela 2), logo, estudos fitoquímicos da fração metanólica podem esclarecer se esta fração possui flavonoide e/ou alcaloides. Também é importante avaliar a citotoxicidade do metabólito isolado.

Um fator muito importante a ser avaliado é a seletividade da atividade antitumoral de ACP02, pois um agente promissor deve possuir uma

concentração inibitória 50% menor que as concentrações citotóxicas 50% das linhagens HepG2 e VERO. O EEGS, FNGS, FrHexGS, FrDCMGS, FrAcOETGS e FrMeOHGS são pouco promissoras como antitumoral, pois apresentaram índice de seletividade relacionados á VERO ( $CC_{50}$  Vero/  $CI_{50}$  ACP02) inferior a 2. Também baixos índices de seletividade em HepG2 ( $CC_{50}$  HepG2/  $CI_{50}$  ACP02) foram obtidos para estas frações (Tabela 6). Estes resultados reforçam a hipótese que o extrato e estas frações não são promissores como antitumoral.

**Tabela 6** - Avaliação da seletividade de *G. sericeum* para atividade antitumoral em relação às células ACP02

Amostras	Índice de Seletividade		Classificação
	IS VERO	IS HepG2	
<b>EEGS</b>	0,86	3,59	VERO: Não seletivo HepG2: seletivo
<b>FNGS</b>	1,13	2,26	VERO: Não seletivo HepG2: seletivo
<b>FAGS</b>	9,5	16,37	VERO e HepG2: seletivo
<b>F3F6FAGS</b>	39,4	41,74	VERO e HepG2: seletivo
<b>FrHexGS</b>	0,12	4,83	VERO: Não seletivo HepG2: seletivo
<b>FrDCMGS</b>	0,13	2,00	VERO: Não seletivo HepG2: seletivo
<b>FrAcOETGS</b>	0,08	2,32	VERO: Não seletivo HepG2: seletivo
<b>FrMeOHGS</b>	0,05	1,92	VERO e HepG2: não seletivo

**Legenda:** EEGS - Extrato Etanólico; FNGS – Fração de Neutros; FAGS – Fração Alcaloídica - FrHexGS – Fração Hexânica; FrDCMGS – Fração Diclorometano; FrAcOETGS – Fração Acetato de Etila; FrMeOHGS – Fração Metanólica. IS – índice de seletividade=  $CC_{50}/CI_{50}$ ;  $IS \geq 2,0$  (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

A FAGS apresentou alta seletividade para atividade antitumoral (IS Vero= 9,5 e IS HepG2= 16,37; Tabela 6). Entre as amostras testadas, o alcaloide indólico F3F6FAGS demonstrou maior seletividade para atividade antitumoral em ACP02 (IS VERO= 39,4 e IS HepG2= 41,74). Estudos acerca da seletividade de alcaloides indólicos são escassos. Um estudo demonstrou a seletividade de ação do alcaloide alstonina e alcaloide  $\beta$ -carbolínico flavopereirina, outro alcaloide também presente na FAGS. O mecanismo de ação do composto formado por esses dois alcaloides baseia-se na indução de apoptose através da desestabilização do DNA das células de câncer de próstata, sendo específico para essas células (HALL e BELJANSKI, 2005).

Outro estudo avaliou o efeito inibitório da flavopereirina e alstonina frente a células de câncer de mama. Esses alcaloides distinguem o DNA do câncer de DNA de tecido saudável e o efeito inibitório do alcaloide deve-se à sua capacidade de formar um complexo de "DNA de alcaloides-câncer" inibindo a iniciação da síntese de DNA e o alongamento da cadeia. Além disso, os alcaloides podem antagonizar o efeito estimulante dos esteroides durante a síntese *in vitro* do DNA, sendo este efeito revertido por doses elevadas de esteroides (BELJANSKI e BELJANSKIM, 1982)

Em relação à seletividade do alcaloide indólico estudado, ainda existe carência de estudos a este respeito. Atualmente existem 2 alcaloides indólicos, isolados de espécies pertencentes à família Apocynaceae, cujas atividades antineoplásicas já foram comprovadas: elipticina e olivacina (OLIVEIRA et al. 2009; HENRIQUE, 2010). Os mecanismos envolvidos nesta atividade são: intercalação de DNA; inibição da TOP 2; alquilação covalente de macromoléculas e geração de radicais livres (SHI et al. 1998).

Estudos anteriores demonstraram certa seletividade da elipticina e dos seus derivados para o câncer do Sistema Nervoso Central (ACTON et al. 1994; ANDERSON et al. 1994; JURAYI et al. 1994; SHI et al. 1998). Talvez, essa maior seletividade dos alcaloides indólicos justifique a menor citotoxicidade para as células renais (Tabela 5).

Quando se compara a FAGS ao EEGS verifica-se que houve elevação da citotoxicidade para as células. Fato semelhante ocorreu para todas as frações. Em síntese, o fracionamento contribuiu para elevação da toxicidade de forma significativa para células renais e de forma discreta para as células hepáticas (Tabela 5).

#### **5.4 Avaliação do padrão de morte em linhagem de câncer gástrico ACP02 submetida ao tratamento com FAGS e F3F6FAGS.**

Os efeitos citotóxicos podem induzir diferentes padrões de morte celular, dentre eles a apoptose e a necrose. Os processos que acarretam a apoptose são bem diferentes daqueles que induzem a necrose. Na célula necrosada, o

citoplasma e a mitocôndria estão aumentados e suas organelas sofrem lise, não há formação de vesículas ou corpos apoptóticos. Já a apoptose não provoca resposta inflamatória e somente células individuais são afetadas *in vivo* (LEIST e JAATTELA, 2001).

Uma das ideias deste trabalho é que o alcaloide F3F6FAGS age de forma semelhante a outros alcaloides indólicos, como a elipticina e olivacina, estabilizando o complexo TOP II-DNA e induzindo fragmentações no DNA, que não são reparadas e podem levar a célula tumoral à morte por apoptose (NITISS, 2009). Outra possibilidade investigada foi o papel da necrose na atividade antitumoral, visto que a citotoxicidade pode envolver a fragmentação da fita de DNA e, conseqüentemente, a morte celular também pode envolver a necrose (SALVADORI et al. 2003).

A avaliação da indução de apoptose em células tumorais é muito importante na terapia anticâncer, uma vez que muitos fármacos nessa terapia culminam em indução de morte celular por apoptose. Neste estudo, avaliou-se o comportamento do alcaloide isolado de *G. sericeum* e da FAGS frente a linhagem celular ACP02, após 24 e 48h de tratamento, através da microscopia de fluorescência com utilização de corantes fluorescentes.

