

DANIELLE BOGO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPOSTOS DE LIQUENS

CAMPO GRANDE

2012

DANIELLE BOGO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPOSTOS DE LIQUENS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina Toffoli Kadri

CAMPO GRANDE

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELLE BOGO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
COMPOSTOS DE LIQUENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Doutor.

Resultado _____

Campo Grande (MS), ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos

Instituição: Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da UFMS.

Prof. Dra. Zaira da Rosa Guterres

Instituição: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Adilson Beatriz

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Eric Schmidt Rondon

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Renata Trentin Perdomo

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
(Suplente)

Dedicatória

Dedico esta importante conquista à Sabedoria Divina, que sempre se fez presente:

Na minha intenção de fazer o certo e o melhor,

Nas pessoas que eu convivi durante todo este tempo,

Nas lições que aprendi conhecendo colegas, ajudando e sendo ajudada,

No crescimento profissional e pessoal ao longo desta caminhada

Na luz que surgia quando tudo parecia escuro,

Na força que me empurrava para frente quando o desânimo não me permitia avançar,

Na alegria que sentia em cada resultado alcançado,

No conhecimento e apoio dos professores que orientaram este estudo.

Na conquista de mais um ideal em minha vida.

Ao meu anjo da guarda, meu zeloso guardador, que me ilumina e protege agora e sempre.

Aos meus pais Dante e Célia, por tudo que me ensinaram, pelo Amor que me tornou o que sou hoje, pela gratidão que sinto por vocês. Obrigado pelo sentido maravilhoso de família que vocês me mostraram. Eu também os amo.

Dedico todo meu amor a você Paulo, minha alma gêmea e meu amor, pelo incentivo, pelo companheirismo, por todas as demonstrações de amor e carinho que recebi nestes anos em que trilhei este caminho.

Dedico toda alegria de ter conseguido chegar até aqui a você Ian, meu filho querido e muito amado, luz da minha vida. Desejo que em breve você possa sentir o prazer da conquista, principalmente quando se trabalha com esforço e dedicação.

À nossa querida Andressa, “maninha do Ian”, o meu carinho e apreço!

Eu os amo muito!!!! Sou muito feliz pela família que Deus me presenteou.

À minha irmã Vanessa Bogo, pelos momentos de apoio, carinho e confiança. A você Tita e ao meu cunhado Mário Sérgio, pelo carinho e amor incondicional ao Ian, dedico também esta minha vitória.

Gostaria de dedicar este trabalho aos que sofrem com o câncer, seus familiares e amigos e também a todos os profissionais de saúde que de uma forma ou de outra acompanham a dor e o sofrimento de quem tem esta doença tão agressiva e angustiante. Que a misericórdia Divina esteja sempre presente em vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos coordenador do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e demais professores deste programa. A Vera Nascimento Silva e Áurea Soares Gobi pela solicitude e simpatia em que me atenderam nas diversas vezes em que precisei.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo financiamento do Projeto de Pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo, contribuindo para o desenvolvimento deste estudo.

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos a minha orientadora Profa. Maria de Fatima Cepa Matos. Pelos anos de convívio, desde a graduação, como professora na disciplina de hematologia, no mestrado, como minha orientadora e também no doutorado. Obrigada por dividir comigo seus conhecimentos, sua experiência, pela confiança em me acolher no laboratório de Cultura de Células e pela oportunidade que você me deu de crescimento profissional e pessoal, compreendendo minhas limitações, mesmo que às vezes contrariada. Gostaria de externar o meu respeito pelo seu trabalho e todas as conquistas advindas dele. Saiba que sempre trabalhei com carinho e consideração, pois reconheço quanto você se dedicou para tornar realidade o laboratório de Cultura de Células. Agradeço a você professora Fatima, de coração, e desejo que as bênçãos divinas sempre te acompanhem.

À minha coorientadora profa. Mônica Cristina Toffoli Kadri, pelos valiosos ensinamentos que recebi, fazendo-me vislumbrar caminhos dentro de meu estudo, que eu jamais pensara... agradeço todo seu empenho, sua compreensão e paciência. Que a minha gratidão espelhe meu carinho e admiração.

À querida professora Neli Kika Honda, pelo seu exemplo de pessoa e profissional. Agradeço pela parceria, ao fornecer os compostos de líquens e por compartilhar comigo seus conhecimentos, sua experiência e sabedoria. Foi sempre um imenso prazer ouvi-la, sou grata pelas palavras de incentivo e amizade, principalmente nos momentos em que tudo parecia estar tão difícil. Seu entusiasmo e disposição demonstrados nos estudos com líquens despertaram em mim um carinho especial por estes seres vivos que tanto colaboraram na minha caminhada profissional... A você professora Neli, toda minha gratidão, admiração e apreço.

Ao professor Dr. João Ernesto de Carvalho da Universidade Estadual de Campinas pelo suporte técnico, pelos valiosos ensinamentos e experiências tanto sobre culturas celulares, como também em ensaios com animais e pela doação das linhagens de células usadas neste estudo.

Ao professor Carlos Eurico dos Santos Fernandes, pela transmissão dos conhecimentos na área de patologia, pela troca de ideias, pelas orientações... obrigada!

À professora MS. Maria Auxiliadora, pela importante colaboração no estudo histopatológico. Dorinha obrigada pela sua paciência e solicitude, suas orientações foram preciosas para enriquecer meus conhecimentos.

Aos professores doutores, membros da banca examinadora: Zaira da Rosa Guterres, Adilson beatriz, Carla Cardozo Pinto de Arruda e Eric Schmidt Rondon, meus sinceros agradecimentos pelas valiosas considerações e sugestões feitas na tese.

Às acadêmicas (bolsistas IC) que participaram na preparação das substâncias utilizadas neste estudo: Deyse dos Santos Freitas, Nathália Misuko Oyama, Kerolayne Gonçalves e Cristiane Regine Vieira Rivarola. Muito obrigada!

Às colegas do LAC – Laboratório de Análises Clínicas da UFMS, Regina, Rita, Liliane e Débora, minha gratidão pelo trabalho que vocês desempenharam e por todos os favores prontamente prestados, pelo convívio divertido e alegre em todos estes anos.

Ao Cláudio Gonçalves Oliveira, técnico do setor de Histologia da UFMS, pelo auxílio na confecção das lâminas de histologia.

Às minhas queridas amigas Evelyn e Mirela, pela amizade que me fortalece, pelo apoio e carinho que recebi durante esta caminhada.

Às minhas colegas Iane, Mirela e Ana Camila Michelletti, pela parceria nos artigos, contribuindo para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao meu colega Márcio, técnico do laboratório de Biofarmacofisiologia, meu especial agradecimento pela imensa ajuda que recebi no manejo com os animais. Seria muito difícil e posso dizer impossível realizar os experimentos nos animais sem a sua ajuda, por isso, minha imensa gratidão. Que Deus te abençoe sempre...

Ao Valter José da Silva, do laboratório de Biofarmacofisiologia pelo auxílio com os animais e solicitude.

À minha amiga Laura, em especial, pela sua presença companheira, positiva e muito necessária. Você contribui muito para a realização destes ensaios, ensinando-me e auxiliando-me na confecção das lâminas de histologia e participando dos ensaios *in vivo*. Agradeço de coração pelo seu empenho e solicitude.

À minha colega Dra. Adriana Elias Pires Quevedo, Pós-doutoranda no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), UFMS. Pelo auxílio na elaboração dos gráficos dos ensaios *in vivo* e pelo seu exemplo de força, serenidade e competência. Obrigada pelos exemplos de vida que você me passou.

À minha querida amiga Lyara, meu sincero obrigada! Foi muito bom tê-la como colega de laboratório. Seu exemplo de persistência e luta por um ideal foram lições muito importantes que aprendi. Sou grata pela sua amizade e pela disponibilidade em sempre querer ajudar...

À minha colega, doutoranda do Programa de pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-oeste, Priscila de Matos Cândido Bacani. Sua experiência com animais foi providencial no momento em que eu mais precisava. Muito obrigada...

À Dra. Renata Trentin Perdomo, pelo convívio nestes anos de doutorado, pela sua solicitude em transmitir os conhecimentos aprendidos em Campinas, ajuda sempre bem vinda nos experimentos e pela amizade. Aprendi muito com você!

À Marilin e Júlia, mestrandas e amigas de laboratório, agradeço pelo auxílio que recebi de vocês, pelos favores prestados, pela convivência agradável que tivemos e pela amizade. Também, meus agradecimentos aos colegas da Biologia Molecular, Manoel, Andressa, Adriana e Kelly.

À Thelma e Ingrid (Biotério da UFMS), pelo apoio e solicitude em me atender sempre, pelo profissionalismo e dedicação. Agradeço pelas orientações recebidas em que muito aprendi.

Meus agradecimentos a Alessandra Regina Borgo, pelo seu profissionalismo e empenho ao me auxiliar nos levantamentos bibliográficos.

Minha gratidão ao pós-graduando Rafael Bezerra Cavalcante, pela disponibilidade em me ensinar a trabalhar com o programa ImageJ, enriquecendo com isso, meu estudo.

Por último, mas não menos importante, aos animaizinhos, fundamentais para este estudo, o meu reconhecimento e respeito.

“Meu anjo me disse uma vez, que existem muitos anjos disfarçados aqui na Terra”.

Ele tinha razão, tive a sorte de me deparar com muitos deles. Anjos porque ora me iluminavam guiando meus passos, ora me ofereciam uma mão amiga, ora secavam minhas lágrimas, ora apareciam do nada e resolviam problemas que pareciam impossíveis de serem resolvidos...ou surgiam nos momentos em que eu mais precisava de ajuda. Alguns passaram, outros ficaram... mas para todos eles deixo a minha gratidão!!!!

Foram anos de caminhada, muitos caminhos e muitas pessoas... Cada uma delas teve sua participação na realização deste estudo. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Em agradecimento a todos, gostaria de deixar uma oração especial.

Antiga Bênção Celta

*Que o caminho venha ao teu encontro.
Que o vento sempre sopra às tuas costas
e a chuva caia suave sobre teus campos.
E até que voltemos a nos encontrar,
que Deus te sustente suavemente na palma de sua mão.*

*Que vivas todo o tempo que quiseres
e que sempre possas viver plenamente.
Lembra sempre de esquecer as coisas que te entristeceram,
porém nunca esqueças de lembrar aquelas que te alegraram.*

*Lembra sempre de esquecer os amigos que se revelaram falsos,
porém nunca esqueças de lembrar aqueles que permaneceram fiéis
Lembra sempre de esquecer os problemas que já passaram,
porém nunca esqueças de lembrar as bênçãos de cada dia.*

*Que o dia mais triste de teu futuro
não seja pior que o dia mais feliz de teu passado.
Que o teto nunca caia sobre ti
e que os amigos reunidos debaixo dele nunca partam.*

*Que sempre tenhas palavras cálidas em um anoitecer frio,
uma lua cheia em uma noite escura,
e que o caminho sempre se abra à tua porta*

*Que vivas cem anos, com um ano extra para arrepender-te.
Que o Senhor te guarde em sua mão, e não aperte muito seus dedos.*

*Que teus vizinhos te respeitem, os problemas te abandonem,
os anjos te protejam, e o céu te acolha.
E que a sorte das colinas Celtas te abrace.*

*Que as bênçãos de São Patrício te contemplem.
Que teus bolsos estejam pesados e teu coração leve.
Que a boa sorte te persiga, e a cada dia e
cada noite tenhas muros contra o vento,
um teto para a chuva, bebidas junto ao fogo,
risadas que consolem aqueles a quem amas,
e que teu coração se preencha com tudo o que desejas.*

*Que Deus esteja contigo e te abençoe,
que vejas os filhos de teus filhos,
que o infortúnio te seja breve e te deixe rico de bênçãos.*

*Que não conheças nada além da felicidade, deste dia em diante.
Que Deus te conceda muitos anos de vida;
com certeza Ele sabe que a terra não tem anjos suficientes...
...e assim seja a cada ano, para sempre!*

RESUMO

Bogo D. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de líquens. Campo Grande; 2012. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Muitas substâncias isoladas de líquens apresentam atividades biológicas, e algumas demonstraram ser fontes promissoras de drogas antitumorais. Modificações estruturais simples a partir dessas substâncias bioativas podem levar a potencialização da atividade apresentada. Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade antiproliferativa e seletividade dos seguintes compostos isolados de líquens: atranorina, ácidos difractaico, divaricático, perlatólico, psorômico, norstítico, protocetrário e fumarprotocetrário e derivados alquílicos. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com corante sulforrodamina B em sete linhagens de células neoplásicas e uma linhagem de células normais (3T3). O estudo também avaliou a atividade anticâncer *in vivo* do ácido protocetrário sobre o melanoma B16-F10 em camundongos C57BL/6N. O ácido protocetrário foi ativo em células HEP₂ (15,4 µg/mL), tendo seus derivados alquílicos apresentado atividades moderadas – ácido 9'-*O*-etil-protocetrário em HEP₂: 33,7 µg/mL; 9'-*O*-*n*-propil e 9'-*O*-isopropil-protocetrário em HT-29: 27,3 e 29,2 µg/mL, respectivamente; e 9'-*O*-*sec*-butil-protocetrário em UACC-62: 27,4 µg/mL. As modificações estruturais no ácido protocetrário não potencializaram, portanto, sua atividade antiproliferativa. Já os derivados alquílicos do ácido norstítico apresentaram forte atividade, com destaque para o ácido 8'-*O*-isopropil-norstítico (GI₅₀ ≤ 4 µg/mL) em células PC-03, UACC-62 e HEP₂. Também se mostraram ativos e com altos índices de seletividade (IS) em células MCF7 os ácidos 8'-*O*-*n*-butil norstítico e 8'-*O*-*sec*-butil norstítico, este último com IS de 87,4. Os ácidos divaricático, perlatólico e difractaico apresentaram atividade entre forte e moderada, enquanto a atranorina, o ácido psorômico e o ácido fumarprotocetrário foram inativos nas linhagens testadas. No modelo de melanoma murino, o ácido protocetrário na concentração de 22,5 mg/animal inibiu 96,63% do crescimento tumoral em relação ao controle (p < 0,05). Os resultados indicam que, tanto no modelo *in vitro* quanto no *in vivo*, houve na maior concentração testada, inibição de aproximadamente 100% no crescimento tumoral pelo ácido protocetrário.

Palavras-chave: citotoxicidade, seletividade, melanoma murino, líquens.

ABSTRACT

Bogo D. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of lichen-derived compounds. Campo Grande, MS, Brazil; 2012. [Doctoral dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Many compounds isolated from lichens exhibit biological activity, and a number of them are proven sources of antitumor drugs. Even simple structural changes to these bioactive compounds can lead to potentiation of their activity. The purposes of this study were to evaluate the antiproliferative activity and selectivity of the following compounds isolated from lichens: atranorin; diffractaic, divaricatic, perlatolic, psoromic, norstitic, protocetraric, and fumarprotocetraric acids; and alkyl derivatives. Cytotoxicity tests based on the sulforhodamine B dye were performed on seven lines of neoplastic cells and one line of normal cells (3T3). Also evaluated was the *in vivo* anticancer activity of protocetraric acid against B16-F10 melanoma in C57BL/6N mice. Protocetraric acid was active against HEP₂ cells (15.4 µg/mL), but its alkyl derivatives exhibited moderate activity levels—namely, 33.7 µg/mL for 9'-*O*-ethyl-protocetraric acid on HEP₂; 27.3 and 29.2 µg/mL for 9'-*O*-*n*-propyl- and 9'-*O*-isopropyl-protocetraric acids, respectively, on HT-29 cells; and 27.4 µg/mL for 9'-*O*-*sec*-butyl-protocetraric acid on UACC-62 cells. The structural changes to protocetraric acid did not potentiate its antiproliferative activity, yet the alkyl derivatives of norstitic acid proved strongly active, particularly in the case of 8'-*O*-isopropyl-norstitic acid ($GI_{50} \leq 4$ µg/mL) tested against PC-03, UACC-62, and HEP₂ cells. Also active, and exhibiting high selectivity against MCF7 cells, were 8'-*O*-*n*-butyl-norstitic and 8'-*O*-*sec*-butyl norstitic acids, the latter with a selectivity index of 87.4. The activity of divaricatic, perlatolic, and diffractaic acids ranged from high to moderate, whereas atranorin and psoromic and fumarprotocetraric acids were inactive against the strains tested. In the murine melanoma model, protocetraric acid at a concentration of 22.5 mg per animal inhibited 96.63% of tumor growth, relative to controls ($p < 0.05$). The results revealed that protocetraric acid caused nearly 100% inhibition of tumor growth at the highest concentration tested, both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: cytotoxicity, selectivity, murine melanoma, lichens.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Ácido Protocetrárico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GI50	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
LC50	Concentração para matar 50% das células
NCI	National Cancer Institute
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
SC	Subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
T0	Tempo zero
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Concentração que inibe 100% do crescimento celular
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
U.V	Ultra violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por gênero, exceto pele não melanoma.....	21
Tabela 2 - Valores de GI ₅₀ * (µg/mL e µM) para as substâncias (1) – (8) e doxorrubicina (controle positivo).....	53
Tabela 3 - Índice de Seletividade (IS)* para as substâncias (1)–(8).....	54
Tabela 4 - Valores de GI ₅₀ * (µg/mL e µM) para os derivados alquílicos do ácido norstíptico e doxorrubicina (controle positivo).....	66
Tabela 5 - Índice de Seletividade (IS)* dos derivados alquílicos do ácido norstíptico...	67
Tabela 6 - Valores de GI ₅₀ * (µg/mL e µM) para os derivados alquílicos do ácido protocetrário e doxorrubicina (controle positivo).....	74
Tabela 7 - Índice de Seletividade (IS)* dos derivados do ácido protocetrário.....	75
Tabela 8 - Valores referentes ao Peso, Volume Tumoral e Área dos nódulos obtidos dos camundongos C57/Bl6 após tratamento com diferentes concentrações de ácido protocetrário.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do ciclo celular.....	24
Figura 2 - Crescimento de um tumor maligno primário.....	25
Figura 3 - Representação das Estruturas Químicas das substâncias (1) – (8).....	51
Figura 4 - Fórmula estrutural da doxorubicina.....	52
Figura 5 - Atividade antiproliferativa da atranorina (1) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	55
Figura 6 - Atividade antiproliferativa do ácido difrácico (2) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	56
Figura 7 - Atividade antiproliferativa do ácido divaricático (3) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	57
Figura 8 - Atividade antiproliferativa do ácido perlatólico (4) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	58
Figura 9 - Atividade antiproliferativa do ácido psorômico (5) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	59
Figura 10 - Atividade antiproliferativa do ácido norstítico (6) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	60
Figura 11 - Atividade antiproliferativa do ácido protocetrário (7) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	61
Figura 12 - Atividade antiproliferativa do ácido fumarprotocetrário (8) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	62
Figura 13 - Representação das estruturas químicas de etoposídeo, podofilotoxina, predinisona e cortizol.....	64
Figura 14 - Derivados alquílicos do ácido norstítico (9) –(15).....	65

Figura 15 - Atividade antiproliferativa da doxorubicina frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,025; 0,25; 2,5; 25µg/mL), durante 48h.....	65
Figura 16 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido norstíctico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	68-71
Figura 17 - Derivados alquílicos do ácido protocetrário (16) –(22).....	73
Figura 18 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido protocetrário frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.....	77-80
Figura 19 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações do ácido protocetrário sobre o crescimento dos nódulos tumorais em camundongos C57/B16 inoculados com células B16-F10 (melanoma murino).....	82
Figura 20 - Nódulo hipodérmico na região do dorso de camundongo C57BL/6 tratado com PBS.....	83
Figura 21 - Percentagem de inibição do peso (A), volume (B) e área (C) dos nódulos tumorais induzidos pelas células B16-F10 após o tratamento com diferentes concentrações de ácido protocetrário em camundongos C57/BL6.....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Câncer	20
2.2 Cultura de Células	26
2.3 Ensaio de Citotoxicidade	29
2.4 Melanoma	31
2.5 Modelos Experimentais para Estudo de Melanoma	34
2.6 Líquens	36
2.6.1 Atividade anti-tumoral.....	38
3 OBJETIVOS	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Material botânico, Extração, Isolamento dos Compostos e Modificação Estrutural	42
4.1.1 Extração e isolamento dos compostos	42
4.1.2 Modificação estrutural	43
4.2 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vitro</i> dos compostos	43
4.2.1 Cultura de células.....	43
4.2.2 Teste de citotoxicidade.....	44
4.2.3 Índice de Seletividade.....	45
4.3 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vivo</i> sobre o melanoma B16 F10	46
4.3.1 Animais.....	46
4.3.2 Triagem dos compostos.....	46
4.3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	48
4.4 Análise estatística	49

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	51
5.2 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vivo</i> do ácido protocetrárico sobre o melanoma B16 F10	72
5.2.1 Ensaio <i>in vivo</i> com Ácido Protocetrárico.....	81
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXO – Carta de Aprovação do Comitê de Ética	111

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2012).

Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada a pesquisas de produtos naturais, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada à uma fonte natural. Dada a biodiversidade do país, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

Historicamente, o século XX representou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente no campo da oncologia, o que resultou no desenvolvimento de fármacos como: 1) vimblastina e a vincristina e os análogos vindesina e vinorelbina; 2) paclitaxel e o análogo docetaxel; 3) podofilotoxina e seus análogos, etoposídeo e teniposídeo e a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tipos de tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (PINTO *et al.*, 2002).

Algas, fungos, líquens e plantas superiores representam importantes fontes para pesquisas de novas moléculas bioativas. As substâncias do metabolismo secundário destacaram-se como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Muitas substâncias isoladas de líquens apresentaram atividades biológicas e algumas demonstraram ser fonte promissora de drogas antitumorais. Modificações estruturais simples a partir destas substâncias bioativas podem levar à potencialização da atividade apresentada (MÜLLER, 2001; MOLNAR; FARKAS, 2009; MICHELETTI *et al.*, 2009; BOGO *et al.*, 2010, BOUSTIE; TOMASI; GRUBE, 2011).

A modificação estrutural de substâncias tem sido uma ferramenta importante na descoberta de novas drogas. Compostos com atividade biológica podem apresentar características indesejáveis, como toxicidade e baixa solubilidade. A estrutura dessas substâncias pode ser modificada com o objetivo de aumentar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades indesejáveis (SILVERMAN, 1992).

Na avaliação da atividade antiproliferativa, os testes de citotoxicidade *in vitro* com células neoplásicas são os mais amplamente utilizados (HOLBECK, 2004; SKEHAN *et al.*, 1990). Neste ensaio é possível avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, possibilitando a descoberta de novas drogas anticâncer (SUGGITT *et al.*, 2005).

A atividade citocida seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente *in vivo*, pois, neste ensaio as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são consideradas, ao contrário do que acontece com os ensaios *in vitro*. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é indicado para uma avaliação mais completa a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (SMITH *et al.*, 2005).

Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral é o de melanoma murino, permitindo a avaliação de substâncias quanto ao seu potencial anticâncer. Assim, dando continuidade aos estudos com produtos naturais, o objetivo deste trabalho é a avaliação da atividade de substâncias isoladas de líquens e de alguns produtos de modificação estrutural. Também é proposto um estudo utilizando o modelo experimental de melanoma murino, com a linhagem B16 F10, em camundongos C57BL/6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer é o termo comum para todos os tumores malignos. Neoplasia é definida pelo patologista Rupert Willis, 1930 como uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede ao crescimento dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que originaram a mudança. A persistência dos tumores resulta de alterações genéticas hereditárias que vão desde a progênie das células tumorais. Hipócrates (460 a 370 a.C.) usou o termo "carcinom" para descrever certos tipos de tumores. Em grego, quer dizer "caranguejo", pelo aspecto do tumor, uma vez que as projeções e vasos sanguíneos ao seu redor fazem lembrar as patas do crustáceo (KUMAR *et al.*, 2005). O câncer surge de uma série de mudanças genéticas e epigenéticas (geralmente associadas ao DNA que influenciam a expressão genética) (NCI, 2012).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Inicia-se com uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula, seguida pelo supercrescimento de uma população derivada desta célula e mutações adicionais com seleção clonal, ou seja, seleção de descendentes com vantagens como crescimento mais rápido, maior sobrevivência celular ou outras propriedades (COOPER, 2001; DEVLIN, 2007; RANG *et al.*, 2004).

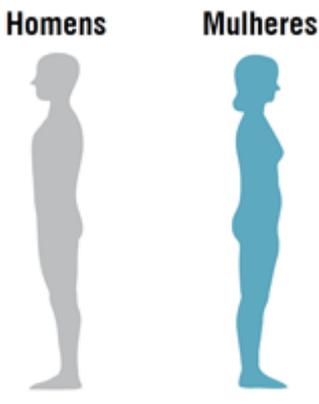
Atualmente, o câncer apresenta relevância pelo perfil epidemiológico, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor e, com isso, o tema tem conquistado espaço nas agendas políticas de todas as esferas de governo, bem como despertado o interesse urgente no desenvolvimento de novos fármacos com ação anticancerígena (INCA, 2012).

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos.

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (Tabela 1). Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Desse modo, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, de próstata, pulmão, cólon e reto e de estômago para o sexo masculino e os cânceres de pele não melanoma, de mama, colo do útero, cólon e reto e da glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2012).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por gênero, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos novos	Percentual		Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%		Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>

No estado de Mato Grosso do Sul, as estimativas para o ano de 2012 indicam 4850 casos novos de câncer para os homens e 4521 para mulheres, sendo os mais incidentes de próstata (1230 casos novos) e mama feminina (740 casos novos).

O câncer é uma doença onde ocorre profunda alteração nos sistemas de regulação da proliferação e de diferenciação celulares. A origem da célula cancerosa é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

Os carcinógenos químicos (particularmente aqueles presentes no tabaco e resultantes de sua combustão e metabolismo), bem como determinados agentes, como os azocorantes, aflatoxinas e benzeno, foram claramente implicados na indução de câncer. Muitos dos agentes carcinogênicos químicos encontram-se no meio ambiente humano e relacionam-se a hábitos sociais, alimentares ou ocupacionais.

Certos vírus de DNA do grupo herpes e papiloma, bem como vírus de ácido ribonucleico (RNA) do tipo C, foram também implicados como agentes produtores de câncer em animais, podendo ser igualmente responsáveis por alguns cânceres no homem. Diversos outros agentes biológicos são suspeitos de promoverem a carcinogênese, entre eles, o *Helicobacter pylori*, uma das bactérias mais prevalentes no homem, responsável pela gastrite crônica. Acredita-se que os agentes carcinogênicos biológicos atuem como promotores da proliferação celular, criando condições propícias para mutações por erros de transcrição do DNA.

A energia radiante, solar e ionizante, é o mais importante carcinógeno físico. O mecanismo da carcinogênese pela radiação reside na sua capacidade de induzir mutações. A radiação ultravioleta natural, proveniente do sol, pode causar câncer de pele. Os RUV-B são carcinogênicos e sua ocorrência tem aumentado muito com a destruição da camada de ozônio. Por sua vez, os RUV-A não sofrem influência da camada de ozônio e causam câncer de pele em quem se expõe a doses altas e por um longo período de tempo.

As predisposições hereditárias também devem ser consideradas, embora em menor número. Menos de 10% dos pacientes portadores de câncer apresentam mutações hereditárias que predis põem ao câncer. Algumas condições clínicas também são importantes, como a replicação celular envolvida na transformação neoplásica; as proliferações regenerativas, hiperplásicas ou displásicas que consistem em um solo fértil à origem de um tumor maligno.

Em 1963, Virchow propôs que o câncer se desenvolve em locais de inflamação crônica, como colite ulcerativa, pancreatite crônica e hepatite viral. Algumas condições não neoplásicas tais como gastrite crônica atrofica da anemia perniciosa, ceratose cutânea solar, colite ulcerativa crônica dentre outras, apresentam associação bem definida com o câncer, denominadas de condições pré-cancerosas (KUMAR *et al.*, 2005).

Considerando o ciclo celular como sendo de fundamental importância no processo de carcinogênese, algumas considerações devem ser feitas. O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. Na fase S, há duplicação do DNA e durante a fase M, segregação de todos os componentes celulares entre as células filhas. As fases G1 e G2 correspondem aos períodos em que as células se preparam para execução das fases S e M, respectivamente. Quando as células não proliferam, elas entram em estado de quiescência, conhecido como G0. A principal função do ciclo celular é garantir que o DNA seja fielmente duplicado durante a fase S e que cópias idênticas dos cromossomos sejam igualmente distribuídas entre as células filhas durante a mitose (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

O ciclo celular é regulado por mecanismos denominados *checkpoints* que protegem a transição entre as fases do ciclo garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros (KHODJAKOV & RIEDER, 2009). A parada nos *checkpoints* permite que as células reparem os defeitos, impedindo a sua transmissão para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (Figura 1) (MALUMBRES & BARBACID, 2009).

Processos oncogênicos ocorrem principalmente em reguladores da progressão da fase G1. No câncer, as células não respondem a estímulos externos que controlam a transição G1/S e, por isso, permanecem no ciclo celular. Como a saída do ciclo celular facilita a maturação e a diferenciação, estes mecanismos também estão prejudicados durante a tumorigênese. Após a passagem do ponto de restrição em G1, a célula se torna comprometida com novo ciclo de divisão, independente dos sinais externos de crescimento. A passagem pelo ponto de restrição é controlada por quinases dependentes de ciclina (CDKs) (SHERR, 1996).

Quando a replicação, a reparação do DNA ou a reunião dos cromossomos for aberrante, as células normais detêm o seu avanço no ciclo celular até que a condição seja corrigida. Porém, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação fica impossível e a célula inicia a apoptose. As alterações do funcionamento de genes controladores do ciclo celular, em decorrência de mutações, são relacionadas ao surgimento de um câncer. Duas classes de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor são

os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular. Os proto-oncogenes são responsáveis pela produção de proteínas que atuam na estimulação do ciclo celular, enquanto os genes supressores de tumor são responsáveis pela produção de proteínas que atuam inibindo o ciclo celular (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Assim, os proto-oncogenes quando ativos estimulam a ocorrência de divisão celular. Os genes supressores de tumor quando ativos inibem a ocorrência de divisão celular. O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular (SANTOS; WADA, 2005). Sendo assim, o desenvolvimento de um câncer envolve um número de diferentes alterações genéticas ocorrendo sequencialmente na célula, incluindo a deleção de genes específicos (genes supressores de tumores), a mutação de oncogenes (que podem transformar células normais em tumorais), além de outras aberrações cromossômicas. Essas mudanças sequenciais estão aparentemente associadas à progressão até maiores graus de malignidade (HILL; TANNOCK, 1992).

Evidências científicas demonstram que a grande maioria dos tumores é originária de uma única célula, então denominados de tumores monoclonais (Figura 2) (PONDER, 1986).

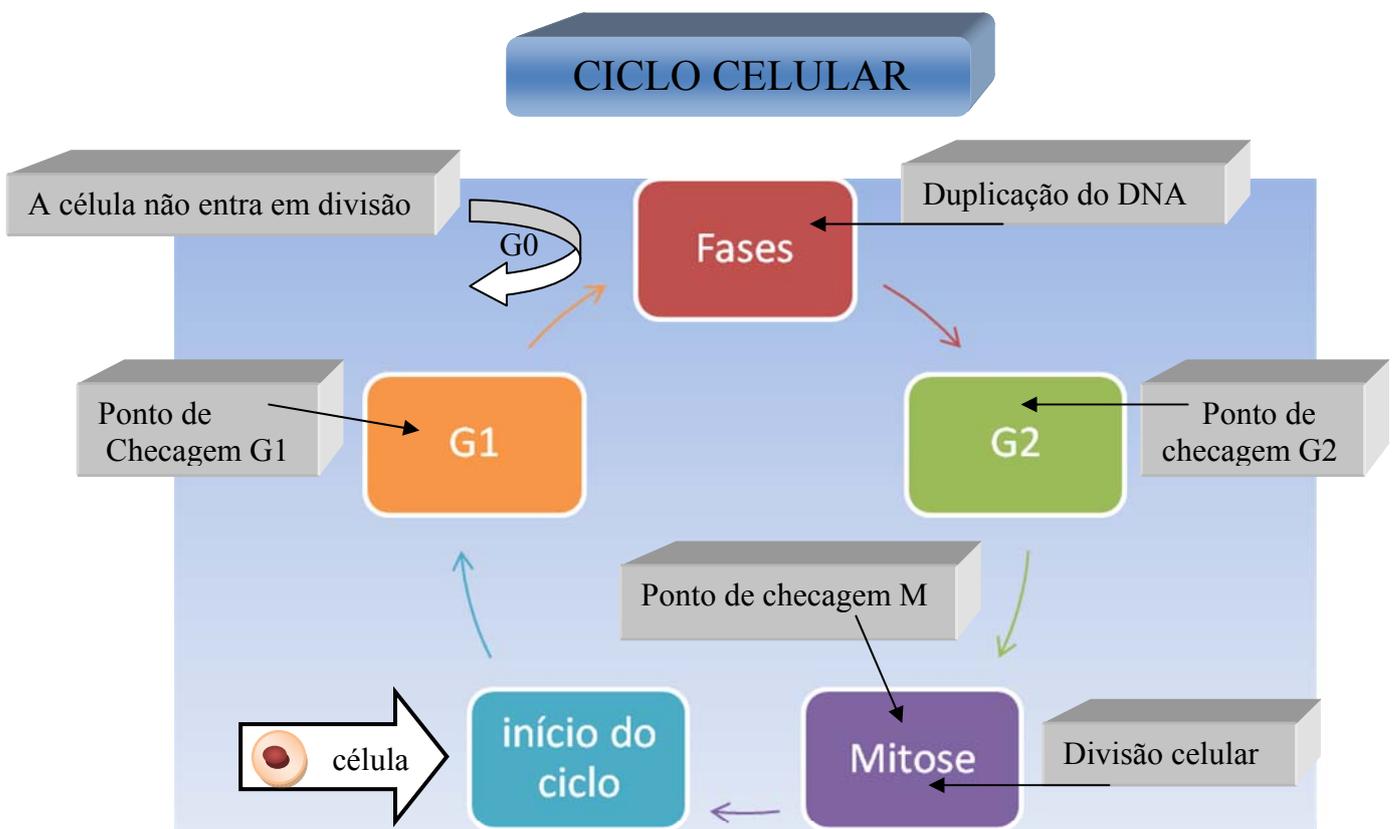


Figura 1 – Esquema representativo do ciclo celular. Adaptado de DE ALMEIDA *et al.*, 2005.

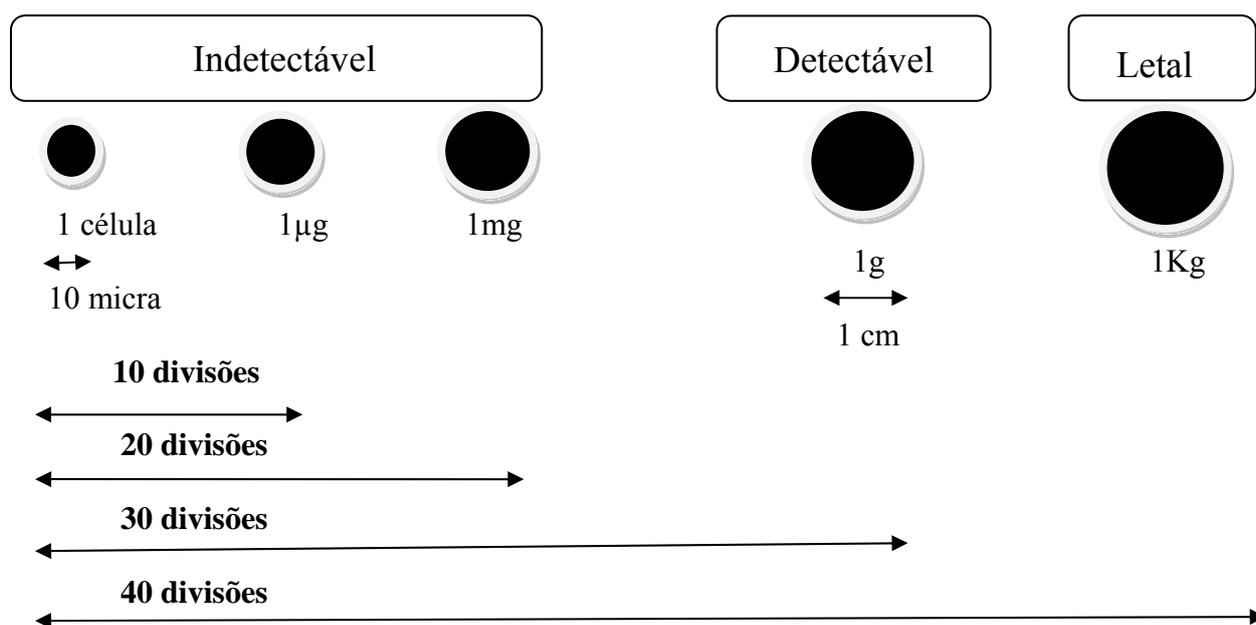


Figura 2- Crescimento de um tumor maligno primário.

Fonte: Adaptado de Schabel (1975, p.15-24) INCA. Fisiopatologia do câncer. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>.

A célula cancerígena caracteriza-se pela perda da função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástases. Em síntese, a carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Como o câncer se desenvolve a partir de mudanças dinâmicas que ocorrem no genoma de uma célula, o acúmulo de anormalidades genéticas é o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica. No entanto, alterações epigenéticas também desempenham papel crítico neste processo (BAYLIN & OHM, 2006). A epigenética estuda mecanismos reguladores da atividade e herança gênica que independem de modificações na seqüência de nucleotídeos do DNA (BAYLIN *et al.*, 2001; DAS & SINGAL, 2004). Os principais eventos epigenéticos descritos correspondem a modificações que ocorrem no próprio DNA e a alterações que se processam na compactação deste polímero e modificações pós traducionais em histonas. (ROTHHAMMER & BOSSERHOFF, 2007).

A metilação do DNA representa a única modificação covalente que ocorre nesta molécula e está relacionada com a inibição da transcrição do gene (McCabe *et al.*, 2005). As modificações nas histonas comprometem a compactação dos nucleossomos. Este “código de histonas” determina a acessibilidade da maquinaria que regula a transcrição gênica ao DNA,

podendo facilitar, dificultar e até mesmo impedir que um determinado gene seja expresso (FISCHLE *et al.*, 2003).

O acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em protooncogenes e em genes supressores de tumor desempenha papel fundamental na neoplasia (BLAGOSKLONNY, 2005).

2.2 Cultura de Células

A capacidade de estudar as células ao nível molecular relaciona-se com a forma como as células podem crescer e ser manipuladas em laboratório. A cultura de células *in vitro* permite estudar o crescimento, diferenciação e morte celular e efetuar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes (ALBERTS *et al.*, 1997).

Sydney Ringer no século XIX, ao desenvolver soluções salinas capazes de assegurar as necessidades vitais de órgãos isolados do organismo, lançou as bases do que viria a ser a cultura de células. Todavia, foi Wilhelm Roux quem conseguiu pela primeira vez, em 1885, manter vivas durante vários dias células embrionárias isoladas de pinto numa solução salina aquecida (LINDEE, 2007).

Ross Harrison, no início do século XX, aplicou a metodologia da cultura de tecidos de modo a estudar o comportamento das células animais quando livres das restrições impostas pelo ambiente em que naturalmente existem em condições de homeostasia, mas também sob o *stress* de uma experiência laboratorial. Estas técnicas, inicialmente aplicadas a fragmentos de tecidos sólidos, sofreram avanços significativos nas décadas de 40 e 50, no momento que a cultura de células previamente dispersadas passou a ter grande divulgação (CRUZ *et al.*, 2009).

As culturas celulares são derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas, então cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido, ou em suspensão em meio de cultura, quando as células não aderem ao substrato (FRESHNEY, 2005). As culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, são chamadas de culturas primárias. Na maioria dos casos, células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um

número razoável de culturas secundárias, podendo ser repetidamente subcultivadas desta forma, por semanas ou meses. Tais células apresentam frequentemente muitas propriedades diferenciadas apropriadas a sua origem (ALBERTS *et al.*, 1997).

Portanto, estudos *in vitro* a respeito da indução e progressão da transformação celular induzida por carcinógenos químicos podem propiciar importantes esclarecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos neste processo e serem de utilidade para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas ou quimioterapêuticas para o uso humano. Além disso, a compreensão dos eventos celulares que acompanham a progressão de transformação até o fenótipo neoplásico resultante oferece a possibilidade de intervenção e prevenção seletivas durante os múltiplos estágios da transformação celular (ZHU; GOODERHAM, 2002).

As vantagens da cultura de células residem no controle físico-químico do pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes. A cada replicação celular as amostras são idênticas e as características da linhagem irão se perpetuar por manter a homogeneidade das amostras. Outra vantagem importante a ser destacada é que para o *screening* de drogas onde se fazem muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é menos custosa economicamente que os testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais desses ensaios (FRESHNEY, 2005).

Com o aprimoramento da cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. A Cell Biology Collection foi instalada em 1962, em resposta à necessidade de autenticação e preocupação com a ausência de contaminação nas linhagens celulares em várias áreas da biologia e medicina. A coleção foi criada através de esforços cooperativos com ATCC, um comitê científico e um Comitê para Coleção de Cultura Celular (NCI, 2012).

ATCC é um centro privado de referência para pesquisa biológica que objetiva a aquisição, autenticação, produção preservação, desenvolvimento e distribuição de microorganismos e de linhagens celulares e outros materiais para pesquisa científica. O programa ATCC de Biologia celular tem servido à comunidade científica internacional, incluindo desde universidades, indústrias e entidades governamentais para uso em pesquisas sobre câncer, descoberta de novas drogas e outras disciplinas biomédicas. Atualmente, esta coleção inclui mais de 3.400 linhagens celulares (humanas, animais e vegetais), 8 milhões de

genes clonados de hospedeiros de várias espécies e inúmeros vetores, além de 2.000 tipos de vírus e 18.000 tipos de bactérias (ATCC, 2012).

O National Câncer Institute (NCI) foi criado em 1937 com objetivo de conduzir pesquisas, treinamento, prevenção, diagnósticos e tratamento do câncer. Coleta, analisa e dissemina os resultados das investigações realizadas nos Estados Unidos e outros países, além de promover aperfeiçoamento de profissionais da área e outros programas direcionados a reabilitação e ao contínuo cuidado com os pacientes e seus familiares. A triagem de novos compostos com atividade anticancer utilizando linhagens celulares neoplásicas contribui de forma expressiva para o desenvolvimento das drogas anticâncer. Em 2010, 12 novas drogas para o câncer foram aprovadas pelo FDA, 348 estão na terceira fase da triagem oncológica, além de 861 medicamentos da indústria em processo de triagem (DPT, 2012).

Pode-se dizer que nos últimos 50 anos, 50% dos quimioterápicos utilizados em oncologia foram descobertos ou desenvolvidos no NCI. Pelo DPT (Developmental Therapeutics Program), as drogas passam por todos os estágios pré-clínicos antes de serem testadas em humanos. Cerca de 400.000 drogas estão sendo triadas pelo NCI, sendo que desde 1990, 80.000 compostos foram testados *in vitro* e *in vivo* (DPT, 2012).

Segundo o NCI, a triagem *in vitro* se inicia com uma pré-triagem em três linhagens tumorais humanas. Caso a droga tenha inibido o crescimento de uma ou mais linhagens esta é automaticamente testada em um painel de 60 linhagens neoplásicas, incluindo pulmão, cólon, melanoma, próstata, ovário, mama e rim em cinco diferentes doses. A seguir, esta droga será testada *in vivo*, utilizando diferentes modelos experimentais (NCI, 2012).

No Brasil, o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE) desde 1989, realiza pesquisas de prospecção de novas moléculas com potencial atividade antitumoral e testes para determinar o potencial anticâncer de moléculas extraídas de plantas, organismos marinhos e microorganismos envolvendo diversas instituições de ensino e pesquisa com vistas à criação da Rede Nacional para Prospecção de Fármacos Anticâncer (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

O programa baseia-se na avaliação da citotoxicidade das amostras em células tumorais humanas. Para esse fim, o LOE conta com um banco de mais de 50 linhagens de células tumorais doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) através de um memorando, assinado em 2001 e renovado em 2006, de transferência tecnológica. As amostras das mais diversas origens, naturais ou sintéticas, são submetidas a um teste em concentração única (50 µg/mL para extratos, 20 µg/mL para frações e 5 µg/mL para

substâncias puras) utilizando três linhagens de tumores sólidos, SF-295 (Sistema Nervoso Central), MDA-MB-435 (Melanoma) e HCT-8 (Cólon), através do método do MTT descrito por Mosmann (1983).

As amostras que inibem seletivamente ou indiscriminadamente a proliferação celular são selecionadas para determinação da eficácia, seletividade e mecanismo de ação do composto, num painel amplo de linhagens. Os ensaios em animais são realizados para comprovação da atividade *in vivo* quando da disponibilidade de material suficiente, e das evidências experimentais que justifiquem seu uso (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

2.3 Ensaios de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para a avaliação de agentes anticâncer, sendo que, pelo menos durante a fase de *screening*, têm reduzido os ensaios *in vivo* em animais. Além disso, são muito utilizados como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (CINGI *et al.*, 1991; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). A citotoxicidade dos compostos é avaliada *in vitro* em linhagens celulares tumorais, sendo tais efeitos verificados por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo (FRESHNEY, 2005; KEAWPRADUB, 1999).

A maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionada por sua capacidade de controlar a proliferação celular (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Desta forma, o ensaio de citotoxicidade em linhagens de células neoplásicas é considerado um parâmetro consistente para a detecção da atividade antitumoral. A metodologia mais utilizada para os testes é realizada por meio dos ensaios de citotoxicidade, usando linhagens celulares. A taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento através da formação do aparecimento de coloração e a intensidade de cor é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

O modelo de culturas de células neoplásicas apresenta vantagens que o torna essencial para o estudo da atividade anticâncer. Entre elas citam-se: condições controladas para o estudo do comportamento das células, teste com amostras em concentração conhecida, no

screening de drogas onde se fazem muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é menos custosa economicamente que os testes *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em ensaios *in vivo*. Outro fator positivo é que são muito utilizadas como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (CINGI *et al.*, 1991; HAMBURGER ; HOSTETTMANN, 1991).

A citotoxicidade das drogas pode ser estabelecida em culturas de células tumorais de várias linhagens através das variações da morfologia celular, viabilidade celular utilizando corantes como o azul de tripan e a eosina, que se baseiam na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante, contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos dentre os quais citam-se: 1) Cristal violeta; 2) MTT (microtetrazolium); 3) Alamar blue e 4) SRB (sulforrodamina B) (HENRIKSSON *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2002). Várias linhagens neoplásicas são utilizadas e, para se verificar a seletividade da droga, utiliza-se linhagens normais (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Para a avaliação da atividade antineoplásica, os testes de citotoxicidade mais utilizados na rotina de triagem de drogas anticâncer pelo NCI para uso em programas de avaliação de drogas anticâncer são: 1) Teste do sal de tetrazolium - MTT (MOSMANN,1983) e 2) Teste da Sulforrodamina B (SRB) (SKEHAN *et al.*, 1990; FRESHNEY, 2005; RUBINSTEIN *et al.*, 1990)

O MTT é um ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis de reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O ensaio detecta células vivas e o sinal gerado é dependente da diminuição de ativação das células. Os resultados são lidos em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). Por outro lado, o SRB cora proteínas dentro das células. Constitui-se em um método simples, sensível, reprodutível, rápido e apresenta estabilidade na cor, podendo-se fazer a leitura das células em espectrofotômetro depois do ensaio e não necessariamente logo após como acontece com MTT. O princípio do ensaio da SRB baseia-se na habilidade que tem este composto de se ligar a componentes protéicos das células, fixados pelo ácido tricloroacético; ou seja, o método independe da atividade metabólica das células, ao contrário do MTT que depende de uma enzima mitocondrial (HOUGHTON *et al.*, 2007).

No método SRB, o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que, em solução fracamente ácida, são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético e dissocia-se em condições básicas (VICHAI *et al.*, 2006).

Hasselrberger *et al.* (1996) relatam uma relação linear quali e quantitativa entre o número de células determinadas pelo SRB e pela contagem celular. Não utilizam o MTT, haja vista que este subestima o número de células nos ensaios e é incapaz de detectar menos de 150 células por poço. O método de SRB é mais sensível na detecção de pequenos números de células, como ocorre com culturas de células humanas de glioma.

2.4 Melanoma

É uma doença genética caracterizada por uma série de alterações acumulativas dos genes que modulam diversos mecanismos relacionados à proliferação celular, morte celular programada, angiogênese e expressão de moléculas de adesão (POMERANTZ *et al.*, 1998).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor. A estimativa para 2012 para novos casos da doença é de 6230, sendo 3170 homens e 3060 mulheres (INCA, 2012).

Os melanócitos humanos normais aderem à membrana basal da epiderme e com seus dendritos, alcançam os queratinócitos nas camadas superiores da epiderme para distribuir seu pigmento, a melanina, que fornece a proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (UV) presente na luz solar cuja síntese ocorre no interior dos melanócitos, tendo a tirosina como precursor (LOTZE *et al.*, 2001).

Quando essas células sofrem a transformação neoplásica, tornando-se malignas, ocorre, então, o melanoma. A maioria dos melanócitos se encontra na pele, o que dá origem ao melanoma cutâneo, podendo, porém, ocorrer nos olhos, meninge, trato digestivo,

linfonodos e em outras áreas (SOBER; KHO, 1995). A coloração pode variar do castanho-claro passando por vários matizes chegando até a cor negra (melanoma típico) ou apresentar área com despigmentação (melanoma com área de regressão espontânea). O crescimento ou alteração da forma deste tumor é progressivo e se faz no sentido horizontal ou vertical. Na fase de crescimento superficial, que é denominada de fase de crescimento radial (FCR), a neoplasia invade a epiderme, podendo atingir ou não a derme papilar superior. Na fase de crescimento vertical (FCV) o seu crescimento é acelerado através da espessura da pele, formando nódulos visíveis e palpáveis e manifesta-se como uma lesão profundamente invasiva, capaz de sofrer metástases precoces (SOBER; KHO, 1995; LOTZE *et al.*, 2001).

Histologicamente, a classificação do melanoma reflete a sua localização e/ou a profundidade do mesmo. Por exemplo, o melanoma *in situ*, caracterizado por um padrão de crescimento radial está confinado primariamente à epiderme. Em contrapartida, a fase de crescimento vertical dos melanomas malignos denota uma transição para uma condição mais agressiva e maligna, a qual é caracterizada pela invasão tumoral ultrapassando a derme e podendo alcançar sítios distantes, levando à metástase. Embora o melanoma tenda a se propagar para sítios não viscerais como pele ou linfonodos, os sítios viscerais mais comumente envolvidos em sua metástase são o pulmão, o fígado, o cérebro, os ossos e o intestino delgado (CHIN *et al.*, 1998)

O melanoma é uma neoplasia agressiva que, no estado disseminado, possui poucas opções eficazes de tratamento com péssimo prognóstico. A sobrevida média do paciente com melanoma metastático é de 6 a 9 meses e a terapia quimioterápica sistêmica atual apresenta resposta significativa em apenas uma minoria dos pacientes (HUNCHAREK *et al.*, 2001; LOTZE *et al.*, 2001; WACK *et al.*, 2001).

O prognóstico do melanoma sofre a interferência de diversas variáveis, incluindo a idade do paciente, sexo, local do tumor primário, espessura do tumor, ulceração do tumor, taxa de mitose das células tumorais, presença de invasão linfovascular, presença de linfócitos infiltrados e presença de metástases nos linfonodos, na pele ou em outros órgãos (LOTZE *et al.*, 2001). Entre estes fatores, a espessura tumoral, a presença de ulcerações e de metástases são considerados como os melhores indicadores para prognóstico (BALCH *et al.*, 2001).

Como os outros tipos de câncer de pele, o melanoma pode ser prevenido, evitando-se a exposição ao sol no horário das 10h às 16h, quando os raios são mais intensos, uma vez que o maior fator de risco para o seu surgimento é a sensibilidade ao sol. Mesmo em outros períodos recomenda-se a utilização de proteção como chapéu, guarda-sol, óculos escuros e

filtros solares. Outros fatores de risco são: a pele clara, a exposição excessiva ao sol, a história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, nevo congênito (pinta escura), maturidade (após 15 anos de idade a propensão para este tipo de câncer aumenta), xeroderma pigmentoso (doença congênita que se caracteriza pela intolerância total da pele ao sol, com queimaduras externas, lesões crônicas e tumores múltiplos) e nevo displásico (lesões escuras da pele com alterações celulares pré-cancerosas) (INCA, 2012).

A cirurgia é o tratamento mais indicado, levando a boas taxas de cura, quando o tumor é detectado e retirado em estágio inicial, porém no estágio disseminado do melanoma o procedimento cirúrgico é ineficaz. A radioterapia e a quimioterapia sistêmica também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Quando há metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos. A estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (LOTZE *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-VICENTE *et al.*, 1998).

No intuito de aumentar a resposta à quimioterapia, tem-se avaliado os efeitos da imunoterapia como terapia adjuvante ao tratamento quimioterápico, a exemplo do uso de citocinas (interferons e interleucinas) que têm apresentado efeitos promissores, porém em apenas uma pequena porcentagem dos pacientes (LOTZE *et al.*, 2001; WACK *et al.*, 2001).

Os agentes quimioterápicos que têm sido amplamente utilizados no tratamento do melanoma metastático são agentes alquilantes (dacarbazina), análogos da platina, nitrosouréias (fotemustina) e toxinas tubulares (vinblastina) (LOTZE *et al.*, 2001).

A quimioresistência aos fármacos é um problema central na terapia do melanoma. Um dos mecanismos mais conhecidos é o de resistência a múltiplas drogas, outro mecanismo é o que utiliza os melanossomas que captam, degradam e externalizam o fármaco impedindo sua ação intracelular (CHEN *et al.*, 1998).

2.5 Modelos Experimentais para Estudo de Melanoma

O modelo *in vivo* tem a importância de confirmar a atividade anticâncer observada em cultura de células, superando as limitações dos modelos *in vitro* (SMITH *et al.*, 2005).

Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral é o melanoma murino, neoplasia altamente maligna, que tem origem no melanoblasto da pele e apresenta boa similaridade com a neoplasia humana (VAN DYKE; JACKS, 2002). Este modelo permite o desenvolvimento e a avaliação de novas drogas e procedimentos terapêuticos (TIETZE; CHIN, 2000). A inoculação subcutânea deste tumor provoca o desenvolvimento de um nódulo hipodérmico que se torna palpável em torno de uma a duas semanas, sendo facilmente mensurado. Esse nódulo evolui para um tumor sólido, podendo chegar a grandes dimensões (JUNQUEIRA *et al.*, 1997).

As linhagens de melanoma murino como B16, K1735, Cloudman S91-M3 e suas sublinhagens são altamente tumorigênicas e frequentemente usadas como modelos de crescimento tumoral *in vivo*. A linhagem K1735 se desenvolve em camundongos C3H através da indução por radiação ultravioleta, a linhagem Cloudman S91-M3 se desenvolve espontaneamente em camundongos DBA/2 e a linhagem B16 cresce espontaneamente em camundongos C57BL/6 (PETER *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2001).

A linhagem B16 parece ser menos invasiva que suas sublinhagens B16-F10 e B16-BL6 e a habilidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16-F0, B16-F1 e B16-F10, que é igual a B16-BL6 (NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001). A linhagem celular MKT-BR pode ser usada como modelo de melanoma ocular e metastático (BLANCO *et al.*, 2000).

Modelos de melanoma em camundongos que possibilitem avaliar o efeito da radiação ultravioleta foram desenvolvidos, assim como modelos animais que utilizam linhagens humanas de melanoma e camundongos imunodeficientes (BERKING; HERLYN, 2001). Camundongos com alterações genéticas similares as observadas no melanoma humano de origem hereditária têm sido utilizadas, bem como, linhagens de camundongos transgênicos e com genes deletados (NOONAN *et al.*, 2003; SOTILLO *et al.*, 2001; TIETZE & CHIN, 2000).

As células de melanoma murino B16-F10 constituem uma ferramenta experimental muito utilizada para o estudo do melanoma, cujo crescimento se dá tanto *in vitro* como *in*

vivo, sendo desenvolvido em camundongos C57/BL6. Esta linhagem foi estabelecida por Fidler (1973) oriunda de melanoma de ocorrência natural em camundongos C57BL/6 que por meio de seleção progressiva, obteve o isolamento de variantes com diferentes graus de potencial metastático. Tais células quando inoculadas por via subcutânea apresentam a capacidade de multiplicação neoplásica sem propiciar o desenvolvimento de metástase, enquanto que quando inoculadas via endovenosa desenvolvem nidação em parênquima pulmonar formando nódulos macroscópicos na superfície dos pulmões passíveis de serem contados (PETER *et al.*, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001).