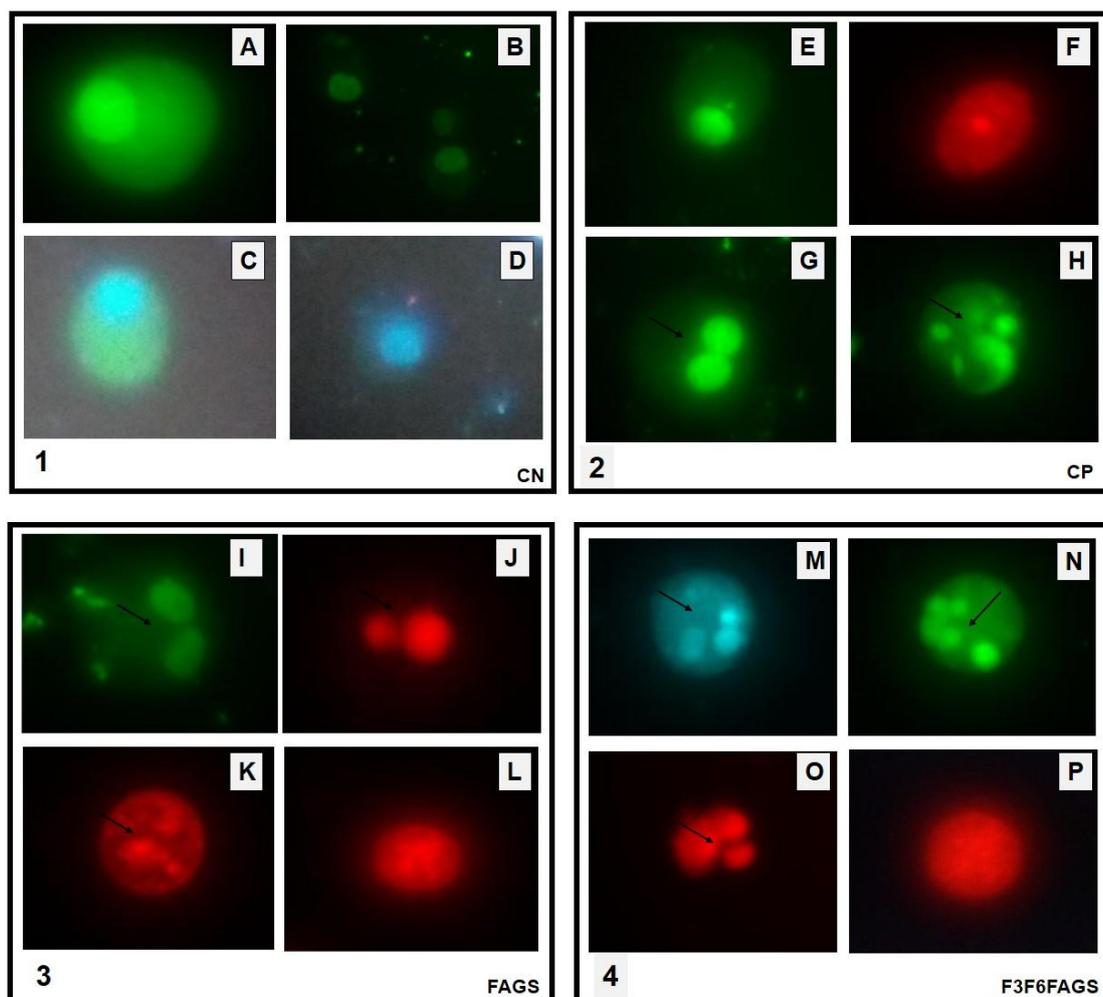
Em todos os ensaios, os grupos controles (positivo = doxorrubicina e negativo) apresentaram os mesmos padrões de coloração. Em todas amostras testadas (controle positivo, controle negativo, FAGS e F3F6FAGS) observou-se predomínio de células viáveis, sendo observado no controle positivo e nas células tratadas com FAGS e F3F6FAGS a presença de apoptose e algumas células com características de necrose (Figura 18 – quadrantes 2, 3, 4).

Com a utilização do corante HO pôde ser observado a coloração azul do núcleo de células viáveis e de células apoptóticas (figura 18), que é caracterizada pela diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação dos corpos apoptóticos (Figura 18; KANNAN e JAIN, 2000), isso foi possível pois o corante HO é permeável às membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizado para avaliação de apoptose e quantificação dessas células (KIECHLER e ZHANG 2003). Este corante é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais de apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao corante IP (HASHIMOTO et al. 2003).

Também pôde ser observado apoptose tardia nas células em análise, sendo esta identificada pela presença de corpos apoptóticos (Figura 18 – G, H, I, J, K, M, N, O), aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo a coloração por IP (Figura 18 – J, K, O). A combinação dos corantes HO e IP foi usado para a diferenciação ao microscópio de fluorescência dos estágios de apoptose e necrose, podendo ser observado na apoptose corpos apoptóticos (Figura 18 – G, H, I, J, K, M, N, O) e na necrose aumento da permeabilidade da membrana, sendo possível difusão do IP. Tais fatos foram observados nas células ACP02 tratadas com doxorubicina e com amostras de *G. sericeum* (Figura 18 – F, L, P).

O citoplasma de células com membrana celular intacta foram marcadas com o corante DAF, sendo observado a coloração verde. Este corante foi utilizado como marcador de viabilidade celular, corando células viáveis, (que não sofreram apoptose ou necrose; Figura 18 – quadrante 1) e células apoptóticas que ainda não sofreram alterações na permeabilidade da membrana plasmática (Figura 18 – G, H, I, M, N), que ocorre nos estágios finais da apoptose (Figura 18 – J, O).

No grupo controle negativo, onde as células não foram tratadas com nenhuma substância, as células apresentam coloração verde, com núcleo intacto e muitas vezes núcleo corado em azul, demonstrando viabilidade celular, ou seja, não apresentaram nenhuma alteração de permeabilidade na membrana plasmática (Figura 18 – A, B, C, D). No grupo controle positivo foram observadas células viáveis (Figura 18 – E), com apoptose (Figura 18 – G, H) e necrose (Figura 18 – F). Estes resultados permitiram avaliar o padrão de células viáveis, apoptóticas e necróticas obtidas nos experimentos, detectáveis pela distinção do padrão de fluorescência e morfologia, em que foi possível nitidamente classificá-las e assim realizar nossas análises quanto aos efeitos citotóxicos da FAGS e F3F6FAGS observados no ensaio de MTT.



**Figura 18** - Micrografias de células da linhagem ACP02 após exposição à doxorrubicina, FAGS e F3F6FAGS na realização do ensaio de Apoptose por marcação fluorescente.

**Legenda:** 1 - Controle negativo (CN): A, B, C, D – células viáveis com núcleo e citoplasma intactos. Presença de células coradas com Hoechst 33342 (HO) que liga-se ao DNA corando o núcleo em azul e com Fluoresceína Diacetato (DAF) corando o citoplasma em verde; 2 – Células tratadas com o controle positivo (CP; Doxorrubicina) E: células viáveis, F células necróticas coradas em vermelho pelo Iodeto de Propídeo (PI); G, H: Células apoptóticas com destaque para a presença de corpos apoptóticos (setas); 3 – Células tratadas com a fração alcaloídica de *G. sericeum* (FAGS): I, J, K – células apoptóticas com destaque para a presença de corpos apoptóticos, L – células necróticas coradas em vermelho pelo Iodeto de Propídeo; 4 – Células tratadas com o alcalóide indólico isolado (F3F6FAGS): M, N, O – Células apoptóticas com a presença de corpos apoptóticos (setas), P – Células necróticas coradas em vermelho pelo Iodeto de Propídeo.

Visando confirmar o principal mecanismo envolvido na atividade citotóxica em ACP02 da fração de alcaloides realizou-se uma avaliação quantitativa das respostas observadas. Em se tratando inicialmente da FAGS,

as células ACP02 foram expostas em 24 e 48 horas às seguintes concentrações: 4,5µg/mL, 9µg/mL e 18µg/mL.

Observou-se que em 24 horas de exposição a concentração de 4,5µg/mL, apesar de ser a menor concentração dessa amostra, foi a concentração que mais teve indução de apoptose (25,67%; Figura19). Não houve diferença estatística significativa entre a doxorrubicina (1µM), que foi usada como controle positivo (CP) e a menor concentração da FAGS (4,5µg/mg), ou seja, a menor concentração da nossa amostra foi capaz de induzir apoptose em igual proporção quando comparada ao CP (induziu 25,33%) em 24 horas de exposição. Para as maiores concentrações da FAGS houve diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ ) comparados com a doxorrubicina. A concentração 9 µg/mL induziu 10,67% de apoptose e a concentração de 18 µg/mL induziu 5,33% de apoptose, mostrando que o aumento da concentração diminuiu a indução de apoptose em ACP02 com 24 horas de tratamento.

As células tumorais podem sofrer o estímulo externo para a indução de apoptose, entretanto essas células podem ativar mecanismos de defesa próprios para proteção às injúrias geradas pelo fator externo (ANAZETI e MELO, 2007) nesse caso, as células da linhagem ACP02 podem ativar mecanismos para se proteger dos danos que as maiores concentrações da FAGS podem causar. Entre os mecanismos de defesa celular estão a diminuição do influxo da substância na célula a partir da diminuição da expressão de proteínas transportadoras, ou ainda a ligação entre o composto e o receptor pode ser fraca (alcaloide e receptor alvo). Há também a expressão de genes relacionados ao reparo celular, como por exemplo, o gene MYC. Todos esses mecanismos de defesa podem influenciar na parada do ciclo celular, ou seja, os alcaloides da FAGS podem alterar o ciclo celular, promovendo parada da divisão celular, diminuindo momentaneamente a morte celular por apoptose, o que pode ser reestabelecido posteriormente (ANAZETI e MELO, 2007).