Começando com melanoma murino de baixo potencial metastático *in vivo*, variantes foram selecionadas por suas características de implantação, invasão, sobrevivência para formar metástase em pulmão, após injeção subcutânea em camundongos. As metástases desenvolvidas em pulmão eram identificadas pela sua pigmentação e retiradas para isolamento de crescimento em cultura. Assim, foi obtida a B16 F1, sendo que tal processo foi repetido por mais nove vezes para obtenção da linhagem B16 F10 com maior potencial metastático (NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001).

Neste modelo animal onde há inoculação de células neoplásicas, as células modificadas vão se multiplicando e formam uma massa tumoral, constituída não só por células transformadas, mas também por outras do hospedeiro como as células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e as células do sistema imunológico, que interagem entre si. A presença do tumor gera uma resposta inflamatória, como uma tentativa do organismo de controlar a doença (TALMADGE *et al.*, 1981). Essa formação, denominada de microambiente tumoral é determinante para o processo de progressão tumoral, e muitas vezes pode impedir o desenvolvimento de nódulos ou metástases, variando de animal para animal (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Por essa razão, o microambiente tumoral é rico em células inflamatórias, especialmente os macrófagos, sendo que estas células podem afetar o desenvolvimento do tumor de várias formas. Lu *et al.*, (2006) afirmaram que macrófagos ativados são recrutados para a eliminação das células transformadas.

Entretanto, pode acontecer na presença do tumor, uma mudança de fenótipo dos macrófagos que passam a estimular a angiogênese pela produção de fatores de crescimento e também geram a ruptura da membrana extracelular, promovendo a progressão e invasão tumoral (SCHÄFER; WERNER, 2008). Desta forma, a ação dos macrófagos em relação ao desenvolvimento do tumor é paradoxal. Ao mesmo tempo em que podem atuar reduzindo a

invasão e geram uma grande quantidade de antígenos, que podem auxiliar no reconhecimento da célula tumoral pelo sistema imunológico, podem, também, gerar o aumento da vascularização, subverter a imunidade e aumentar a produção de elementos facilitadores do crescimento tumoral (BIDARD *et al.*, 2008).

2.6 Líquens

Os líquens constituem uma complexa estrutura simbiótica entre algas ou cianobactérias e fungos. O componente fúngico de um líquen é chamado micobionte e o componente fotossintetizante é denominado fotobionte. Cerca de 98% das espécies de fungos formadores de líquens pertencem aos Ascomycota, as restantes, aos Basidiomycota. (RAVEN, EVERT, EICHHORN 2007). Estão amplamente distribuídos desde as regiões polares às tropicais e das planícies às montanhas mais altas. Crescem em ambientes de muita luminosidade, áridos ou em temperaturas extremas, desfavoráveis para plantas superiores (GALLOWAY, 1993; SHUKLA *et al.*, 2010).

As substâncias produzidas por líquens são divididas em dois grupos: substâncias do metabolismo primário e substâncias especiais do metabolismo secundário. O primeiro grupo de substâncias tem funções estruturais e atua no metabolismo celular, sendo encontradas também em outros organismos vegetais, como produtos resultantes da atividade fotossintética. São aminoácidos, enzimas, pigmentos, poliálcoois, vitaminas e polissacarídeos. Os produtos extracelulares, denominados substâncias especiais do metabolismo secundário são encontrados na medula ou na córtex, raramente em ambas as camadas. Neste último grupo, a grande maioria são envolvidas com fotossíntese (PODTEROB, 2008).

De acordo com suas estruturas químicas, muitas substâncias líquênicas são compostos fenólicos das classes do orcinol e b-orcinol; dibenzofuranos; depsídeos; depsidonas; lactonas; quinonas; derivados do ácido pulvínico e outros (SHUKLA *et al.*, 2010).

Os líquens absorvem e são sensíveis aos metais pesados, sendo usados para o monitoramento de poluição industrial e contaminação ambiental (GARTY, 2001).

Estudos realizados por Fernandes (1996) demonstraram que o ácido divaricático pode atuar como agente protetor contra a radiação U.V., um dos agentes causadores do câncer de pele (FERNANDES *et al.*, 1996; GALLOWAY, 1993).

Os ácidos protoliqueterínico, baeomicésico e lobárico demonstraram ser inibidores da 5-lipoxigenase, enzima importante na modulação do processo imunoinflamatório; o ácido 4-*O*-metilcriptoclorofeico apresenta propriedade inibitória da enzima prostaglandina sintetase (HARALDSDÓTTIR *et al.*, 2004; INGOLFSDÓTTIR *et al.*, 1997; SHIBUYA *et al.*, 1983) e o ácido protoliqueterínico atua como um inibidor da transcriptase reversa do vírus HIV (PENGSUPARP *et al.*, 1995). Alguns compostos fenólicos atuam inibindo a enzima tirosinase (HIGUCHI, *et al.*, 1993; KINOSHITA *et al.*, 1994; MATSUBARA *et al.*, 1997).

Compostos como o ácido salazínico, ácido úsnico, ácido difráctáico, atranorina, ácido lecanórico, ácido protocetrário, ácido hipostictico, orselinato de etila, ácido secalônico A e ácido fumarprotocetrário isolados de líquens brasileiros foram testados quanto a atividade imunomoduladora por Santos *et al.* (2004), apresentando resultados promissores.

Corroborando com estas pesquisas, foram realizados estudos com ácido perlatólico, atranorina, ácido lecanórico e seus derivados, como os orselinatos e metil-orselinatos, liquexantona, ácido norstítico, protocetrário e seus derivados obtidos por modificação estrutural quanto a atividade imunomoduladora (CARLOS *et al.*, 2009; CARLOS *et al.*, 2009).

Quanto a atividade antimicrobiana o ácido úsnico tem sido o mais extensivamente estudado, destacando-se como sendo um potente agente antibiótico (INGÓFSDÓTTIR *et al.*, 1998; MULLER, 2001).

Trabalhos realizados por Gomes *et al.* (2002, 2003, 2006) comprovaram potente atividade antifúngica, antibacteriana e citotóxica em *Artemia salina*. Pesquisas ainda revelam as propriedades anti-HIV dos líquens (NEAMATI *et al.*, 1997).

Campanella *et al.* (2002) descreveram que o ácido úsnico apresenta uma relevante inibição sobre a replicação do DNA viral e também inibiu o crescimento de várias espécies de *Pneumococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (FALCÃO, 2004).

Falcão *et al.* (2002) detectaram atividade antimicrobiana em extratos de *Heterodermia leucomela*, atribuindo tal efeito à presença de atranorina nos extratos da citada espécie. Os pesquisadores também relataram ação frente às bactérias gram-positivas.

Turgay *et al.* (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato do líquen *Ramalina farinacea* e seus constituintes ácido úsnico, norstítico e protocetrário, demonstrando atividade contra *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, e *Candida glabrata*.

Compostos liquênicos como atranorina, ácido fumarprotocetrárico, ácido girofórico, ácido lecanórico, ácido fisódico, ácido protocetrárico, ácido stíctico e ácido úsnico demonstraram efeitos antimicrobianos contra seis espécies de bactérias e 10 tipos de fungos, sendo que o ácido úsnico foi o composto com o maior potencial antimicrobiano (RANKOVIĆ *et al.*, 2008).

Compostos fenólicos dos líquens *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Pseudoparmelia sphaerospora* (Nyl.) Hale e *Usnea subcavata* (Motyka): depsídeos, depsidonas, xantonas, ácido úsnico e sete ésteres do ácido orselínico, cinco derivados do ácido salazínico e quatro derivados da liquexantona foram avaliados em relação a sua atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. O ácido difractalico foi o mais ativo, seguido do ácido norstíctico e ácido úsnico (HONDA *et al.*, 2009).

Estudos com ácido úsnico demonstraram ação antipirética e analgésica atuando contra hipertemia induzida por lipopolissacarídeos em camundongos (MULLER, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 1998).

Vinjayakumar *et al.* (2000) estudaram a atividade antiinflamatória de (+) ácido úsnico, isolado de *Rocella montagnei*, em ratos e evidenciaram uma significativa redução da atividade após o tratamento crônico, sugerindo que este composto apresenta efeito antipirético e analgésico dose-dependente (SANTOS *et al.*, 2005).

2.6.1 Atividade antitumoral

Desde 1961, os líquens vêm despertando interesse por suas atividades antitumorais. Neste mesmo ano, Cain investigou a atividade antileucêmica do ácido polipórico que se demonstrou ativo em linhagem de leucemia murino L1210. Em 1979, estudos com ácido úsnico em células de leucemia L1210 e P388 e também carcinoma de pulmão de Lewis (*in vivo*) demonstraram uma inibição quase completa do câncer (TAKAI *et al.*, 1979).

Os enantiômeros S-(-)-ácido úsnico e R-(+)-ácido úsnico foram os compostos mais ativos na inibição do promotor de tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr (CI50 = 5,0 µM e 1,0 µM, respectivamente) (YAMAMOTO *et al.*, 1995). Ambos enantiômeros possuem atividade citotóxica e apoptótica em culturas de células de linfócitos humanos, células de

fibroblasto de pulmão de camundongo chinês (V-79) e células epiteliais de carcinoma de pulmão humano (A549) (KOPARAL *et al.*, 2006).

A nanoencapsulação de ácido úsnico proporcionou um efeito citotóxico em células de carcinoma de pulmão humano, bem como em sarcoma-180 de camundongos e linhagens de célula HEP2 (RIBEIRO-COSTA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005). Sua atividade também foi demonstrada contra linhagens de células MCF7 de câncer de mama, assim como MDA-MB-231 e linhagem de células de câncer de pulmão H1299 (MAYER *et al.*, 2005).

Cardarelli e colaboradores (1997) relataram a ação de inibição da mitose promovida pelo ácido úsnico sobre três linhagens de células tumorais (leucemia K-562, adenocarcinoma endotelial humano HEC-50). Além disso, atividade citotóxica moderada foi observada nas linhagens de câncer L1210 (leucemia murino), 3LL (carcinoma de pulmão), DU145 (carcinoma de próstata), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), K-562 (leucemia humano) e U251 (glioblastoma). Na linhagem de leucemia L1210, o ácido úsnico induziu apoptose (BEZIVIN *et al.*, 2004). Kristmundsdóttir e colaboradores (2005) demonstraram que o ácido úsnico tem atividade antiproliferativa contra as linhagens de células humanas malignas T-47D (mama), Panc-1 (pâncreas) e PC-3 (próstata).

Derivados do crisofanol, extraídos do líquen *Asashinea chrysantha*, exibiram atividade antineoplásica em células leucêmicas (MÜLLER, 2001).

O composto ambewelamida A extraído do líquen *Usnea* sp exibiu potente citotoxicidade *in vitro* (Leucemia murina P388: IC₅₀ = 8,6 ng/mL), demonstrando também significativa atividade antineoplásica *in vivo* para a mesma célula. (WILLIAMS *et al.*, 1998).

O orselinato de metila, extraído do líquen *Peltigera leucophlebia* foi testado em linhagens celulares de câncer de mama, pâncreas e cólon, porém não apresentou atividade antiproliferativa (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 2002). Entretanto, outros derivados do ácido lecanórico, foram testados linhagens de células neoplásicas: laringe (Hep2), mama (MCF-7), pulmão (786-0), pele (B16-F10). O composto mais potente foi o orselinato de *n*-butila, seguido pelo orselinato de *sec*-butila e *terc*-butila (IC₅₀: 7,2, 8,9 e 10,2 µg/ml, respectivamente (BOGO *et al.*, 2010).

Estudos *in vivo* de derivados do ácido lecanórico demonstraram inibição da promoção do tumor de pele induzido pelo acetato de 12-o-tetradecanoilforbol em ratos. Os análogos do ácido lecanórico antagonizam muitas enzimas, bem como efeitos celulares de promoção do tumor (UMEZAWA *et al.*, 1983,1984).

Kumar e Muller (1999) sintetizaram uma série de análogos do ácido difractalico, barbático e obtusático, metabólitos de líquens de espécies de *Parmelia* sp e realizaram ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e inibição da biossíntese de leucotrieno B4.

Yamamoto *et al.* (1995) realizaram estudos com o ácido difractalico e mostraram sua atividade inibitória do tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr. Ensaios realizados com carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e sarcoma de Yoshida mostraram que o depsídeo ácido divaricático também possui ação antitumoral, porém é menos ativo que o ácido psorômico (NAKAZAWA *et al.*, 1962). Correche e colaboradores (2004) demonstraram que o ácido divaricático apresenta atividade apoptótica moderada em concentrações consideradas não citotóxicas.

Suarez *et al.* (2004) realizaram ensaios antitumorais com a liquexantona em células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), X-17 (carcinoma de rim), HEP2 (carcinoma de laringe), HEp-G2 (carcinoma de fígado), e LoVo (câncer de cólon) e os resultados demonstraram ausência da atividade.

Kumar *et al.* (1999) avaliando a sensibilidade de células de queratinócitos humanos em diversas substâncias isoladas de líquens comprovaram que os compostos ácido girofórico, ácido úsnico e ácido difractalico são potentes agentes antiproliferativos contra o crescimento de queratinócitos humanos.

As atividades citotóxicas do ácido salazínico e seus derivados com cadeias alquílicas lineares, foram testados frente a linhagem de células tumorais: MDA/MB-435 (mama-humano), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano). A série homóloga dos ácidos 8',9'-di-*O*-alquil salazínicos apresentou resultados promissores na avaliação da atividade citotóxica, com valores de CI_{50} de até 1,73 $\mu\text{g/mL}$ (MICHELETTI *et al.*, 2009).

Micheletti *et al.* (2011) encontraram atividade citotóxica em uma série de compostos derivados de 15- ω -aminoalcoxilxantona sintetizada a partir de uma xantona isolada de espécies de líquens. As linhagens testadas foram B16 F10 (melanoma murino), MCF-7 (carcinoma de mama), 786-0 (carcinoma de rim), OVCAR 03 (carcinoma de ovário), NCI-ADR (ovário resistente a adriamicina) e HT (carcinoma de cólon). As substâncias sintetizadas foram, em geral, ativas em várias linhagens neoplásicas e pelo menos 50% dos compostos testados foram ativos em todas as linhagens.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa de compostos de líquens e suas modificações estruturais.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* de compostos de líquens e seus produtos de modificação estrutural em sete linhagens de células neoplásicas

3.2.2. Avaliar a seletividade dos compostos nas linhagens neoplásicas.

3.2.3. Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do ácido protocetrárico sobre o melanoma B16 F10 em camundongos C57BL/6N.

4 METODOLOGIA

4.1 Material botânico, Extração, Isolamento dos Compostos e Modificação Estrutural

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Pesquisa LP2 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela equipe da Profa. Dra. Neli Kika Honda. Os líquens selecionados para a realização deste trabalho foram as espécies: *Parmotrema dilatatum* (Vain.)Hale, *Usnea subcavata* Motyka e *Dirinaria aspera* (H. Magn.) Awasthi, que foram coletadas no cerrado na região de Piraputanga -próxima à cidade de Aquidauana-MS. As espécies *Usnea* sp. *Ramalina* sp e *Cladina confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti foram adquiridas em loja de produtos para decoração. *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. foi coletada e identificada pela Profa. Dra. Noemia P. Santos, em áreas próximas a Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. A identificação dos demais líquens foi conduzida pela Profa. Dra. Mariana Fleig da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), pelo Prof. Dr. Marcelo P. Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo e Profa. Dra. Eugênia Cristina G. Pereira da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Uma excicata de cada espécie é mantida no laboratório LP2 para qualquer conferência.

Atranorina e ácido protocetrário foram extraídos de *P. dilatatum*; o ácido difractáico foi extraído de *U. subcavata*; ácido psorômico de *Usnea* sp. e os ácidos norstítico e perlatólico de *Ramalina* sp. e *C. confusa*, respectivamente. Os ácidos divaricático e fumarprotocetrário foram isolados de *D. aspera* e *C. verticillaris*, respectivamente.

4.1.1 Extração e isolamento dos compostos

Os talos dos líquens foram pulverizados e extraídos com hexano ou diclorometano e acetona exaustivamente, à temperatura ambiente. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida. Os extratos hexânico e diclorometânico obtidos dos líquens *P. dilatatum*, *C. verticillaris*, *U. subcavata*, *D. aspera*, *C. confusa*, *Ramalina* sp., *P. lichexanthonicum* and *Usnea* sp., foram fracionados em coluna cromatográfica de sílica gel (Merck 230-400 mesh) e a eluição foi conduzida com misturas de hexano-acetona ou hexano-acetato de etila em

polaridade crescente. Foram obtidos os depsídeos atranorina, ácidos difractáico, divaricático e perlatólico.

Os extratos acetônicos concentrados de *P. dilatatum*, *C. verticillaris Ramalina* sp., e *Usnea* sp foram tratados repetidas vezes com pequenos volumes de acetona em banho de gelo e a mistura centrifugada. Foram obtidas as depsídonas ácidos protocetrário, fumarprotocetrário, norstítico e psorômico.

O grau de pureza de cada composto foi > 95% determinado por cromatografia em camada delgada (CCD) e RMN. As estruturas dos compostos foram confirmadas pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (KÖNIG; WRIGHT, 1999; RASHID; MAJID; QUADER, 1999; SUNDHOLM ; HUNECK, 1981; SU *et al.*, 2003).

4.1.2 Modificação estrutural

As reações de modificação estrutural dos ácidos norstítico e protocetrário foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita por Micheletti *et al.* (2009).

Os derivados obtidos do ácido norstítico foram os ácidos 8'-*O*- *n*-propil, 8'-*O*-isopropil, 8'-*O*-*n*-butil, 8'-*O*-sec-butil, 8'-*O*-terc-butil, 8'-*O*-*n*-pentil e 8'-*O*-*n*-hexil norstítico. Os derivados do ácido protocetrário utilizados no estudo foram os ácidos 9'-*O*-metil, 9'-*O*-etil, 9'-*O*-*n*-propil, 9'-*O*- isopropil, 9'-*O*-*n*-butil, 9'-*O*-sec-butil e 9'-*O*-terc-butil protocetrário.

4.2 Avaliação da atividade anticâncer *in vitro* dos compostos

4.2.1 Cultura de células

Foram utilizadas sete linhagens de células neoplásicas: MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama), 786-0 (ATCC – CRL-1932, carcinoma de rim), UACC-62 (melanoma), PC-03 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata) e HT-29 (ATCC HTB-38 carcinoma de

cólon), HEP₂ (ATCC-CCL-23, de carcinoma de laringe, B16 F10 (ATCC-CRL-6322, melanoma murino). As células foram doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – UNICAMP. Também foi utilizada uma linhagem de células normais, NIH/3T3 (ATCC-CRL 1658, fibroblasto murino) foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro para a determinação do Índice de Seletividade. Todas as linhagens celulares foram mantidas em nitrogênio líquido. Para os testes foram descongeladas e cultivadas em incubadora de CO₂ (FRESHNEY, 2005).

4.2.2 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade com o corante sulforrodamina B (SRB), utilizado para avaliação da atividade antiproliferativa, tem como princípio a coloração das proteínas de membrana celular (SKEHAN *et al.*, 1990).

Todo o procedimento para o manuseio das células foi realizado conforme Freshney (2005). As células estavam criopreservadas em nitrogênio líquido e para os testes foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis em meio de cultura RPMI 1640 e meio mínimo essencial modificado por *Dulbecco* (DMEM), suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 50 µg de gentamicina / mL (Europharma) (meio completo). Em seguida foram colocadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Uma vez que as células são aderentes, foi feita a remoção com solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação a baixa rotação, o meio com tripsina foi desprezado e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo.

A contagem de células viáveis foi feita com *Trypan Blue*[®] em Câmara de Neubauer. A suspensão de células foi preparada para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 7.500 a 10.000 células/cavidade. As placas foram estabilizadas por incubação por 24 h a 37 °C na incubadora de CO₂. Com as células já aderidas, uma alíquota de cada fração das amostras-teste previamente dissolvidas em DMSO (0,4%) e controle positivo doxorrubicina foram adicionadas às cavidades da placa. Foram utilizadas quatro concentrações de cada amostra-teste (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), sendo cada uma adicionada em três cavidades (triplicata). Para o controle positivo as

concentrações utilizadas foram 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL). Na coluna 1, denominada controle negativo, as células foram cultivadas na ausência de qualquer amostra-teste. Todas as placas permaneceram na incubadora até o final do período de exposição das células às amostras-teste (48 h).

As células foram então fixadas com ácido tricloroacético 20% por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a placa lavada em água e seca para adição de 50µL de SRB (0,1%) diluída em ácido acético e incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. O excesso de corante foi removido com ácido acético 1% seguido de secagem das placas e adição de tampão Tris Base 10mM para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. As placas foram submetidas à agitação por 10 minutos para dissolução das proteínas coradas e a leitura foi realizada em leitor óptico de microplacas em 540nm.

4.2.3 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. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da GI_{50} de cada composto-teste na linhagem de células normais 3T3 e o valor da GI_{50} de cada composto na linhagem de células neoplásicas ($IS = GI_{50} \text{ 3T3} / GI_{50} \text{ células neoplásicas}$). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS & 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.

4.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* sobre melanoma B16 F10

4.3.1 Animais

Foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem C57BL/6N, pesando entre 25-35g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40 x 35 x 17 cm), na quantidade de cinco animais/gaiola, à temperatura de aproximadamente 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL[®] CR1) e água à vontade. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante cinco dias antes do experimento.

O experimento foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA-Protocolo número 249/2010), conforme a determinação do CONCEA.

4.3.2 Triagem dos compostos

Uma vez obtidos os resultados da atividade antiproliferativa *in vitro* foi realizada uma triagem de alguns compostos com o objetivo de definir o composto a ser utilizado no estudo bem como as concentrações para o ensaio *in vivo*.

Os compostos utilizados na triagem foram selecionados conforme a quantidade de massa do composto disponível, no momento da realização do ensaio.

Para tanto, foram utilizadas três concentrações de cada composto selecionado obtidas a partir de uma correlação matemática entre a GI50 da doxorubicina encontrada no ensaio *in vitro* na linhagem B16-F10 e as GI50 dos compostos. Assim, o número de vezes em que a doxorubicina foi mais potente que o composto foi multiplicado pela dose de doxorubicina descrita na literatura (5mg/Kg).

Os seguintes compostos foram triados: ácido divaricático, ácido psorômico, ácido protocetrário, ácido norstítico, ácido 8'-*O-n*-hexil-norstítico e ác. 8'-*O-n*-butil-norstítico.

Foram inoculadas por via subcutânea 5×10^5 /200 μ L células da linhagem B16 F10 na região interescapular dos camundongos machos e 24 horas após, foi realizado o tratamento nos animais (3 concentrações para cada composto) para triagem dos compostos.

Após 21 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, procedeu-se a retirada do nódulo. Para a retirada do nódulo, o animal foi posicionado em decúbito ventral, de maneira que o nódulo localizado na região interescapular dorsal fosse visualizado e delimitado por palpação direta. Com o auxílio de uma tesoura, realizou-se uma incisão na pele há aproximadamente 5mm ao redor das margens palpáveis do tumor. Ventralmente, a margem considerada foi o tecido celular subcutâneo. Em ato contínuo o tumor foi excisado, acondicionado em solução de cloreto de sódio a 0,9% por alguns minutos. Posteriormente, foi medido e sua massa foi aferida.

Os resultados obtidos da triagem foram os seguintes:

a) ácido divaricático (10, 20, 30 mg/animal): observou-se a formação de nódulos cujos volumes foram dose-dependente. Na concentração de 10mg o volume obtido foi 1,220 mm³, 0,650 mm³ com 20mg e 0,269 mm³ para a concentração de 30mg.

b) ácido protocetrário (10, 20, 30 mg/animal): verificou-se um pequeno nódulo no animal tratado com 10mg (0,62 mm³); na concentração de 20mg não houve formação de nódulo e e com a concentração de 30 mg, o animal foi a óbito.

c) ácido norstítico (20, 50, 60 mg/animal): não houve a formação de nódulo no animal tratado com 20mg. Nas demais concentrações o composto causou óbito dos animais.

d) ácido 8'-*O-n*- hexil-norstítico (10, 20, 30mg/animal): verificou-se ausência de nódulo na concentração de 10mg, porém, houve a formação de nódulos nos tratamentos com 20 e 30mg, cujos volumes foram 0,440 mm³ e 0,364 mm³, respectivamente.

e) ácido psorômico (10, 20, 30 mg/animal): as três concentrações utilizadas causaram o óbito dos animais.

Como controle positivo, a doxorrubicina (5mg/kg) inibiu a formação do nódulo, conforme o esperado. Embora a doxorrubicina tenha sido utilizada como controle positivo *in vitro*, em pacientes com melanoma a mesma não apresenta ação efetiva devido à alta quimiorresistência das células tumorais (SIGNORELLI *et al.*, 2005). Entretanto, escolheu-se utilizá-la para os ensaios *in vivo* como controle positivo, baseado em pesquisas desenvolvidas anteriormente (MARCHETTI, 2008).

Os órgãos (coração, pulmão, fígado e baço) também foram avaliados macroscopicamente e não apresentaram alterações e nem a presença de nódulos.

Nessa triagem, o tratamento com os compostos selecionados foi realizado 24 horas após a inoculação das células B16 F10. Entretanto, questionou-se que, se os efeitos do composto fossem observados sobre as células de melanoma recém-inoculadas, ou seja, após 24h, poder-se-ia sugerir que a ação deste composto seria sobre a implantação do mesmo, o que não era o objetivo deste estudo. Assim, decidiu-se no ensaio *in vivo* com o ácido protocetrárico administrar o composto nas três concentrações, no 10º dia após a inoculação das células do melanoma, quando, então, os tumores apresentavam-se palpáveis.

Com os resultados obtidos da triagem, bem como as observações pertinentes ao método empregado, pode-se então proceder ao ensaio *in vivo*.

4.3.3. Ensaio *in vivo*

Para a realização do ensaio *in vivo*, foi escolhido o ácido protocetrárico por apresentar GI = 23,99 na linhagem B16-F10 e IS = 2,0, indicando boa seletividade para a linhagem normal e também por apresentar quantidade suficiente de massa para realização dos tratamentos nas três concentrações determinadas.

Para o desenvolvimento do nódulo hipodérmico, suspensões de células B16 F10 (5×10^5 /0,2mL PBS) foram inoculadas subcutaneamente na região interescapular dos camundongos.

No 10º dia após a inoculação das células os animais 25 animais foram distribuídos em 5 grupos (n=5) e tratados conforme descrito a seguir: I) PBS (0,2mL, i.p.); II) Doxorubicina (5mg/Kg/0,2mL, i.p.); III) ácido protocetrárico 7,5mg/0,2mL, i.p.; IV) ácido protocetrárico 15mg/0,2mL, i.p.; V) e ácido protocetrárico 22,5mg/0,2mL, i.p. O esquema de tratamento utilizado foi de uma única dose/ animal.

Após a administração das diferentes substâncias, os animais foram observados para avaliação dos sinais físicos (força de agarrar, tremores, piloereção, convulsões, respiração, aparência, alterações no abdômen) e comportamentais (irritabilidade, resposta ao toque, comportamento espontâneo e provocado) nos tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos (BRITO, 1994).

No 21º dia após a inoculação das células (11 dias após o tratamento), os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Após, os nódulos formados na região dorsal dos

camundongos foram retirados e os seguintes parâmetros foram avaliados: peso (g); volume (mm^3); área (cm^2).

Para a determinação da massa tumoral os nódulos foram pesados em balança analítica RADWAG[®]. Os diâmetros foram medidos utilizando-se paquímetro digital WORKER[®]; a área foi definida pelo programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) e o volume obtido por meio da fórmula de Steel ($Dxd^2/2$), onde D e d dão os diâmetros maiores e menores, respectivamente (NETO *et al.*, 2002). A partir disso, foi realizado o cálculo para definição da taxa de inibição de crescimento tumoral. Ainda, os animais foram pesados no dia 0 (dia da inoculação das células B16-F10), no 10º dia (dia do tratamento) e 21º dia (eutanásia).

4.4 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise estatística, sendo analisados as repetições e as formas de tratamento. A análise estatística para o ensaio *in vitro* encontra-se descrita a seguir.

Foram obtidas as absorvâncias das amostras-teste (T), do controle negativo (CN), do branco das amostras-teste (B) e do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras-teste (T_0).

Usando essas absorvâncias, a resposta celular à incubação com as amostras-teste pode ser um estímulo do crescimento celular, uma inibição do crescimento, ou ainda, não ocorrer nenhum efeito da amostra-teste sobre as células.

Se $T > CN$ a amostra-teste estimulou o crescimento celular. Se $T \geq T_0$ e $< CN$, a amostra-teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve um efeito citostático. Para estas condições, o cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula $100 \times [(T - T_0) / (CN - T_0)]$ (MONKS *et al.*, 1991).

Se $T < T_0$, a amostra-teste induziu morte celular, ou seja, efeito citocida e pode ser calculada por $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ (MONKS *et al.*, 1991).

O crescimento celular (%) obtido por meio da aplicação das fórmulas em programa Excel, foi utilizado na elaboração de gráficos por regressão não linear, tipo sigmoidal empregando-se o programa de análise de dados *Origin 6.0*. Os valores abaixo de 100% e

acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto os valores negativos representam morte celular.

A partir dos gráficos, três níveis de efeito são calculados: 1) concentração da amostra-teste que causa 50% de inibição do crescimento celular (GI_{50}), ou seja, quando a concentração reduz em 50% a quantidade de proteínas em relação ao controle negativo durante o período de incubação; 2) concentração que causa inibição total do crescimento (TGI - *total growth inhibition*), ou seja, a concentração que faz com que a quantidade de proteína no fim da incubação com a amostra-teste seja igual à quantidade do começo e; 3) concentração que causa 50% de morte celular (LC_{50}), ou seja, concentração que causa 50% de morte celular (MONKS *et al.*, 1991).

Foram consideradas ativas as amostras-teste com $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ (ITHARAT *et al.*, 2004). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera forte atividade antineoplásica valores $GI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991).

Os resultados obtidos no ensaio *in vivo* de atividade anticancer frente aos tumores sólidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados com os controles por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (GraphPad Prism 5®). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Os depsídeos atranorina (1) e os ácidos difractáico (2), divaricático (3) e perlatólico (4) e as depsidonas ácidos psorômico (5), norstítico (6), protocetrário (7) e fumarprotocetrário (8) (Figura 3) foram avaliados quanto a citotoxicidade nas seguintes linhagens neoplásicas: MCF7 (carcinoma de mama), 786-0 (carcinoma de rim), UACC-62 (melanoma), PC-03 (carcinoma de próstata) e HT-29 (carcinoma de cólon), HEP₂ (carcinoma de laringe), B16-F10 (células de melanoma murino). Também foram testados em uma linhagem de células normais, NIH/3T3 (fibroblasto murino). Como controle positivo dos experimentos foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina (Figura 4).

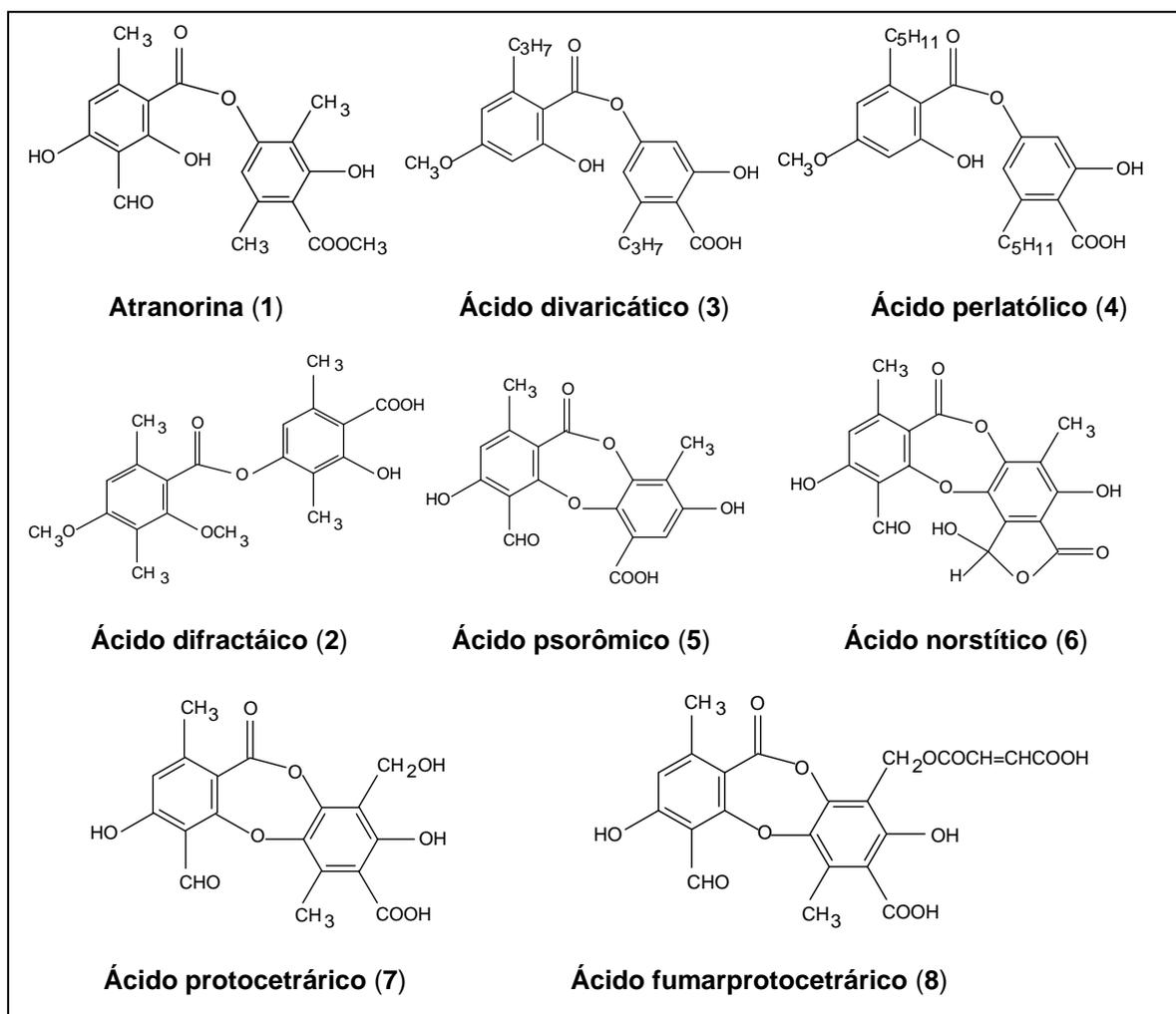


Figura 3- Representação das Estruturas Químicas das Substâncias (1) – (8).

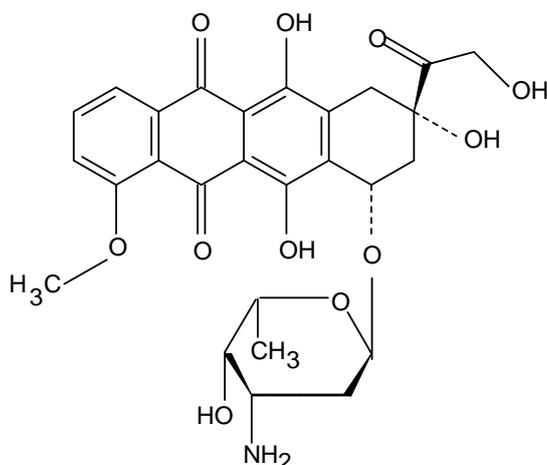


Figura 4 – Fórmula estrutural da doxorubicina.

A atividade antitumoral dos compostos foi expressa em GI_{50} (concentração eficaz para inibir 50% do crescimento celular). Como parâmetro de atividade, considera-se como potente atividade antineoplásica os compostos que apresentarem $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ (ITHARAT *et al.*, 2004). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera potente atividade antineoplásica valores $GI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$. No presente estudo, os compostos foram considerados inativos quando $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$.

Devido ao fato das massas molares dos compostos apresentarem diferenças, os resultados serão abordados tanto em $\mu\text{g/mL}$, como em μM . A tabela 2 mostra os valores de GI_{50} das substâncias frente às linhagens avaliadas.

Tabela 2: Valores de GI₅₀* (μg/mL e μM) para as substâncias (1) – (8) e doxorubicina (controle positivo).

LINHAGENS	786-0		MCF7		UACC-62		HT-29		PC-03		HEP ₂		B16 F10		3T3	
SUBSTÂNCIAS	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM
Atranorina (1)	163,89	438	282,25	754	147,2 ^a	393 ^a	371,64	993	196,82	526	409,08	1093	257,4 ^a	688 ^a	278,7 ^a	745 ^a
Ácido difractáico (2)	30,04	80	36,62	98	24,71	66	27,71	74	21,92	58	37,03	99	25,39	68	31,16	83
Ácido divaricático (3)	27,99	72	7,85	20	2,72	7	6,44	17	3,79	10	5,54	14	4,36	11	14,5	37
Ácido perlatólico (4)	10,46	23	6,81	15	3,26	7	27,29	61	7,13	16	13,13	29	17,96	40	26,02	58
Ácido psorômico (5)	54,14	151	44,6	124	36,61	102	41,92	117	47,51	133	45,46	127	266,3	743	248,5	693
Ácido norstítico (6)	340,59	915	282,3	758	60,17	162	62,36	167	58,41	157	32,91	88	71,12	191	258,8	695
Ácido protocetrário (7)	169,96	454	38,71	103	0,52	1,4	37,21	99	243,49	650	15,49	41	23,99	64	48,54	130
Ácido fumarprotocetrário (8)	305,24	646	266,93	565	283,2	600	46,12	98	349,12	739	460,85	976	260,0	550	106,3	225
Doxorrubicina	0,23	0,39	0,05	0,08	0,47	0,81	0,09	0,15	0,28	0,48	0,58	1	0,25	0,43	0,55	0,94

*Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa *ORIGIN* 6,0.

^aBrandão (2011)

A tabela 3 indica os valores de IS (Índice de Seletividade) para as substâncias avaliadas em relação a linhagem de células normais - 3T3. Foram consideradas seletivas as substâncias que apresentaram valores de IS maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Tabela 3: Índice de Seletividade (IS)* para as substâncias (1) – (8).