A linhagem ACP02 exhibe níveis de expressão do gene MYC aumentados. Além disso, essa linhagem possui desregulação nesse gene e tal evento mostra-se comum na carcinogênese gástrica, geralmente como consequência da amplificação de genes, translocações cromossômicas ou mecanismos pós-tradução. (DANG et al. 2006; CALGAGNO et al. 2008). A proteína Myc é uma

fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose. Inicialmente, o gene responde diretamente a sinais mitogênicos estimulando a passagem das células da fase G1 do ciclo celular. Além do seu papel no ciclo celular, MYC também apresenta um papel chave na regulação do processo apoptótico. Tanto a superexpressão quanto a diminuição da expressão de MYC pode levar a morte celular (THOMPSON, 1998; CONZEN et al. 2000). MYC é de particular importância na saída do ciclo celular porque pensa-se que ele desempenha um papel na determinação da divisão celular em células de mamíferos (CALGAGNO et al. 2013)

Estes resultados sugerem inicialmente que o aumento da concentração da FAGS no período de 24 horas pode ativar o gene MYC, no momento em que a célula ainda está em divisão, por isso, não é observado o processo de apoptose, entretanto, quando a célula é exposta ao tratamento no período de 48h com a FAGS, a ativação anterior leva à apoptose. Entretanto, a influência desse gene no ciclo celular e apoptose quando a célula ACP02 é exposta à FAGS só poderá ser confirmada com a realização de testes de genotoxicidade e expressão do gene MYC.

Em 48h de tratamento das células ACP02 com FAGS, pôde ser observado que a taxa de apoptose aumentou conforme o aumento da concentração ( $p < 0,01$ ). A concentração de  $9\mu\text{g/mL}$  foi responsável por 7,5% de apoptose e a doxorrubicina foi responsável por 7,6% de apoptose (Figura 18). Esses resultados mostram que na concentração de  $9\mu\text{g/mL}$  a FAGS induz apoptose na mesma proporção que a doxorrubicina ( $1\mu\text{M}$ ). E, na maior concentração da FAGS ( $18\mu\text{g/mL}$ ), houve maior taxa de apoptose nas células (15,3%). Figura 19) comprovando que no período de 48h, a morte celular por apoptose foi dependente da concentração.

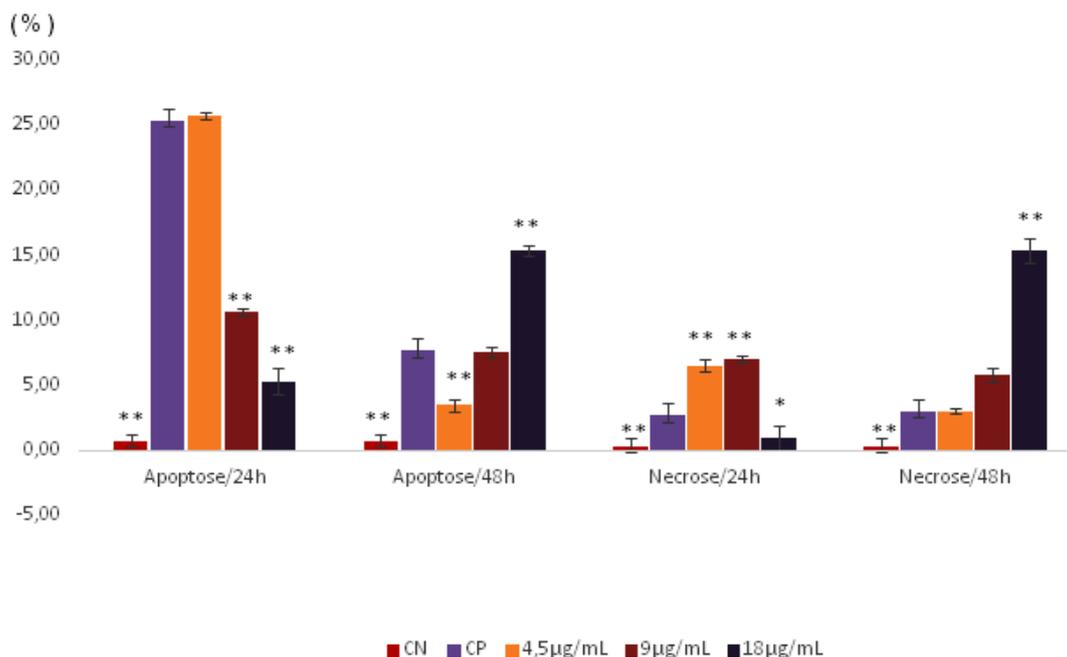
Foi perceptível que o tempo influenciou na resposta, havendo a redução significativa do percentual de apoptose induzida pela doxorrubicina (24 horas = 25,33% de apoptose; 48 horas = 7,67% de apoptose; Figura 19). Da mesma forma, houve redução significativa da taxa de apoptose induzida pela menor concentração de FAGS (24 horas = 25,67% de apoptose; 48 horas = 3,50% de apoptose; Figura 19).

Quando avaliada a morte celular por necrose em 24 horas de exposição à FAGS pôde ser observado que, com o aumento da concentração há a menor taxa de apoptose e necrose. Já com a diminuição da concentração, aumenta a apoptose e há uma taxa significativa de necrose (Figura 19).

Não houve diferença estatística significativa entre o CN (0,3%) e a concentração de 18µg/mL (1,0%) demonstrando que a taxa de necrose foi muito baixa na maior concentração (Figura 19). Também não houve diferença estatística significativa entre as concentrações 4,5µg/mL (6,5%) e 9 µg/mL (7,0%) e a doxorrubicina induziu necrose em menor proporção que essas amostras (Figura 19).

Quando se observa no período de 48 horas, os valores de necrose e apoptose se aproximam e na maior concentração da FAGS (18µg/mL) há um aumento significativo de morte celular tanto por apoptose, quanto por necrose e os valores de necrose e apoptose se igualam (não significativo estatisticamente). Essas amostras induzem 15,33% de necrose e apoptose, configurando que em maiores concentrações e com o aumento do tempo de exposição não há diferença entre os dois tipos de morte celular e a FAGS induz necrose e apoptose em proporções iguais (Figura 19), havendo a necessidade de avaliar que tipo de morte celular o alcaloide isolado dessa fração (F3F6FAGS) induz.

Nas menores concentrações, a fração alcaloídica, por conter os alcaloides flavopereirina e F3F6FAGS, pode estar atuando em conjunto, de maneira sinérgica, em que doses mais baixas desses dois alcaloides potencializam o efeito da apoptose e necrose celular, promovendo maior dano na célula. Quando avaliado o aumento do tempo de 24 horas para 48 horas, verificou-se que tanto para a morte celular por necrose quanto para apoptose também pode haver sinergismo entre o alcaloide indólico e flavopereirina. Nesse sentido, sugere-se que esses alcaloides possam atuar por diferentes vias, de maneira sinérgica, para causar o aumento de apoptose e necrose.



**Figura 19-** Frequência de apoptose e necrose em células ACP02 em 24 e 48h de exposição à FGS.

**Legenda:** CN- Controle negativo; CP- controle positivo (Doxorrubicina); FGS – Fração de alcaloides de *G.sericeum*.

\*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 em relação CP (ANOVA/pós-teste Tukey).

Os alcaloides atuam por diferentes vias para alcançar seu efeito. O alcaloide indólico olivacina possui atividade antineoplásica e os mecanismos envolvidos nesta atividade são: intercalação de DNA; inibição da TOP 2; alquilação covalente de macromoléculas e geração de radicais livres (SHI et al. 1998). A elipticina é um alcaloide indólico com potente ação antineoplásica, que também possui múltiplos mecanismos de ação, dentre estes pode se destacar a estabilização do complexo DNA e TOP 2, promovendo a parada do ciclo celular, induzindo apoptose por inibição da TOP 2 (TOPCU, 2001; BRANDÃO et al. 2010; STIBOROVÁ et al. 2011). Outro exemplo são os alcaloides da Vinca, que atuam no citoesqueleto ligando-se às  $\beta$ -tubulinas inibindo a polimerização dos microtúbulos, suprimindo a dinâmica dessas estruturas, o que resulta em lentidão ou bloqueio da mitose na transição da metáfase para anáfase e indução da apoptose (JORDAN e WILSON, 2004).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de ação dos alcaloides beta carbolínicos no câncer, entretanto, sabe-se que podem exibir estabilização do DNA de células tumorais induzindo apoptose (HALL e BELJANSKI, 2005).

Outros alcaloides de diferentes classes podem exibir diferentes mecanismos de ação. Os alcaloides carbazólicos mahanina, pyrayafolina – D e murrayalina – I, induziram apoptose em células de leucemia HL-60 por meio da ativação da via caspase-9 / caspase-3 através de disfunção mitocondrial com base na perda do potencial de membrana (ITOA et al. 2005). Como os alcaloides da FAGS podem estar atuando por diferentes vias, sugere-se que a via mitocondrial pode ser uma via envolvida na indução de apoptose da flavopereirina.

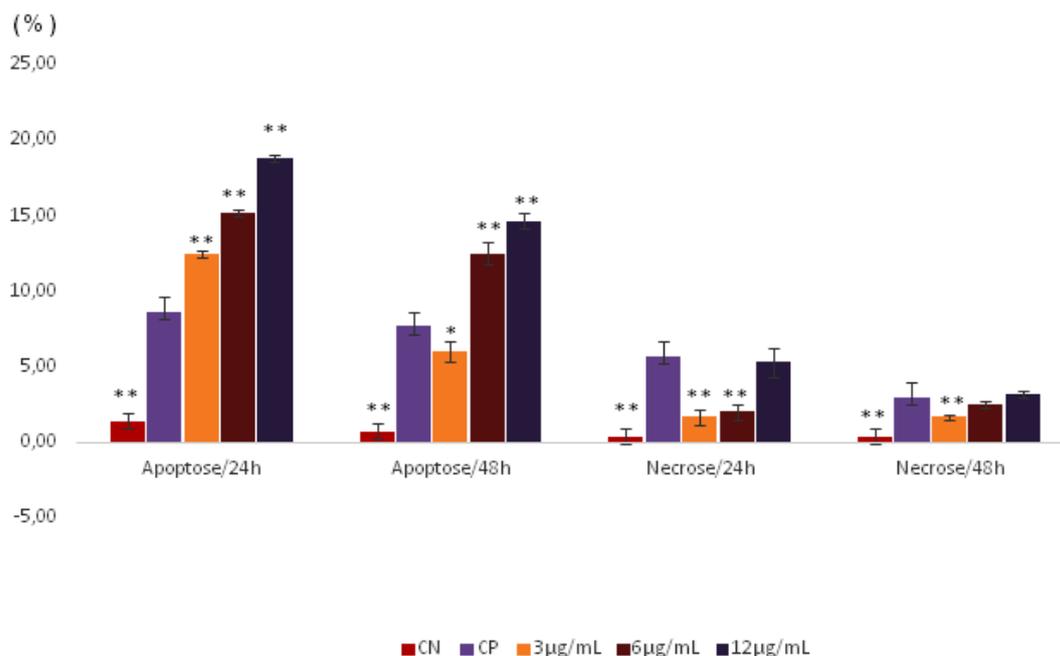
Visando avaliar se o alcaloide indólico F3F6FAGS é o responsável pela apoptose da FAGS, verificou-se a atividade deste alcaloide sobre as células ACP02, em diferentes concentrações (3 µg/mL, 6 µg/mL e 12 µg/mL) após 24 e 48h de exposição.

Em 24h, F3F6FAGS apresentou aumento da taxa de apoptose diretamente proporcional a concentração. Esse comportamento foi observado em todas as concentrações testadas ( $p < 0,01$ ; 3µg/mL = 31,50%; 6µg/mL = 15,175 e 12µg/mL = 18,83%; Figura 20). Também, F3F6FAGS apresentou um maior potencial indutor de apoptose comparado à doxorubicina (8,67%). No que diz respeito à necrose, este tipo de morte também foi dependente da concentração: houve o aumento da taxa de necrose com o aumento da concentração de F3F6FAGS. O aumento da morte celular por necrose foi menor ou equiparado à quantidade de células necróticas induzidas por doxorubicina e não houve diferença estatística relevante entre o CP (5,3%) e a maior concentração do F3F6FAGS (12µg/mL = 5,7 %) no tempo de 24 horas.

Em 48 horas de tratamento com o alcaloide F3F5FAGS, esse comportamento se repetiu e tanto a morte celular por necrose ou apoptose foi dependente da concentração. A quantidade de células apoptóticas, em quase todas as concentrações, foi maior quando comparada ao CP ( $p < 0,01$ ), pois a concentração de 3µg/mL induziu apoptose na mesma proporção que o CP (não houve significância estatística). Esse resultado demonstra que o alcaloide indólico isolado demonstrou indução de apoptose igual ou superior à doxorubicina (CP = 7,67%; 3 µg/mL = 6,0%; 6 µg/mL = 12,5% e 12 µg/mL = 14,67%; Figura 19). Em 48 horas, também não houve diferença na quantidade de morte celular por necrose e CP nas maiores concentrações.

Quando se analisou a influência do tempo de exposição do alcaloide indólico em ACP02 na indução de apoptose e necrose, foi visualizado, em 48

horas de tratamento, diminuição branda da quantidade de células apoptóticas quando comparado ao tempo de exposição de 24h, observado na figura 19. Ou seja, em 24h a resposta foi superior à de 48h. Também pôde ser observado uma menor taxa de necrose quando as células ACP02 foram expostas à 48 horas de tratamento com F3F6FAGS.



**Figura 20** – Frequência de apoptose e necrose em células ACP02 em 24 e 48h de exposição ao alcaloide F3F6FAGS.

**Legenda:** CN- Controle negativo; CP- controle positivo (Doxorrubicina).

\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em relação CP (ANOVA/pós-teste Tukey).

Em síntese, a atividade do alcaloide isolado pode induzir tanto apoptose quanto necrose da seguinte maneira: no menor tempo de tratamento (24 horas) é observado predominância de apoptose e após um tempo de exposição (48 horas) observa-se a diminuição de apoptose e necrose, com predomínio de apoptose.

Um comportamento parecido ocorreu com esse mesmo alcaloide em estudo realizado por Silva-Silva (2016). Avaliou-se a citotoxicidade do alcaloide indólico frente a linhagem THP-1 e verificou-se que o aumento do tempo de exposição da amostra (48h e 72h) induziu redução da citotoxicidade (maior

CC<sub>50</sub>). Na avaliação da atividade promastigota, observou-se elevada atividade antipromastigota em 24h de exposição do parasito aos alcaloides, com declínio após 48h e “resgate” da atividade inibitória após 72h. Estes resultados sugerem que o alcaloide se liga de forma reversível ao seu receptor, tendo provavelmente ação “leishmaniosstática” (SILVA-SILVA, 2016).

Como este fato tem sido repetidamente observado (citotoxicidade, indução de apoptose e atividade leishmanicida) recomenda-se investigar, de maneira mais detalhada a “reversibilidade”. Talvez, este alcaloide produza uma resposta rápida e não sustentada, necessitando a associação com um fármaco de resposta mais lenta e sustentada.