LINHAGENS/ SUBSTÂNCIAS	786-0	MCF7	UACC- 62	HT-29	PC-03	HEP ₂	B16 F10
Atranorina (1)	1,7	0,9	1,8 ^a	0,7	1,4	0,6	1,0
Ácido difractáico (2)	1,0	0,8	1,2	1,1	1,4	0,8	1,2
Ácido divaricático (3)	0,5	1,8	5,3	2,2	3,8	2,6	3,3
Ácido perlatólico (4)	2,4	3,8	7,9	0,9	3,6	1,9	1,4
Ácido psorômico (5)	4,5	5,5	6,7	5,9	5,2	5,4	0,9
Ácido norstítico (6)	0,9	4,3	7,8	0,7	3,6	4,4	4,1
Ácido protocetrárico (7)	0,2	1,2	93,3	1,3	0,1	3,1	2,0
Ácido fumarprotocetrárico (8)	0,3	0,3	0,3	2,3	0,3	0,2	0,4

^aBrandão (2011)

* IS significativo para valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Analisando os resultados apresentados na tabela 2 e 3 verifica-se que o depsídeo atranorina (1) apresentou valores de GI 147,22µg/mL (393µM) sobre células UACC-62 (BRANDÃO, 2011), onde foi mais ativo e não foi seletivo para nenhuma das linhagens avaliadas. Backorová *et al.* (2011) relataram que essa substância na concentração de 200 µM foi efetiva sobre linhagens de células tumorais HL-60 (células não aderentes) inibindo aproximadamente 65% do crescimento. Os autores estudaram atranorina, ácido girofórico, ácido úsnico e parietina em nove linhagens celulares, dentre elas MCF7 e HT-29, utilizando o método MTT. Posteriormente, demonstraram que a atranorina pode induzir morte celular programada na linhagem HT-29, provavelmente através de um mecanismo mitocondrial (BACKOROVÁ *et al.*, 2012).

Para uma melhor visualização das atividades dos compostos, pode-se utilizar a curva concentração-resposta que fornece informações importantes da atividade antiproliferativa das

substâncias avaliadas. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se a substância possui efeito citostático (pontos da curva acima do ponto zero), efeito citocida (pontos da curva abaixo do ponto zero) ou inibição total do crescimento quando $T=T_0$, ou seja, a concentração que promove 100% de inibição celular (TGI) é o valor no eixo da abscissa onde a curva corta o eixo das ordenadas. A Figura 5 mostra a atividade antiproliferativa da atranorina (1) sobre as linhagens neoplásicas e a representação dos pontos relacionados às variáveis GI_{50} , LC_{50} e TGI, previamente calculadas no programa de dados *Origin 6.0*.

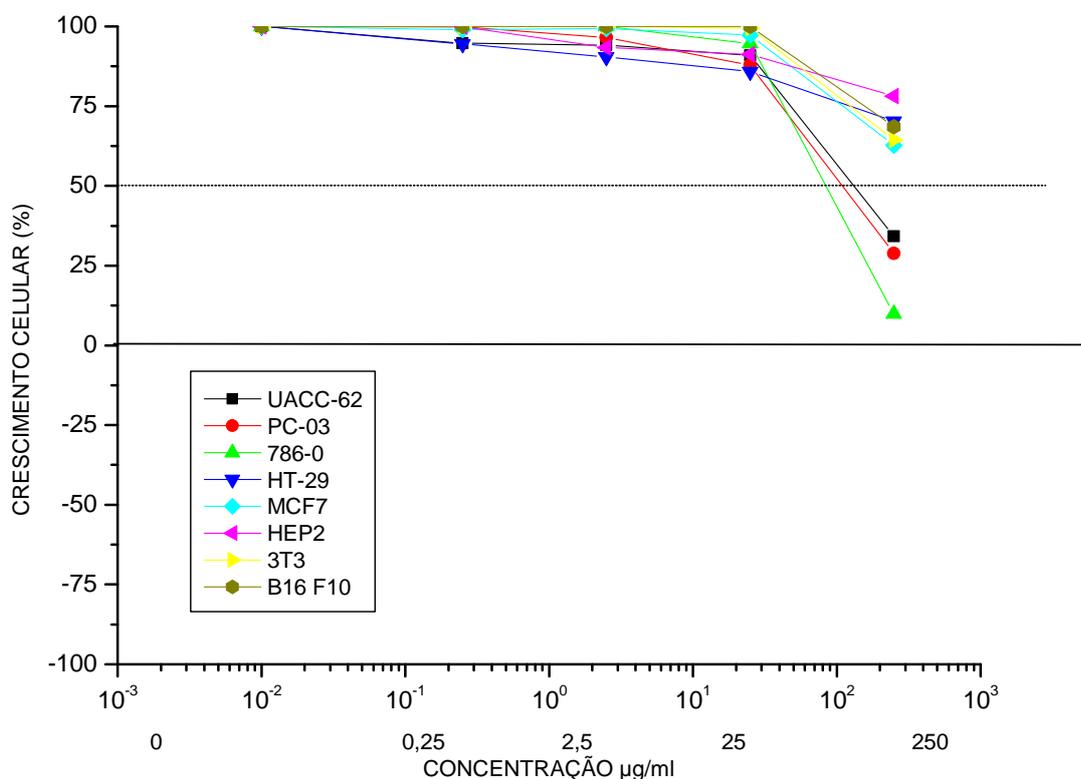


Figura 5 – Atividade antiproliferativa da atranorina (1) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

Na figura 5 observa-se que a atranorina produziu apenas inibição do crescimento, não apresentando efeito citocida em nenhuma linhagem. Isso demonstra a baixa toxicidade em cultura de células. Nas linhagens 3T3, MCF7, HT-29, HEP₂ e B16 F10, a GI_{50} permaneceu acima de 250µg/mL.

O ácido difrático (2) foi ativo em UACC-62 (BRANDÃO, 2011), HT-29, PC-03 e B16 F10 (BRANDÃO, 2011), apresentando GI_{50} entre 21,92 e 27,71µg/mL (58 e 74µM), nas demais linhagens as GI_{50} variaram entre 30,04 a 37,03µg/mL (83 e 99µM) (Tabela 2 e 3).

Entretanto, esta substância não apresentou IS significativo para nenhuma das linhagens avaliadas. Yamamoto *et al.* (1995) realizaram estudos com o ácido difractalico e mostraram sua atividade inibitória do tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr.

A Figura 6 representa a curva concentração-resposta do ácido difractalico (2) sobre as linhagens neoplásicas e normal. O ácido difractalico produziu efeito citostático e citocida em todas as linhagens e não foi observada seletividade para nenhuma linhagem.

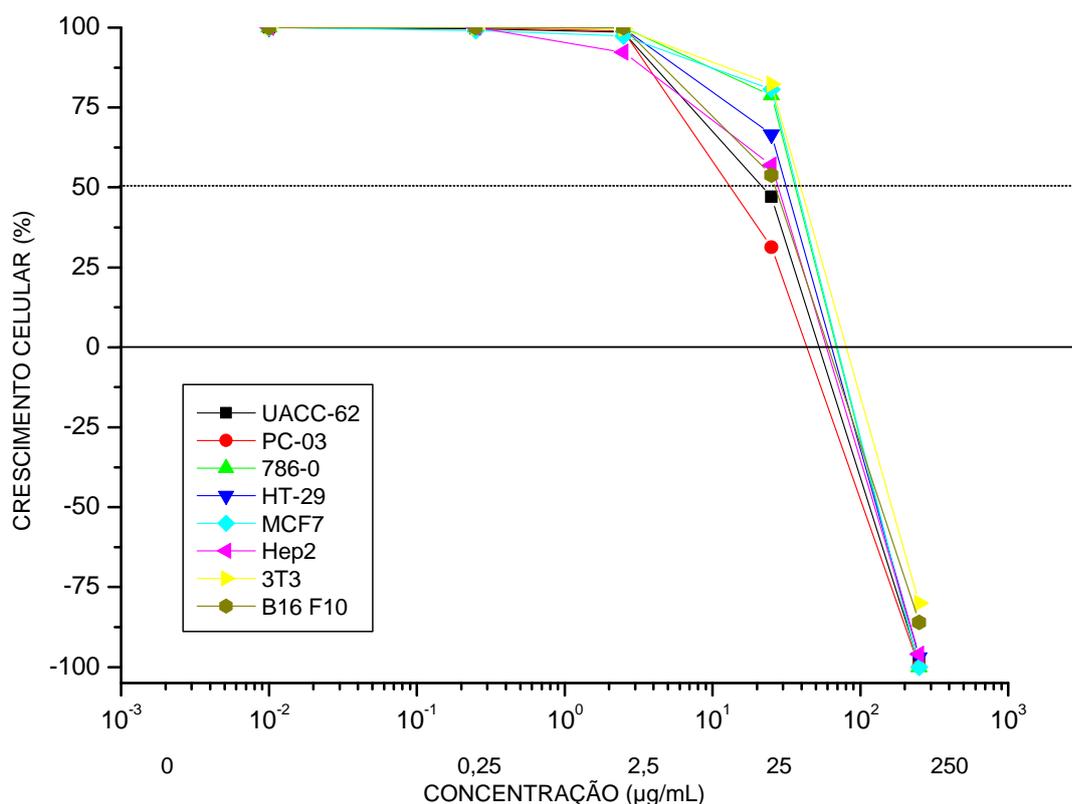


Figura 6 - Atividade antiproliferativa do ácido difractalico (2) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

O ácido divaricático (3) foi ativo contra todas as linhagens celulares testadas, inclusive a normal. As GI_{50} para este composto variaram de 2,72µg/mL a 27,99µg/mL (7µM - 72µM), demonstrando forte atividade antitumoral. O ácido divaricático (3) apresentou seletividade em UACC-62 com IS = 5,33 (BRANDÃO, 2011); PC-03, B16 F10, HEP₂ e HT-29 com IS = 3,82; 3,32 (BRANDÃO, 2011); 2,61; 2,25, respectivamente (tabela 3). Os resultados obtidos neste ensaio *in vitro* confirmam aqueles encontrados nos ensaios realizados com carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e sarcoma de Yoshida em que esse depsídeo mostrou ação antitumoral,

in vivo (NAKAZAWA *et al.*, 1962). Correche e colaboradores (2004) demonstraram que o ácido divaricático apresenta atividade apoptótica moderada em concentrações consideradas não citotóxicas.

A figura 7 indica o comportamento do ácido divaricático (3) contra as linhagens neoplásicas e a normal. Em todas as linhagens, o composto apresentou inibição do crescimento e morte celular, sendo menos ativo na linhagem 786-0 e mais ativo em UACC-62, inferindo que houve atividade citostática na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para esta linhagem.

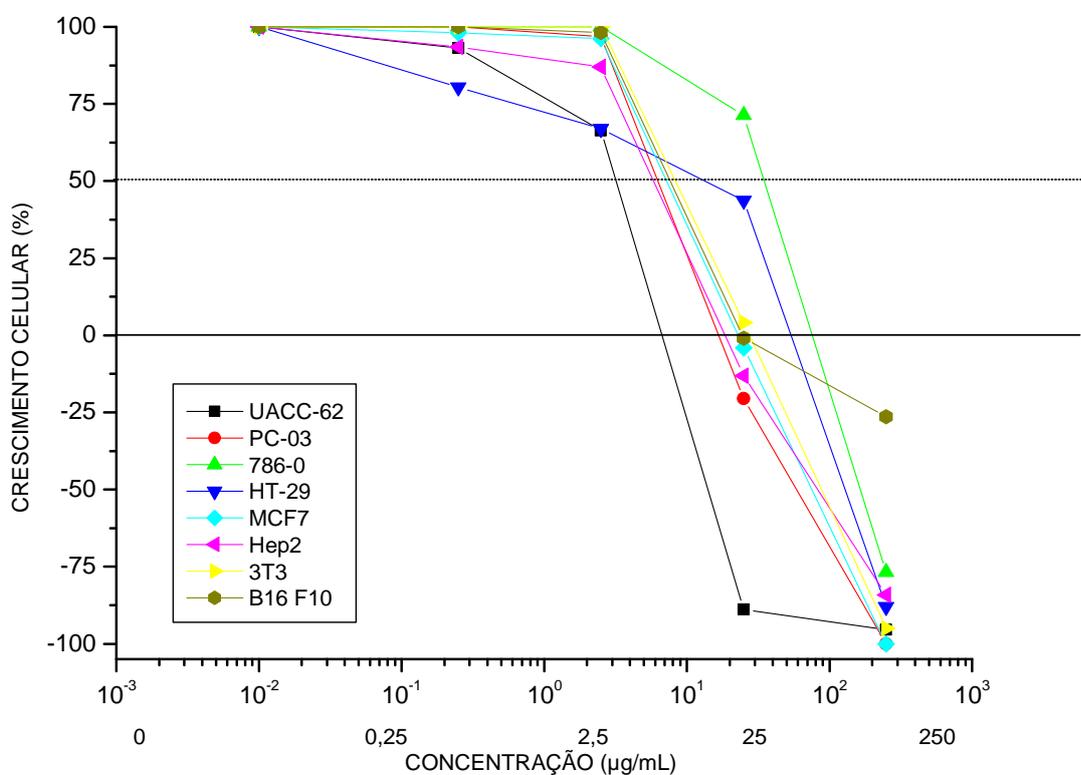


Figura 7 - Atividade antiproliferativa do ácido divaricático (3) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48h.

O ácido perlatólico (4) apresentou elevada potência em todas as linhagens, destacando-se as GI_{50} de 10,46 $\mu\text{g/mL}$ (23 μM) em 786-0; 6,81 $\mu\text{g/mL}$ (15 μM) em MCF7; 3,26 $\mu\text{g/mL}$ (7 μM) em UACC-62 (BRANDÃO, 2011); 7,13 $\mu\text{g/mL}$ (16 μM) em PC-03; 13,13 $\mu\text{g/mL}$ (29 μM) em HEP₂ e 17,96 $\mu\text{g/mL}$ (40 μM) em B16 F10 (BRANDÃO, 2011). Este composto foi seletivo para 786-0, MCF7, UACC-62 e PC-03. Em células tumorais das

linhagens MDA/MB-435 (mama-humano), HCT-8 (cólón humano) e SF-295 (glioblastoma humano) os valores de GI_{50} foram maiores que $25 \mu\text{g/mL}$ (GIANINI, 2008).

A figura 8 retrata a atividade antiproliferativa do ácido perlatólico (4) em todas as linhagens testadas, bem como sua ação citocida. Não houve seletividade para a linhagem B16 F10 e HT-29.

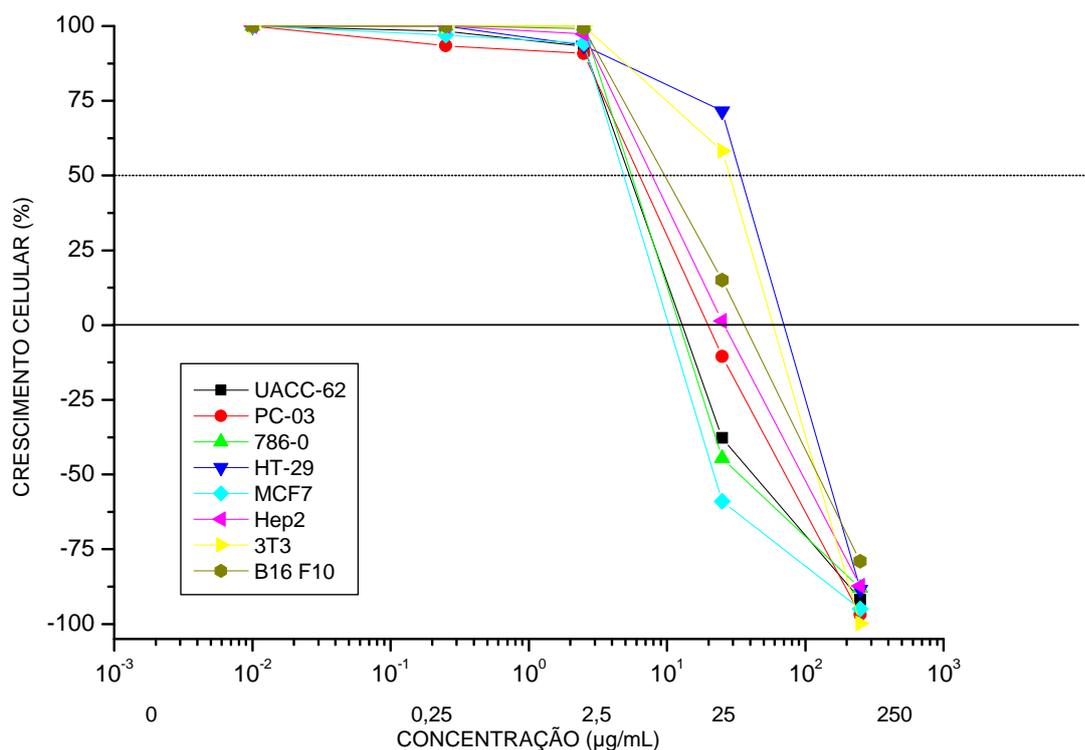


Figura 8 - Atividade antiproliferativa do ácido perlatólico (4) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

Quanto ao ácido psorômico (5), embora este composto tenha apresentado seletividade em quase todas as linhagens testadas, suas GI_{50} variaram de $36,61 \mu\text{g/mL}$ ($102 \mu\text{M}$) (BRANDÃO, 2011) em UACC-62 a $266,37 \mu\text{g/mL}$ ($743 \mu\text{M}$) em B16 F10 (BRANDÃO, 2011), sendo considerado um composto com atividade moderada, porém inativo em 3T3, por apresentar GI_{50} igual a $248,57 \mu\text{g/mL}$ ($694 \mu\text{M}$). Pode-se afirmar que este composto, apesar de não ser muito ativo, *in vitro* não causa inibição do crescimento da célula normal nas concentrações menores que $248,57 \mu\text{g/mL}$, ou seja, não é citotóxico para células normais. Este resultado corrobora os estudos realizados por Correche *et al.* (2004) em que a depsidona não demonstrou ser tóxica quando administrada cronicamente em camundongos. O ácido

psorômico (5) apresenta atividade apoptótica significativa e que é efetiva ao inibir carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180 *in vitro* e *in vivo*, mas sarcoma de Yoshida somente *in vitro* (CORRECHE *et al.*, 2004; NAKAZAWA *et al.*, 1962).

A figura 9 retrata o perfil predominantemente citostático do ácido psorômico (5) para as linhagens B16 F10 e 3T3, inferindo que na linhagem normal o composto não é citotóxico. A atividade citocida foi encontrada nas demais linhagens.