Outros estudos mostram a semelhança da atividade de alcaloides com nosso estudo. O alcaloide isoquinolínico berberina foi avaliado em células de linfoma histiocítico (U937) e em linhagem celular de leucemia (B16). Após 24 horas de tratamento com a berberina nessas linhagens houve um efeito citotóxico agudo. O efeito da berberina foi dependente da concentração (LETASIOVÁ, et al. 2006). Baixas concentrações da berberina após 24 horas, induziram reorganização do citoesqueleto de actina em células B16. Ocorreu a formação de aglomerados de fibras filamentosas de actina e seu número aumentou com a crescente concentração de berberina. Após 48 h, não foram encontrados grupos de fibras filamentosas de actina nas células B16. Isso significa que as células afetadas se adaptaram ao efeito citotóxico da berberina causado em 24 horas (LETASIOVÁ, et al. 2006).

O análogo do alcaloide elipticina 8-metil-4- (3 dietilaminopropilamino) pirimido [4', 5': 4,5] selenolo 2,3-b quinolina (MDPSQ) induziu a citotoxicidade de maneira dependente da concentração e do tempo em linhagens de células leucêmicas. A citotoxicidade afetou as células de maneira dose e tempo dependentes e a substância afetou a divisão celular. Em células tratadas com MDSQ marcadas com anexina V e PI por 48 horas e 72 horas houve indução de apoptose e necrose (SHAHABUDDIN et al. 2011).

Os alcaloides carbazólicos mahanina, pyrayafolina – D e murrayalina – I, mostraram citotoxicidade significativa contra células da linhagem leucêmica HL-60. A microscopia de fluorescência com coloração Hoechst 33342 revelou que a porcentagem de células apoptóticas com núcleos fragmentados e cromatina

condensada aumentou de maneira dependente do tempo após o tratamento com cada alcaloide (ITOA et al. 2005).

Como exposto, vários alcaloides induzem morte celular por apoptose e necrose. Diversos mecanismos estão envolvidos nessa atividade. Nossos resultados sugerem que a atividade antitumoral visualizada em linhagem tumoral gástrica esteja relacionada com a substância F3F6FAGS (isolado da FAGS) e o mecanismo envolvido nesta atividade seja a apoptose. As duas amostras testadas induziram apoptose, entretanto, houve ocorrência de morte celular por necrose mais evidenciada nas maiores concentrações da FAGS. Dessa maneira o alcaloide indólico foi mais promissor que a FAGS para a atividade antitumoral. Comparar a atividade antitumoral, seletividade e padrão de morte celular da FAGS ao seu alcaloide é extremamente importante para o delineamento de estudos futuros envolvendo este alcaloide como base para um possível uso clínico.

## 6 CONCLUSÃO

*Geissopermum sericeum* é promissora como antitumoral, em especial para o câncer gástrico. Provavelmente, o alcaloide indólico seja o responsável por esta atividade e a apoptose um dos mecanismos envolvidos. Vale ressaltar que este alcaloide e fração de alcaloides mostraram-se mais citotóxicos para as células tumorais gástricas (ACP02) do que para as células renais (VERO) e hepáticas (HepG2), sugerindo certa seletividade para este câncer. Também, a maior citotoxicidade e a menor seletividade da FAGS provavelmente estejam relacionadas ao sinergismo de seus alcaloides para apoptose e necrose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, E. M.; NARAYANAN, V. L.; RISBOOD, P. A.; SHOEMAKER, R. H.; VISTICA, D. T.; BOYD, M. R. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human tumors in vitro. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 2185- 2189, jul. 1994.

AJANI, J.A; MOISEYENKO, V.M; TJULANDIN, S. Quality of life with docetaxel plus cisplatin and fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil from a phase III trial for advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma: the V-325 study group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 3210-3216. 2007.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINAI, L.C.B.; MONTANARII, C.A.; DONNICII, C. L.; LOPESI, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANAZETI, M. C; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v 1, n 1, p. 37-58, jan./jun, 2007.

ANDERSON, W. K.; GOPALSAMY, A.; REDDY, P. S. Design, synthesis and study of 9-substituted ellipticine and 2-methylellipticinium analogues as potential CNS-selective antitumor agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 1955-1963, jun. 1994.

ARREGI, M.M.U.; FÉRRER, D.P.C.; ASSIS, E.C.V.; PAIVA, F.D.S.; SOBRAL, L.B.G.; ANDRÉ, N.F. Perfil clínico-epidemiológico das neoplasias de estômago atendidas no Hospital do Câncer do Instituto do Câncer do Ceará, no período de 2000- 2004. **Revista brasileira cancerologia**, v. 2, n. 55, 2004.

ATCC, Cell lines. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE RECURSOS E PADRÕES DE MATERIAIS BIOLÓGICOS. Disponível em: <[https://www.atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx)> Acesso em 01 de junho de 2017.

ÁVILA, E; V; LEZAMA, R. V; ESTRADA, M. G. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. **Bioquímica Medigrafe**, v 31, n 3, p. 97-111, jul/set 2006.

AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. M; DOS SANTOS, A. S. In: **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Ed. Sociedade Civil Mamirauá, Belém Pará, 2007

BARBOSA, J.A.; SCHINONNI, M.I. Helicobacter pylori: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, p. 254-262, dez. 2011.

BECK, W. T. Mechanism of multidrug resistance in tumor human cells. The roles of P-glycoprotein, DNA topoisomerase II and other factors. **Cancer Treatment Reviews**. v. 17, p.11. 1990.

BELJANSKI, M; BELJANSKI, M.S. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of beta-carboline class. **Experimental Cell Biology**, v 50, n 2, p 79-87, 1982.

BEMIS, D.L.; CAPODICE, J.L.; DESAI, M.; KATZ, A.E.; BUTTYAN, R.  $\beta$ -carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao Pereira suppresses prostate cancer cells. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 7, n. 2, p. 59-65, 2009.

BLASKÓ, G; CORDELL, G. A. Recent developments in the chemistry of plant-derived anticancer agents. In: **Economic and medicine plants research**. USA: Academic Press, 1988. P. 119-191.

BOGLIOLO, L. **Patologia Geral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.p 7-22.

BOHM, I; SCHILD, H. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. **Molecular Imaging and Biology**, v 5, n 1, p 2–14, 2003.

BOLZANI, V.S; SERUR, L. M; MATOS, F.J.de A.; OTTO R. GOLIEB, O.R. Indole alkaloid evolution in Aspidosperma. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.15, p.187-200, mar. 1987.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de líquens**. 2012. 110f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento) – Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

BORGES, B.N.; BURBANO, R.M.R.; HARADA, M.L. Analysis of the methylation patterns of the p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, and APC genes in gastric adenocarcinoma patients from a Brazilian population. **Tumor Biology**, v. 34, p. 2127–2133, 2013.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 175-182, abr., 1992.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.P.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Revista Química Nova**. v. 33, p. 1359-1369., 2010.

BRANDÃO, D. L. N. "**Portulaca pilosa L. e Geissospermum vellosii. Estudos Botânicos, Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividades Biológicas.** 2012. 176 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 505, DE 6 DE MAIO DE 2013:** Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas - Adenocarcinoma de Estômago. Diário Oficial da União. Brasília, DF. 22 de maio de 2013. p.59, seção 2.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 122 p. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

BRÍGIDO, H. P. C. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e biológicos de *Anona glabra* L. (Annonaceae).** 2016, 121 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

CALCAGNO, D.Q; LEAL, M.F; ASSUMPCAO, P.P; SMITH, M.A; BURBANO, R.R. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World Journal Gastroenterology**, v 14, n 39, p 5962–5968, 2008.

CALCAGNO, D.Q; FREITAS, V.M; LEAL, M.F; DE SOUZA, C.R; DEMACHKI, S; MONTENEGRO, R; ASSUMPÇÃO, P.P; KHAYAT, A.S; SMITH, M. DE A; DOS SANTOS, A. K; BURBANO, R.R. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. **BMC Gastroenterology**, v 13, p 141, 2013.

CAMARGO, M. R. M. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson E *Minquartia guianensis* Aubl coletadas em Roraima.** 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

CARDOSO, C.L; SILVA, D.H.S; TOMAZELA, D.M; YOUNG, M.C.M; EBERLIN, M.N; VERLI, H; BOLZANI, V.S. Turbinatine a potential key intermediate in the biosynthesis of corynanthean-type indole alkaloids. **Journal of Natural Products**, v 66, p 1017-1021, 2003.

CARDOSO, S.C. **Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

CHANG, C; ZHAO, W; XIE, B.; DENG, Y; HAN, T.; CUI, Y.; DAI, Y.; ZHANG, Z.; GAO, J; GUO, H.; YAN, J. Pao Pereira Extract Suppresses Castration Resistant Prostate Cancer Cell Growth, Survival, and Invasion Through

Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling. **Integrative Cancer Therapies**, v. 13, n. 3, p. 249–258, 2014.

COMICB 2015. **O custo médio para o tratamento da quimioterapia**. Disponível em <<http://www.comicb.com/o-custo-medio-para-tratamento-do-cancer-quimioterapia/>> Acesso em 20 de maio de 2016.

CONZEN, S. D; GOTTLOB, K; KANDEL E. S; KHANDURI, P; WAGNER, A.J; O'LEARY, M; HAY, N. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc transrepression correlates with acceleration of apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v 16, n 20, p. 6008-6018, 2000.

COVER, T.L. Helicobacter pylori diversity and gastric cancer risk. **Revista mBio**, v 7, n 1, p1869, 2016.

CREASEY, W.A. The vinca alkaloids. In **Antibiotics**. Vol. 10, 5 ed, p 414- 438, 1979.

CREW, K.D; NEUGUT, A.L. Epidemiology of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v 3, n 12, p 354 – 362, 2006.

CRUZ, A. S; BARBOSA, M.L; Andreoli PINTO, T.A. *In vitro* tests used as an alternative to Draize *in vivo* tests. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v 63, n1, p 1-9, 2004.

CUNNINGHAM, D; ALLUM, W.H; STENNING, S.P; THOMPSON, J.N; VAN de VELDE, C.J; NICOLSON, M. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.355, p11-20, 2006.

DADOUN, C; RAGUENEZ-VIOTTE, G. Celiptium-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rat renal cortex. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v 27, n 3, p 178-86, 1990.

DANG, C.V; O'DONNELL, K.A; ZELLER, K.I; NGUYEN, T. OSTHUS, R.C; LI, F. The c-Myc target gene network. **Cancer Biology**, v 16, n.4, p 253–264, 2006.

DIETEL, M. What's new in cytostatic drug resistance and pathology. **Pathology – Research and Practice – Journal**, v. 187, p. 892-905. 1991.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gentianales medicinais. In: DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. p. 375-385.

DING, S. Z.; GOLDBERG, J. B.; HATAKEYAMA, M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. **Future Oncology**, v. 6, n. 5, p. 851–862. 2010

DONG, W.; CHEN, X.; XIE, J.; SUN, P.; WU, Y. Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/ SPINT2 in gastric cancer. **International Journal of Cancer**. v. 127, n. 7, p. 1526-34, 2010.

DURÃES, C; ALMEIDA, G.M; SERUCA,R; OLIVEIRA, C; CARNEIRO, F.. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? **International journal of pathology**.v.464, p.367-368, mar. 2014.

DYNAMED 2016. Portal Saúde Baseada em Evidências. Vinblastine. Disponível em: <<http://web.b.ebscohost.com/dynamed/search/basic?sid=fbca3ad5-a89c-4c33-ac7b-af5777fcb4d0%40sessionmgr103&vid=6&hid=125> > Acesso em 10 de julho de 2016.

FACINA, T. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, p. 63 2014; (1): 63, mar. 2014.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359–386, 2015.

FERREIRA, A, L; ROCHA, C.P; VIEIRA, L.M; SANT'ANA DUSSE, L.M; D.R.G.J; CARVALHO, M. G. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 94-101. 2014.

FIGUEIREDO, C. **Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino**. 2009. 103f. (Dissertação de Mestrado/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FUCCIO, L.; EUSEBI, L.H.; BAZZOLI, F. Gastric cancer, Helicobacter pylori infection and other risk factors. **World Journal Gastrointestinal Oncology**, v. 15, n. 9, p 342-7, 2010.

GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de *Eleutherine Plicata* Herb.**, 2014, 90f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2014.

GOMES, J.P.M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2008.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p 227-234, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v 53, n 3, p 335 – 343, 2007.

HALL, J. L.; BELJANSKI, S. P, Flavopereirine and alstonine combinations in the treatment and prevention of prostate cancer. **Natural Source Internacional**. vol.1 p964, 2005.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **The Journal Cell**, v 7, n 100, p 57-70, 2000.

HANNUN, Y.A. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. **The Journal of the American Society of Hematology**, v.89, p. 1845-1853, Mar. 1997.

HASHIMOTO, Y; SHIMADA, Y; ITAMI, A; ITO, T; KAWAMURA, J; KAWABE, A; KAGANOI, J; MAEDA, M; WATANABE, G; IMAMURA, M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v 39, p 2239-2246, 2003.

HEGEDUS, Z. L. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side products in human diseases and aging. **Toxicology**, v 145, p 85-101, 2000.

HENRIQUE, M.C. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* E *A. desmanthum*. **Química Nova**, v 33, p 284-287, jan. 2010.

HUBER, P.C.; MARUIAMA, C.H; ALMEIDA W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2148-2154. 2010.

ITOA, C; ITOIGAWAB,M; NAKAOA, K; MURATAC, T; TSUBOI, C; KANEDAC, N; FURUKAWAA, H. Induction of apoptosis by carbazole alkaloids isolated from *Murraya koenigii*. **Phytomedicine**, v 13, p 359–365, 2006.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico “Pau-Pereira”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 39-41,2003.

JASINSKI, T. C. G. **Avaliação morfoanatómica, fitoquímica e biológica de *Baccharis glaziovii* baker (Asteraceae)**, 2016. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

JEUNG, H.C; RHA, S.Y et al. Postoperative adjuvant chemotherapy of gastric cancer: scrutiny into the clinical evidence based on quality assessment of

medical literature of randomized controlled trials. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v 63, n 5, p919-27, mar, 2009.

JORDAN, M.A; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v 4, p 253 - 265, 2004.

JURAYI, J.; HAUGWITZ, D.; V ARMA, R. K.; PAULL, K. D.; BARRETT, J. F.; CUSHMAN, M. Design and synthesis ellipticinium salts and 1,2-dihydroellipticines with high selectivities against human CNS cancers in vitro. **Journal of Medicinal Chemistry**, v 37, p 2190-2197, jul, 1994.

KALIDASS, C; RAMASAMY, V. M; ARJUNAN, D. Effect of auxin and cytokinin on vincristine production by callus cultures of *Catharanthus roseus* L. (APOCYNACEAE). **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v 12, p 283 – 288, 2010.

KANNAN, K; JAIN, S.K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v 3, n 7, p 153-163, 2000.

KANG, G; KIM, G; LEE, H. A phase II trial of paclitaxel, 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. **Cancer research**, v 40, n 3, p 106–110, jan, 2008.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v 26, p 239, 1972.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v 326, p 27–45, 2003.

KIM, D.Y. Phase II study of oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin in previously platinum-treated patients with advanced gastric cancer. **Annals of Oncology**, vol. 3, pag. 383–387, 2003.

KIM, J.H; JEONG, M., LEE, S.S; SONG, J. Camptothecin and topotecan inhibit adipocyte differentiation by inducing degradation of PPARgamma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v 7, p. 1122-1128. 2015.

KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL M.; MERSCH-SUNDERMANN V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v 402, n 1-2, p 185-202, 1998.

KUO, Y. C; KUO, L.P; HSU, L. Y A, CHO, C. Y; LIN, C.C. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells **Life Sciences**, v 78, p 2550 – 2557, 2005.

LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, v 64, p 31–49, 1965.

LEAL, M.F; NASCIMENTO, J. L. M do; SILVA, C. E A da; LAMARÃO, M.F.V; CALCAGNO, D.Q; KHAYAT, A. S; ASSUMPÇÃO, P.P; CABRAL, I.R; SMITH, M. de A, C; BURBANO, R.R. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v 195, p 85 – 91, 2009.