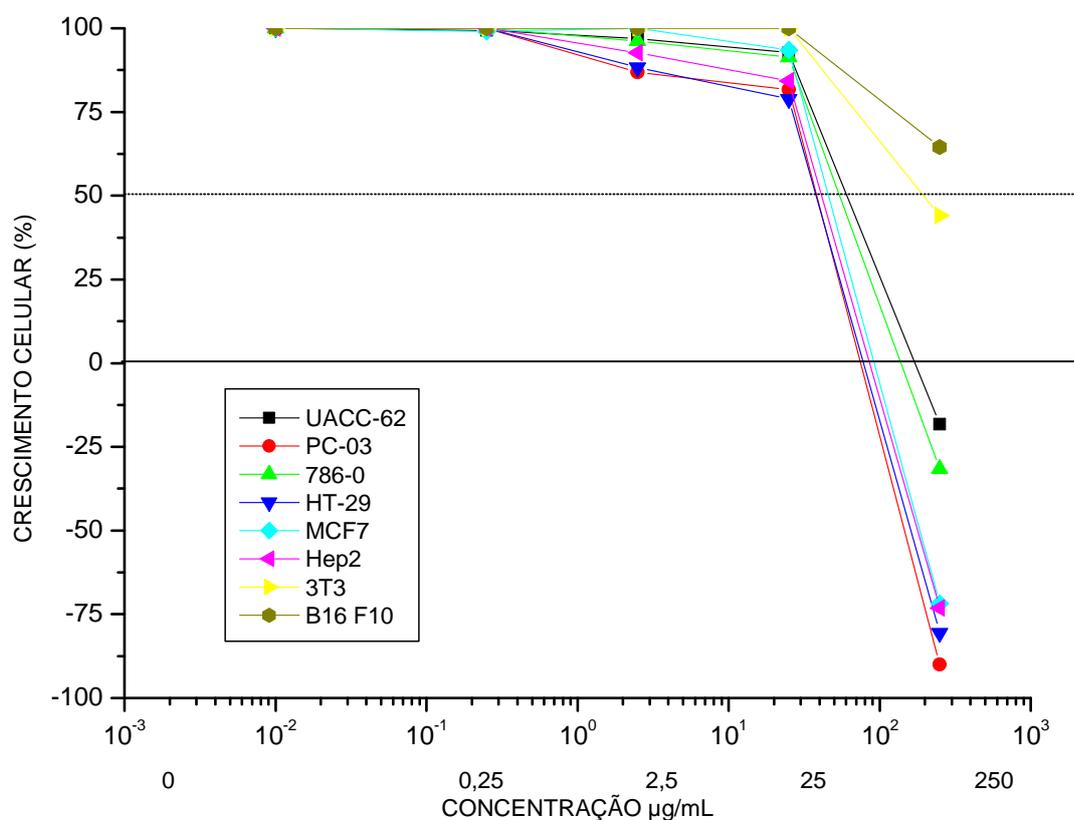


Figura 9 - Atividade antiproliferativa do ácido psorômico (5) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

O ácido norstítico (6) apresentou valores de GI50 entre 58,1 µg/mL (88 µM) em HEP₂ e 282,3 µg/mL (915 µM) em 786-0, destacando-se a linhagem UACC-62, na qual apresentou GI50 = 32,91µg/mL (162µM) (BRANDÃO, 2011). Na linhagem de células normais sua GI50 foi maior que 250 µg/mL (695µM) (Tabela 2). Embora os valores de GI50 para a maioria das linhagens não indicam forte atividade, este composto foi seletivo em cinco linhagens. Em 1962, estudos realizados com mais de 32 compostos de líquens, inclusive o

ácido norstítico contra carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e sarcoma de Yoshida, demonstraram que este composto e outros 16 compostos testados não foram ativos (NAKAZAWA *et al.*, 1962).

A figura 10 revela o perfil de ação do ácido norstítico (6). O efeito citocida foi verificado em apenas três linhagens UACC-62, PC-03 e MCF7. As linhagens 786-0, 3T3 e HT-29 apresentaram valores maiores que 250 $\mu\text{g/mL}$, indicando que o composto não foi ativo nestas linhagens. O efeito citostático foi observado nas linhagens B16 F10 e HEP₂. O ácido norstítico foi seletivo em MCF7, B16 F10, HEP₂, UACC-62 e PC-03 conforme demonstrado no gráfico.

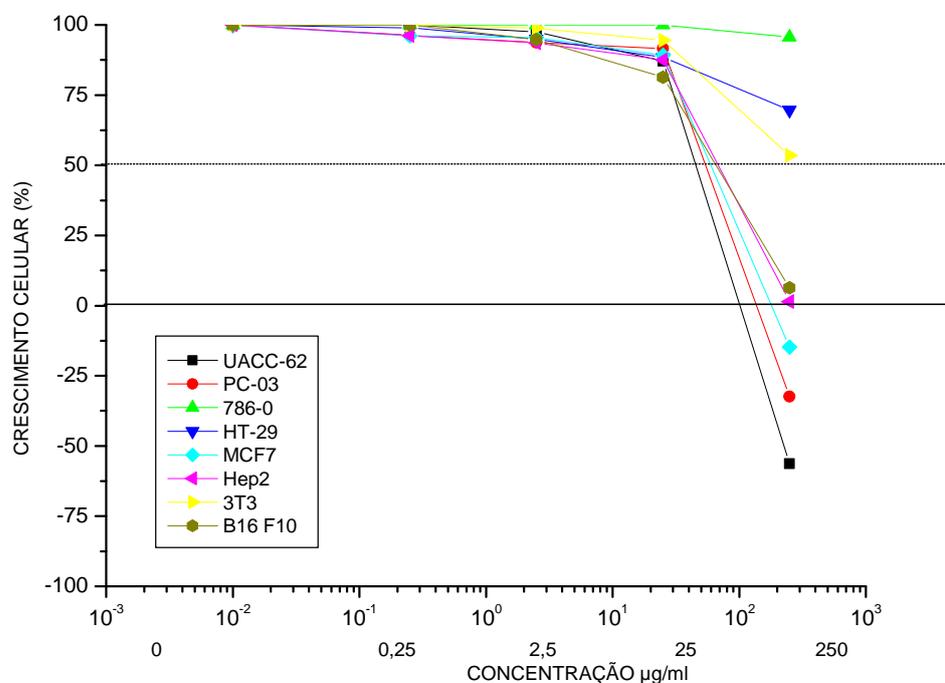


Figura 10 - Atividade antiproliferativa do ácido norstítico (6) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48h.

O ácido protocetrário (7) foi consideravelmente ativo em UACC-62, B16 F10 e HEP₂ (0,52 $\mu\text{g/mL}$ (1,4 μM) (BRANDÃO, 2011); 23,99 $\mu\text{g/mL}$ (64 μM) (BRANDÃO, 2011) e 15,49 $\mu\text{g/mL}$ (41 μM), respectivamente. Entretanto, foi menos ativo nas linhagens 786-0 e PC-03 (GI_{50} acima de 454 $\mu\text{g/mL}$). O índice de seletividade em UACC-62 para este composto foi 93,34 demonstrando que nesta linhagem, o ácido protocetrário (7) é 93 vezes mais ativo que

nas células normais. Em HEP₂ e B16 F10 este composto também foi seletivo, apresentando IS de 14,66 e 2,02, respectivamente.

Analisando a figura 11, observa-se que o ácido protocetrário (7) apresentou efeito citostático em todas as linhagens, exceto na linhagem B16 F10 e UACC-62, onde o composto demonstrou também atividade citocida. Na linhagem normal o composto foi citostático apenas, inferindo um menor grau de citotoxicidade. Nas linhagens UACC-62 e HEP₂ o ácido protocetrário foi mais ativo.

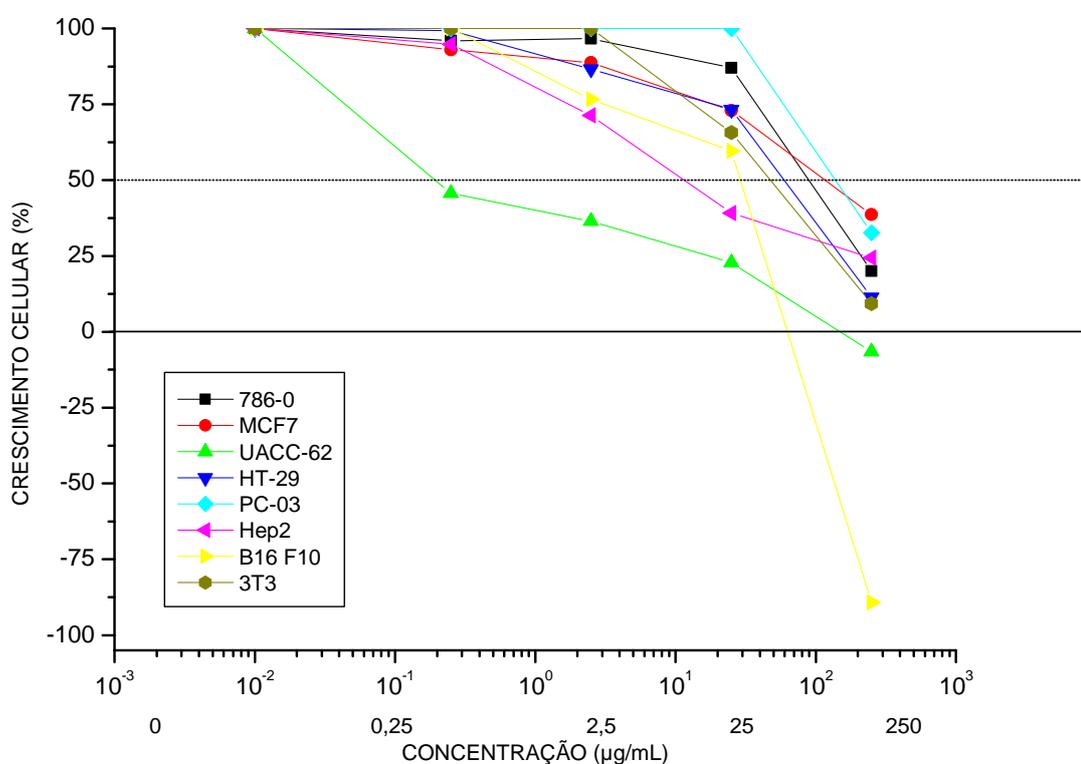


Figura 11 - Atividade antiproliferativa do ácido protocetrário (7) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

O ácido fumarprotocetrário é um derivado natural do ácido protocetrário.

O ácido fumarprotocetrário (8) apresentou fraco potencial de inibição do crescimento das linhagens celulares testadas, porém foi 2,3 vezes mais seletivo em HT-29, com uma IC₅₀ de 46,12µg/mL. Kristmundsdóttir *et al.* (2005) avaliaram o efeito do ácido fumarprotocetrário contra T-47D (mama) e Panc-1 (pâncreas) e que mostrou baixa atividade inibitória.

De acordo com Santos (1996) o ácido protocetrário inibiu em torno de 80% o crescimento de células de sarcoma 180 e de carcinoma de Ehrlich, porém seu derivado, o ácido fumarprotocetrário inibiu aproximadamente 40% o crescimento.

Na figura 12 verifica-se o perfil citostático do ácido fumarprotocetrário em todas as linhagens. Exceto nas linhagens HT-29 e 3T3, o composto não exibiu ação alguma até a maior concentração (250 $\mu\text{g/mL}$).

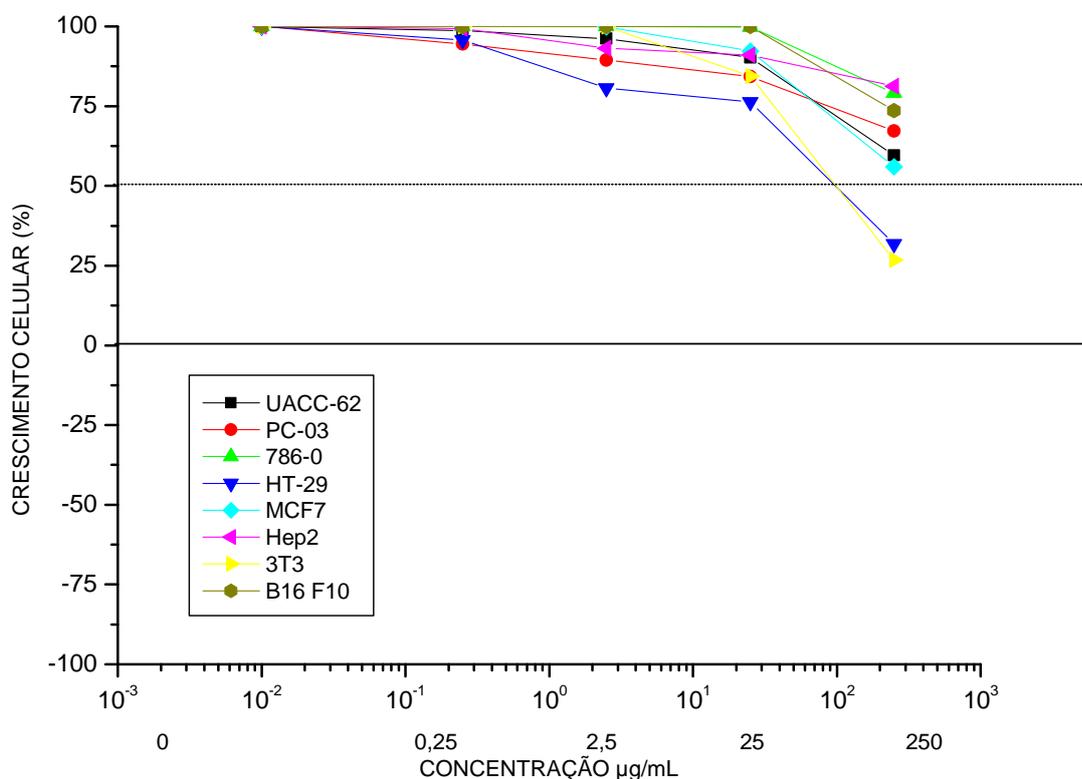


Figura 12 - Atividade antiproliferativa do ácido fumarprotocetrário (8) frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 $\mu\text{g/mL}$), durante 48h.

Os resultados obtidos (Tabela 2) mostram o potencial de algumas substâncias como modelos para a obtenção de substâncias sintéticas ou produtos de modificações por semi-síntese. Destacam-se os ácidos protocetrário (7), divaricático (3) e perlatólico (4) sobre células UACC-62 (GI_{50} 0,52 $\mu\text{g/mL}$, 2,72 $\mu\text{g/mL}$ e 3,26 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (BRANDÃO, 2011). Essas substâncias mostraram forte atividade antineoplásica ($GI_{50} \leq 4,0$ $\mu\text{g/mL}$) de acordo com o critério estabelecido pelo NCI em seu programa de triagem de

drogas anticâncer. Além disso, considerando o parâmetro de atividade definido por Ithrat *et al.* (2004) os compostos que apresentaram $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ são também considerados potencialmente ativos. Dessa forma, os depsídeos ácidos divaricático (3) e perlatólico (4) foram potencialmente ativos sobre todas as células tumorais avaliadas. O depsídeo ácido difractáico (2) foi um pouco menos ativo somente sobre MCF7 e HEP₂ (GI_{50} 36,63 $\mu\text{g/mL}$ e 37,03 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). As depsidonas ácidos psorômico (5), norstítico (6), protocetrário (7) e fumarprotocetrário (8), foram de modo geral pouco ativas. Dentre elas, a depsidona ácido protocetrário foi consideravelmente ativa sobre células UACC-62 (BRANDÃO, 2011), HEP₂ e B16 F10 (BRANDÃO, 2011), moderadamente ativa sobre MCF7, HT-29 e sobre células normais 3T3 e fracamente ativa sobre células 786-0 e inativa sobre células PC-03. A depsidona ácido psorômico (5) foi moderadamente ativa sobre todas as células testadas e inativa sobre células normais 3T3. A depsidona ácido norstítico (6) foi inativa sobre células 786-0, MCF7 e 3T3 e moderadamente ativa sobre as demais células. O ácido fumarprotocetrário (8) foi moderadamente ativo somente sobre células HT-29 e inativo sobre todas as células tumorais avaliadas. Embora essas depsidonas (5) – (8) não tenham mostrado potencial efeito antineoplásico sobre as células testadas é possível mediante alterações estruturais dessas substâncias se tornarem compostos potencialmente ativos. Além disso, os resultados obtidos permitem a realização de estudos de correlação estrutura-atividade biológicos (SAR), que geralmente são realizados fazendo-se pequenas alterações na estrutura de um protótipo. Estas alterações podem incluir homologação de cadeias alquílicas, alteração do grau de insaturação, introdução ou remoção de um anel, além de outras (THOMAS, 2003).

Alguns exemplos (Figura 13) que ilustram o sucesso destas modificações em produtos naturais são o etoposídeo, agente antineoplásico utilizado na terapêutica; derivado semi-sintético da podofilotoxina (LEE, 2004); a prednisona, fármaco derivado do cortisol, cerca de 30 vezes mais potente (THOMAS, 2003).

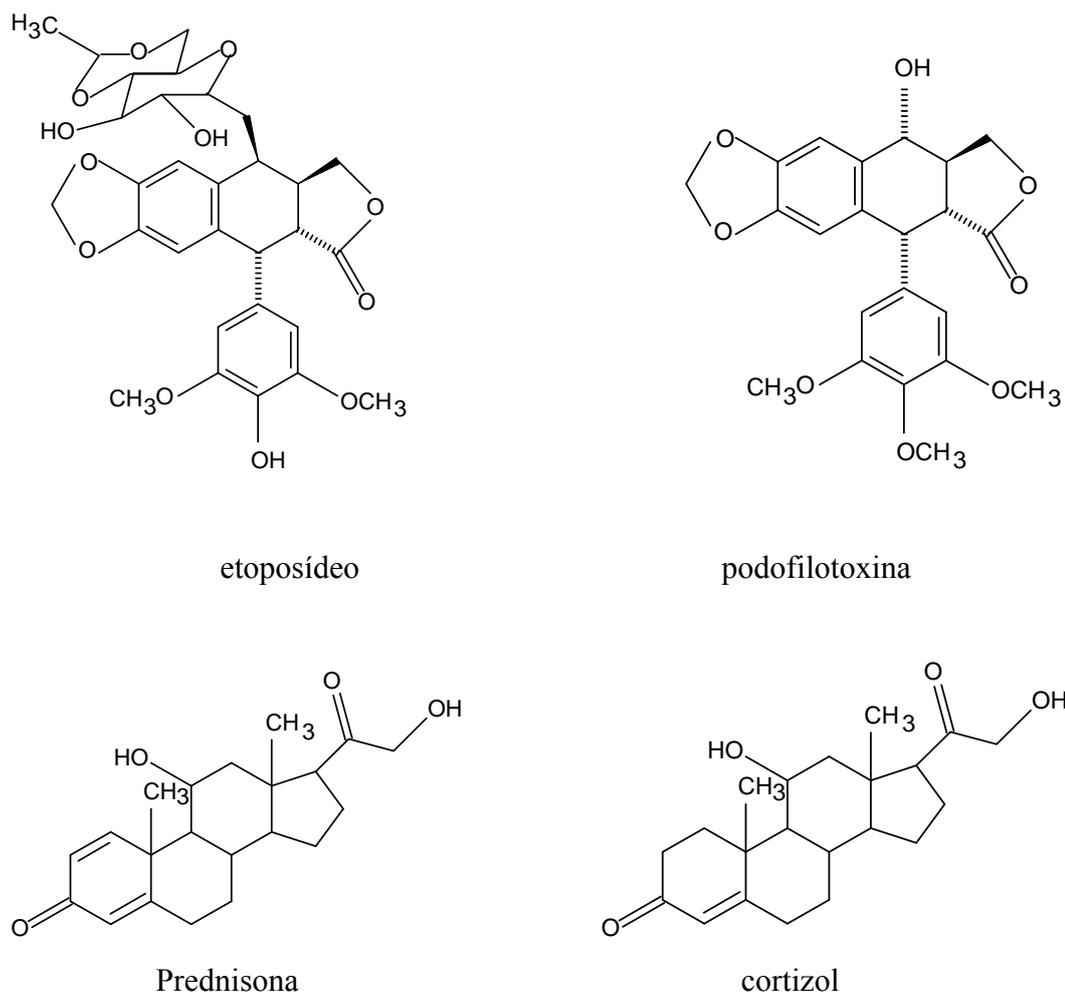


Figura 13 – Representação das estruturas químicas de etoposídeo, podofilotoxina, prednisona e cortizol.