LEIST, M; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v 2, n 8, p 589-98, 2001.

LETASIOVÁ, S; JANTOVÁ, S; CIPAK, L; MÚCKOVÁ, M. Berberine—antiproliferative activity in vitro and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. **Cancer Letters**, v 239, p 254–262, 2006.

LIN, C.S; CHEN, P.C; WANG, C.K; WANG, C.W; CHANG, Y.J; TAI, C.J; TI, C.J. Antitumor Effects and Biological Mechanism of Action of the Aqueous Extract of the *Camptotheca acuminata* Fruit in Human Endometrial Carcinoma Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v 2014, p 10-20, 2014.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.727-734, 2005.

LO, Y.L, HO, C.T; TSAI, F.L. Inhibit multidrug resistance and induce apoptosis by using glycocholic acid and epirubicin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v 35, p 52–67, 2008.

LONGLEY, D.B; JOHNSTON, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, v 2, n 205, p 275-92, 2005.

LORDICK, F; LUBER, B; LORENZEN,S; HEGEWISCH-BECKER,S; FOLPRECHT,G; WÖLLE,E; DECKER,T; ENDLICHER,E; RÖTHLING,N; SCHUSTER,T; KELLER,G; FEND,F; PESCHEL, G. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). **British Journal of Cancer**, v 102, n 3, p 500–505, 2010.

LUGO, Y.O. **Estudo da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e protocianidinas do extrato etanólico e composição química do óleo essencial de *Diospyrus hispida* A. DC.** 63 f. Dissertação (Mestrado Química) – Programa de Pós-Graduação Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

LYNCH, D.A.F.; MAPSTONE, N.P.; CLARKE, A.M.T.; JACKSON, P.; MOAYYEDI, R.; DIXON, M.F.; QUIRKE, P.; AXON, A.T.R. Correlation between epithelial cell proliferation and histological grading in gastric mucosa. **Journal of Clinical Pathology**, v 52, p 367-371, 1999.

MANS, D.R; DA ROCHA, A.B; SCHWARTSMANN, G. Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologists**, v 3, p 185-98, 2000.

MARQUES, J.P; LOPES, G.C. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **Revista Uningá**, v 24, n.1,p 56-61, 2015.

MARSH, S; LIU, G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v 61, n 5, p 381-387. 2009

MARTEL, C de; FORMAN, D; PLUMMER, M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. **Gastroenterology Clinics North of America**, v 42, p 219–240, 2013.

MATUO, M.C.S. **Indução do sistema citocromo P450 em linhagem de hepatoma humano para a utilização como modelo *in vitro* para ao desenvolvimento de fármacos.** 110 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2011.

MBEUNKUI, F; GRACEA, M. H; LATEGAN, C; SMITH, P. J. RASKIN, I; LILA, M.A. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v 139, p 471– 477, 2012.

MEINE, G.C. **Relação entre infecção pelo *Helicobacter pylori* linhagem *cagA*-positiva e risco de câncer gástrico.** 72 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

MERSCH-SUNDERMANN, V; KNASMÜLLER, S.; WU, X.J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v.198, n.1-3, p.329-340, 2004.

MHAIDAT, N.M; BOUKLIHACENE, M; THORNE, R.F. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- $\delta$ . **Oncology Letters**, v 8, p 699-704, 2014.

MILLIKEN, W. Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v 51, p 212-237, 1997.

MINCIS, M; MINCIS, R. Como diagnosticar e tratar o câncer gástrico. **Revista Brasileira de Medicina**, v 65, p 78-84, 2008.

MIRANDA, A.C.C. 58 f. **Avaliação da sensibilidade das linhagens celulares ST, PK<sub>15</sub> e SK<sub>6</sub> ao parvovírus suíno.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Medicina veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

MOLLICA A, A; STEFANUCCI, A; FELICIANI, F; CACCIATORE, I; CORNACCHIA, C; PINNEN, F. Delivery methods of camptothecin and its hydrosoluble analogue irinotecan for treatment of colorectal cancer. **Current Drug Delivery Journal**, v 9, n 2, p 122-131, 2012.

MOREIRA-NUNES, C.A.; BARROS, M.B.L.; BORGES, B.N.; MONTENEGRO, R.C.; LAMARÃO, L.M.; RIBEIRO, H.F.; BONA, A.B.; ASSUMPÇÃO, P.P.; REY, J.A.; PINTO, G.R.; BURBANO, R.R. Genetic screening analysis of patients with hereditary diffuse gastric cancer from northern and northeastern Brazil. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v 12, p 1-8, 2014.

MORRISON. B. J; SCHMIDT, C; LAKHANI, S,R; REYNOLDS, B.A; LOPEZ, J.A. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v 10, n 4, p 1-14, 2014.

MORROW, C. S.; COWAN, K. H. Glutathione S- transferase and drug resistance **Cancer Cells**, v.2, p.15-22. 1990. **Breast Cancer Research**, v 10, p 210 – 224, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v 65, n 1-2, p 55-63, 1983.

MUÑOZ, V. SALVAIN, M; BOURDY, G; CALLAPA, J; BERGERON, S; ROJAS, I; BRAVO, J,A; BALDERRAMA, L; ORTIZ, B; GIMENEZ, A; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v 69, n 2, p127-137, fev, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE<sup>1</sup>. Fluorouracil (Code C505). Massachusetts, 2017 Site do governo federal do Estados Unidos da América que informa sobre pesquisa, diagnóstico e Tratamento do câncer. Disponível em <[https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C505](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C505)> Acesso em: 13 de abril. 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE<sup>2</sup>. Irinotecan (Code C62040): Site do governo federal do Estados Unidos da América que informa sobre pesquisa, diagnóstico e Tratamento do câncer. Disponível em <[https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI\\_Thesaurus&ns=NCI\\_Thesaurus&code=C62040](https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C62040)>. Acesso em: 13 de abril. 2017.

NITISS, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature Reviews/ Cancer**, v 9, p 338- 350, 2009.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v 59, n 6, p 365-78 2009.

OASHIMA, H.; FRIESEN, M.; MALAVEILLE, C.; BROUET, I.; HAUTEFEUILLE, A.; BARTSCH, H. Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products. **Food and Chemical Toxicology**, v 27, p 193-200, 1989.

OKINES, A.; VERHEIJ, M.; ALLUM, W.; CUNNINGHAM, D.; CERVANTES, A. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. v 5, p 50-4, 2010.

OLIVEIRA, R. B de; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v 25, p 976-984, fev, 2002.

OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J.; BRANDÃO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 5, n 2, p 23-31, 2003.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v 11, n 1, p 92-99, 2009.

OLIVEIRA, N.F.P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 10, n. 4, p.493-499, 2010.

OSAKI, M.; TATEBE, S.; GOTO, A.; HAYASHI, H.; OSHIMURA, M.; ITO, H. 5-Fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. **Apoptosis**, v 2, p 221–226, 1997.

PAOLETTI, C.; LE PECQ, B.; DAT-XUONG, N.; JURET, P.; GARNIER, H.; AMIEL, J.L.; ROUESSE, J. Antitumor Activity, Pharmacology, and Toxicity of Ellipticines, Ellipticinium, and 9-Hydroxy Derivatives: Preliminary Clinical Trials of 2-Methyl-9-Hydroxy Ellipticinium. **Cancer Chemotherapy- and Immunopharmacology**, v 74, p 107-123, 1980.

PAROLIN, M.B.; REASON, L.J.M. Apoptose como mecanismo de Lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v 38, n. 2, abr./jun, 2001.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCANTRA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PINHEIRO, D.R.; FERREIRA, W.A.S.; BORGES, B.N. INK4/ARF and gastric carcinogenesis. **Translocational Gastrointestinal Câncer**, v 4, n 4, p 265-271, 2015.

PUBCHEM<sup>1</sup>. Cisplatinum (Code 441203). NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION: Banco de dados gratuito de moléculas *online* da Livraria Nacional de medicina. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441203#section=Top>> Acesso em 12 de fevereiro de 2017.

PUBCHEM<sup>2</sup>. Epirrubicin (Code 41867). NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION: Banco de dados gratuito de moléculas *online* da Livraria Nacional de medicina. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41867>> Acesso em 12 de fevereiro de 2017

RAMOS, J.A.B. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico e genotóxico do e-2-benzothiazol em células normais e tumorais**. 2012, 61 p. Monografia (Graduação). Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de Biomedicina, 2012.

RAPOPORT, H. et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. **Journal of the American Society**, v 80, n 7, p 1601-1604, 1957.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. 1ª. ed., Ulbra, Canoas, 356 p, 2003.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**, 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1.277 p, 1996.

ROSALES-HERNANDEZ, M.C; BERMÚDEZ-LUGO, J; GARCIA, J; TRUJILLO-FERRARA, J; CORREA-BASURTO, J. Molecular modeling applied to anti-cancer drug development. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v 9, n 2, p 230-238, 2009.

SALVADORI, DAISY MARIA FÁVERO; MARQUES, EDMUNDO KANAN. A importância da mutagênese ambiental. In: **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p 21-27.

SANTOS, A.S; BURCHUANTI, L.C; NETTO, N.A; MAZON, V.A; MALHEIROS, C.A. adenocarcinoma gástrico. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa**, v 60, p 156- 159, 2015.

SANTOS, C. C.; VOLPATO, R. S. **Toxicidade aguda oral e atividade antimalárica *in vivo* do extrato etanólico das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae)**. 2015. 54 f. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências da Saúde, Belém, 2015.

SARMENTO, R. M. **Avaliação da capacidade antioxidante, proteção da indução de apoptose e fragmentação de DNA de *Annona glabra***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 98 p. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SCHUBERT, M.L. Stomach and duodenum. **Current Opinion in Gastroenterology**, v 23, p 593-594, 2007.

SERRANO, R; THEODORO, T.H; PINHAL, M.A.S. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **Especial Oncologia**, v 71, p 4-10, 2014.

SERTEL S, Y; FU, Y, ZU, Y, REBACZ, B; KONKIMALLA, B, PLINKERT, P.K; KRÄMER, A; GERTSCH, J; EFFERTH, T. Molecular docking and pharmacogenomics of vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. **Biochemical Pharmacology**, v 81, n 6, 723-735, 2011.

SHAH, MA; AJANI, JA. Gastric cancer — an enigmatic and heterogeneous disease. **Revista JAMA**, v 1, p 1753–4, 2010.

SHAHABUDDIN, M.S; NAMBIAR. M; MOORTHY. B.T; NAIK, P.L; CHOUDHARY, B; ADVIRAO, G.M; RAGHAVAN, S.C. A novel structural derivative of natural alkaloid ellipticine, MDPSQ, induces necrosis in leukemic cells. **Investigational New Drugs**, v 29, p 523–533, 2011.

SHERR, C.J. Ink4-Arf locus in cancer and aging. Wiley Interdiscip. **Review of Cell and Developmental Biology**, v 1, p 731-41, 2012.

SHI, L.M; FAN, YI; MYERS, T.G; O'CONNOR, P.M; D. PAULL, K; FRIEND, S.H; WEINSTEIN, J.N. Mining the National Cancer Institute Anticancer Drug Discovery Database: Cluster Analysis of Ellipticine Analogs with p53-Inverse and Central Nervous System-Selective Patterns of Activity. **Molecular Pharmacology**, v 53, p 241-251, fev, 1998.

SILVA-SILVA, J. V. **Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividade Antileishmania de Espécies *Geissospermum* (Apocynaceae)**. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. (nome do cap. Do livro). In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2004.

SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World Journal Gastroenterology**, v 12, p 2979-90, 2006.

SOUZA, E.L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus***. (Mart.) Plamel - APOCYNACEAE (JANAGUBA). 93 f. (Dissertação mestrado),

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, F.O; ANTUNES, L.C.M; SANTOS, L.H.R. dos. Palliative treatment of gastric adenocarcinoma. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CIRURGIA DIGESTIVA. **Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva**, vol. 24(1), p74-80, 2011.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, M.; LIEBSCH, M.; HALLE, W., Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**, v 27, p 957-966, 1999.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing in vitro-what we know and what we need to know. **Environmental Health Perspectives**, v 106, p.559-569, 1998.

PRICE, P.M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v.286, p 378-84, 2004.

STEELE, J.C.P.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHURST, D.C. Indole and  $\beta$ -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*. **Journal Natural Products**, v 65, p 85-88, 2002.

STIBOROVÁ, M; RUPERTO VÁ, M; FREI, E. Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 1814, p 175–185, jan, 2011

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry**. London Academic Press, 1991. p 71-133.

TAKEI, T; KUGE, Y; ZHAO, S; SATO, M; STRAUSS, H. W; BLANKENBERG, F.G; TAIT, J.F; TAMAKI, N. Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of  $^{99m}\text{Tc}$ -Annexin V,  $^{18}\text{F}$ -FDG, and histologic evaluation. **Journal of Nuclear Medicine**, v 46, p 794–799, 2005.

TANIDA, S; MUMIZOSHITA, T OZEKI, K; TSUKAMOTO, H; KAMIYA, T; I KATAOKA, H; SAKAMURO, D; JOH, T. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. **International Journal of Surgical Oncology**, v 2012, p 8, 2012.

THOMPSON, E.B. The many roles of c-Myc in apoptosis. **Annual Review of Physiology**, v 60, p 575-600, 1998.

TONG, D, POOT, M, HUC, D; ODA, D. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. **Oral Oncology**, v 36, p 236-241, 2000.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v 26, p 405 - 416, 2001.

TUBIANA, M. Généralités sur la cancérogenèse. **Comptes Rendus Biologies**, v 331, p 114-125, 2008.

VANDRESEN, F; SOUZA, M. R. P; BRITTA, E; SILVA E. L; CARVALHO J. E; RUIZ, A. L. T. G; NAKAMURA, C. V; SILVA, C. C. Avaliação das Atividades Antiproliferativa e Antileishmania de 2-amino-5-aryl-1,3,4-tiadiazóis Derivados do *R*-(+)-limoneno. **Revista Virtual Química**, v 9, n 3, p 1285-1302, 2017.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v 27, p 1-7, 2006.

VENKITARAMAN, A.R. Cancer Suppression by the Chromosome Custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science**, v 343, p 1470-1475, 2014.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v 29, n 2, p 326-337, 2006.

VIEGAS, G.S. **Avaliação da morte celular e da indução autofágica em linhagem de adenocarcinoma gástrico por meio do tratamento combinado *in vitro* com 5-Flouracila e SMER- 28.** (Monografia) Faculdade de Ciências Biológicas. 30p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

WAGNER, AD; GROTHE, W; HAERTING, J; KLEBER, G; GROTHEY, A; FLEIG, WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. **Journal of Clinical Oncology**, v 24, p. 18, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report: 2014.** Disponível em: < <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014> > Acesso em 03 de maio de 2016.

YAKIREVICH, E; RESNICK, MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. **Gastroenterol Clinics of North America**, v 42, p 261-84, 2013.

YI, H; CHO, H.J; CHO, S.M.; JO, K; PARK, J.A; LEE, S.H; CHANG, B.J; KIM, J.S; SHIN, H.C. Effect of 5-FU and MTX on the expression of drugresistance related cancer stem cell markers in non-small cell lung cancer cells. **The Korean Journal**, v. 16, p.11–16. 2012.

YU, J; CHEN, Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. **Pharmaceutical Biology**, v 52, n 1, p 36-43, 2014.

ZILBERSTEIN, B; MALHEIROS, C; GOMES, L; KASSAB, P; JACOB, C.E; WESTON, A.C; BRESCIANI, C.J.C; CASTRO, O; GAMA-RODRIGUES, J. Consenso brasileiro sobre câncer gástrico: diretrizes para o câncer gástrico no

brasil. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CANCER GÁSTRICO. **Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva**, v 26, p 2-6, mar, 2013.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **Physiology**, v 19, p 124-128, 2004.