Assim, a modificação estrutural de produtos naturais para a obtenção de novos compostos é uma das ferramentas para a produção de novas moléculas de interesse farmacológico. O grupo de pesquisa - Química de Líquens da UFMS vem desenvolvendo, há algum tempo, modificações estruturais de compostos de líquens, visando a busca de novos compostos bioativos. Várias substâncias já foram alvo de modificação estrutural e os produtos obtidos mostraram-se potencialmente ativos. Os depsídeos ácidos lecanórico e perlatólico; as depsidonas ácidos salazínico, norstítico e protocetrário e a xantona liquexantona foram as substâncias modificadas. Nos depsídeos e nas depsidonas as modificações foram realizadas através de reações com álcoois com a finalidade de produzir produtos alquilados. No caso dos depsídeos ácidos lecanórico e perlatólico os produtos resultantes foram os ésteres alquílicos do ácido orselínico e do ácido 2-hidróxi-4-metóxi-6-*n*-pentil-benzóico (metila, etila, *n*-propila, *n*-butila, *n*-pentila, *n*-hexila, isopropila, *sec*-butila e *terc*-butila.). Esses produtos foram avaliados quanto as atividades antimicrobiana, toxicidade sobre *Artemia salina*,

antioxidante, alelopática e citotóxica (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2006; GIANINI *et al.*, 2007; PERES *et al.* 2009; BOGO *et al.*, 2010).

A depsidona ácido salazínico foi também tratada com álcoois e resultaram os ácidos 8'9'- di-*O*-alquil salazínico. Os derivados *n*-butila, *n*-pentila e *n*-hexila foram potencialmente citotóxicos contra linhagens de células tumorais HCT-8, SF-295 e MDA/MB-435 (MICHELETTI *et al.*, 2009).

Neste trabalho os derivados alquílicos dos ácidos norstítico e protocetrárico foram avaliados sobre as células tumorais HT-29, 786-0, MCF7, B16 F10, HEP₂, UACC-62, PC-03 e sobre células normais 3T3. A Figura 14 mostra as estruturas das substâncias derivadas do ácido norstítico mencionadas e a tabela 4, os resultados da atividade antiproliferativa. A seletividade dos compostos frente às linhagens neoplásicas está indicada na tabela 5 .

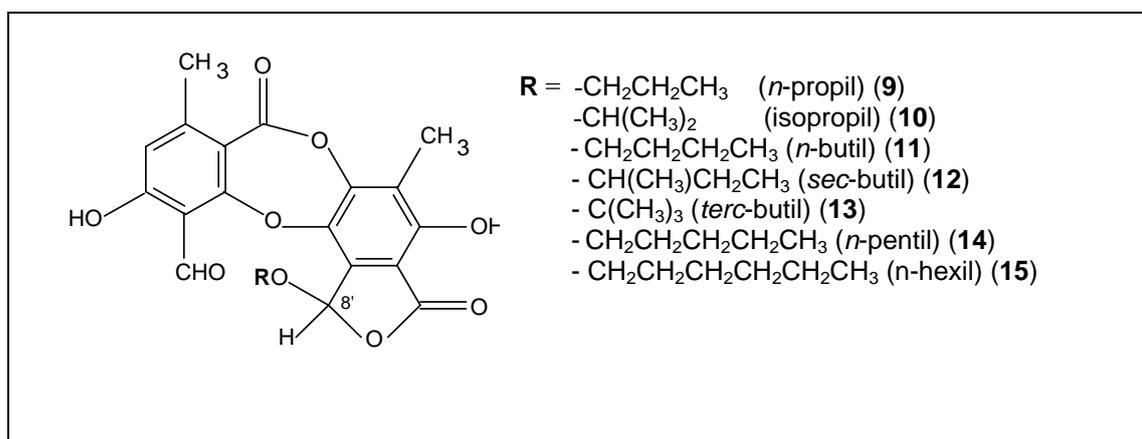


Figura 14 – Derivados alquílicos do ácido norstítico (9) –(15).

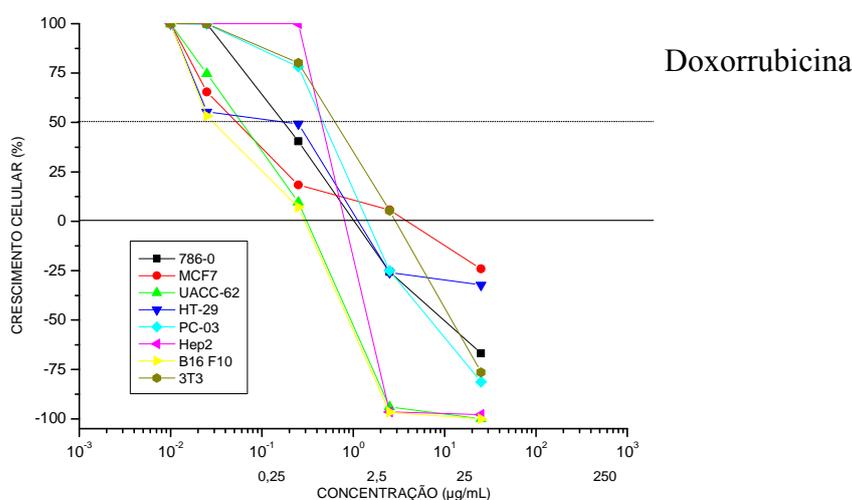


Figura 15 - Atividade antiproliferativa da doxorubicina frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,025; 0,25; 2,5; 25µg/mL), durante 48h.

Tabela 4 - Valores de GI₅₀* (µg/mL e µM) para os derivados alquílicos do ácido norstítico e doxorrubicina (controle positivo).

LINHAGENS	HT-29		786-0		MCF7		B16 F10		HEP ₂		UACC-62		PC-03		3T3	
SUBSTÂNCIA	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
Ác. 8'- <i>O-n</i> -propil-norstítico (9)	194,49	472	59,77	145	171,19	415	>250**>606**		27,6	67	21,64	52	12,72	31	25,86	63
Ác. 8'- <i>O-n</i> -butil-norstítico (11)	16,39	38	12,06	28	5,68	13	19,29	45	3,4	8	4,94	12	2,73	6	267,83	628
Ác. 8'- <i>O-n</i> -pentil-norstítico (14)	16,9	38	33,72	76	6,87	16	24,51	56	21,32	48	16,73	38	3,88	9	25,33	57
Ác. 8'- <i>O-n</i> -hexil-norstítico (15)	3,27	7	14,33	31	4,35	10	25,72	57	2,72	6	23,57	52	3,3	7	25,06	55
Ác. 8'- <i>O</i> -isopropil-norstítico (10)	20,79	50	20,76	50	24,57	60	4	10	3,22	8	2,57	6	0,53	1	17,92	43
Ác. 8'- <i>O-sec</i> -butil-norstítico (12)	5,27	12	9,16	21	2,91	7	3,95	9	3,26	8	12,6	29	22,49	53	254,47	597
Ác. 8'- <i>O-terc</i> -butil-norstítico (13)	59,44	139	27,11	63	27,51	64	38,71	91	24,77	58	28,77	67	3,26	8	16,49	39
Doxorrubicina	0,26	0,44	0,09	0,15	0,05	0,08	0,25	0,43	0,38	0,65	0,07	0,12	0,02	0,03	0,32	0,55

*Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa *ORIGIN* 6,0.

** Não foi possível calcular

Tabela 5 - Índice de Seletividade (IS)* dos derivados alquílicos do ácido norstítico.

COMPOSTOS	HT-29	786-0	MCF7	B16 F10	HEP ₂	UACC-62	PC- 03
Ác. 8'- <i>O-n</i> -propil-norstítico (9)	0,1	0,4	0,1	>0,1**	0,9	1,1	2,0
Ác. 8'- <i>O-n</i> -butil-norstítico (11)	16,3	22,2	47,1	13,8	78,7	54,2	98,1
Ác. 8'- <i>O-n</i> -pentil-norstítico (14)	1,4	0,7	3,6	1,0	1,1	1,5	6,5
Ác. 8'- <i>O-n</i> -hexil-norstítico (15)	7,6	1,7	5,7	0,9	9,2	1,0	7,5
Ác. 8'- <i>O</i> -isopropil-norstítico (10)	0,8	0,8	0,7	4,4	5,5	6,9	33,8
Ác. 8'- <i>O-sec</i> -butil-norstítico (12)	48,2	27,7	87,4	64,4	78,0	20,1	11,3
Ác. 8'- <i>O-terc</i> -butil-norstítico (13)	0,2	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	5,0

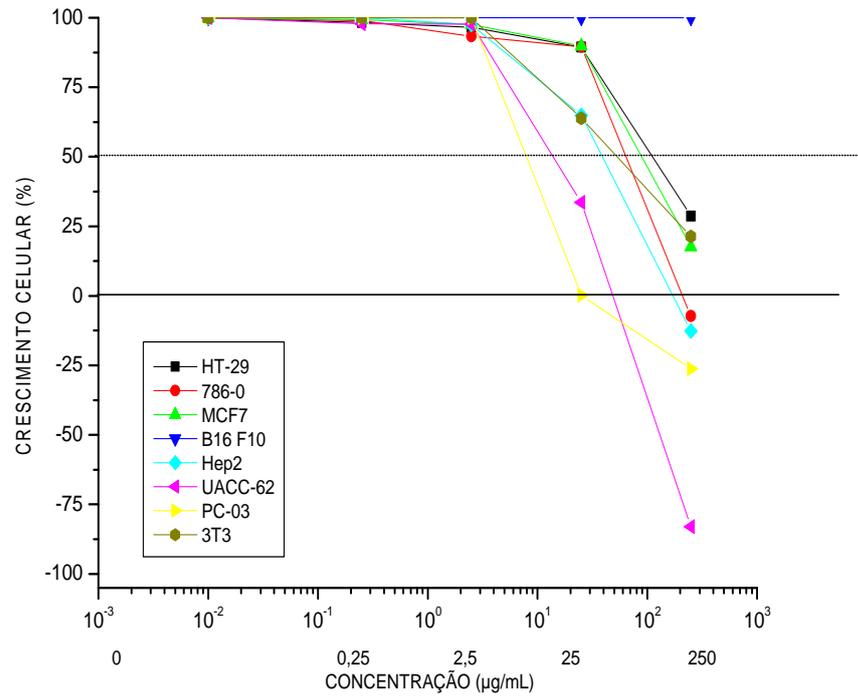
* IS significativos para valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

** Não foi possível calcular.

O ácido 8'-*O-n*-propil-norstítico (9) apresentou atividade citotóxica em HEP₂, UACC-62 e PC-03, com valores de GI₅₀ iguais a 27,6µg/mL (67µM) ; 21,64µg/mL (52µM) e 12,72µg/mL (31µM), respectivamente. Porém, também demonstrou atividade em 3T3 (GI = 5,86µg/mL (63µM)). O composto foi inativo em B16 F10, apresentando GI₅₀ > 250 µg/mL.

Na figura 16, fica evidente a inatividade do ácido 8'-*O-n*-propil-norstítico (9) frente a linhagem B16 F10. O efeito citocida é verificado nas linhagens UACC-62, 786-0, HEP₂ e PC-03. As linhagens HT-29, 3T3 e MCF7 apresentaram atividade citostática, inferindo a baixa toxicidade do ácido composto frente a linhagem normal. A maior atividade está demonstrada nas linhagens PC-03 e UACC-62.

ácido 8'-*O*-*n*-propil-norstítico (9)



ácido 8'-*O*-*n*-butil-norstítico (11)

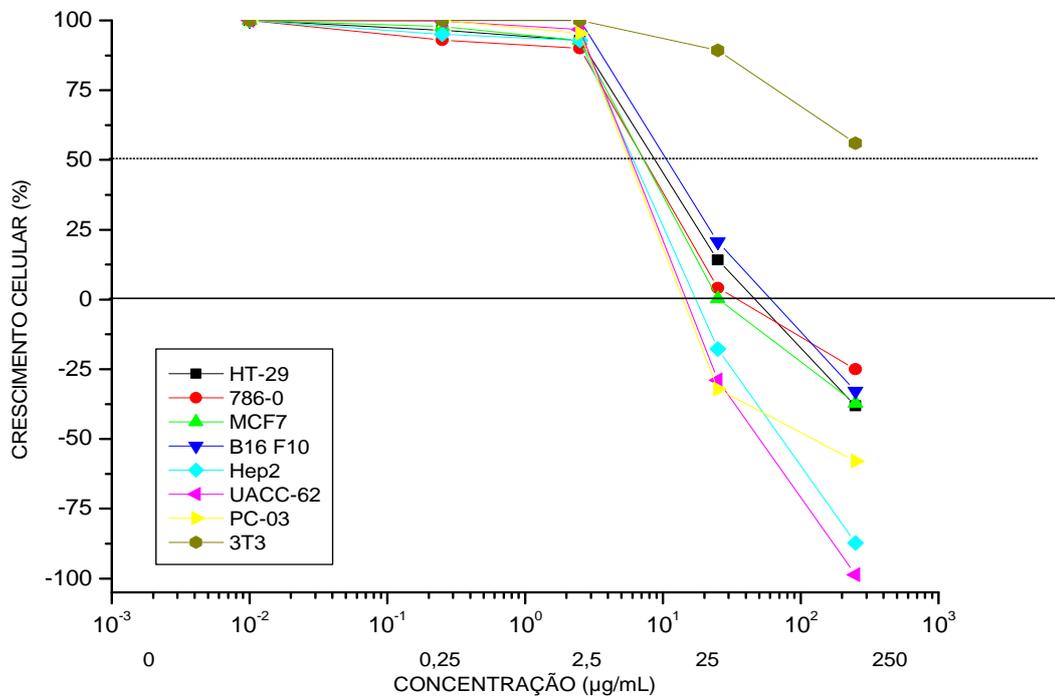


Figura 16 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido norstítico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

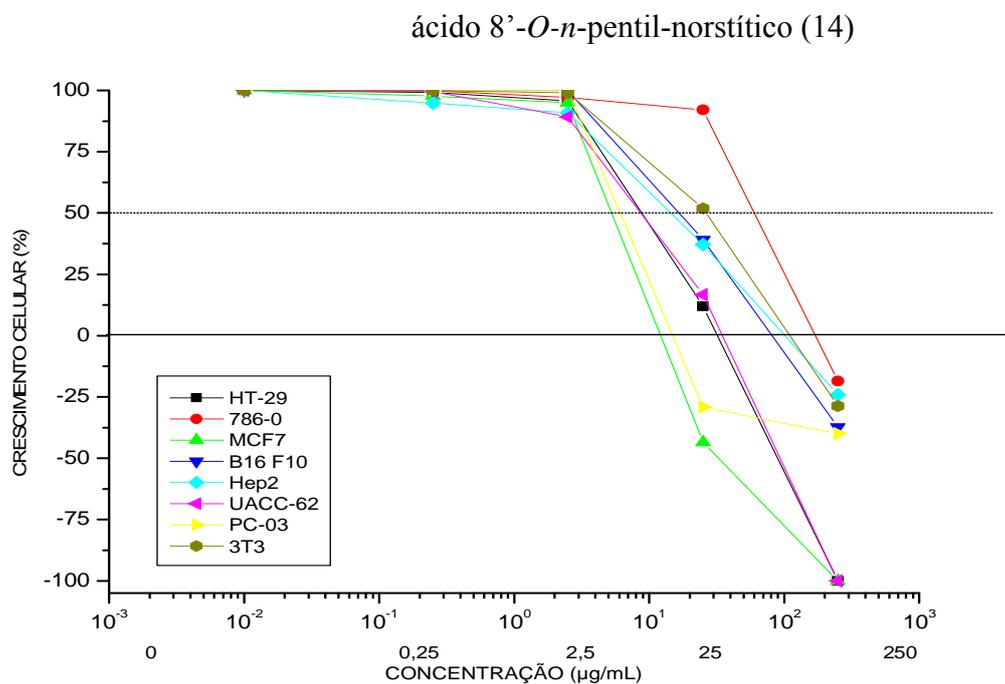
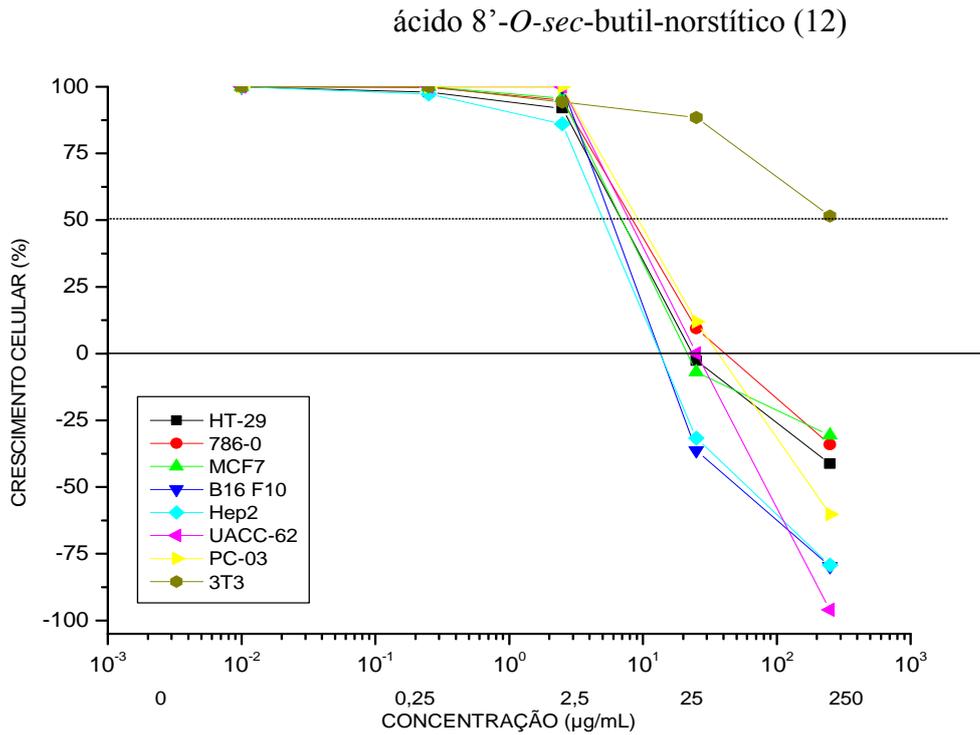


Figura 16 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido norstítico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

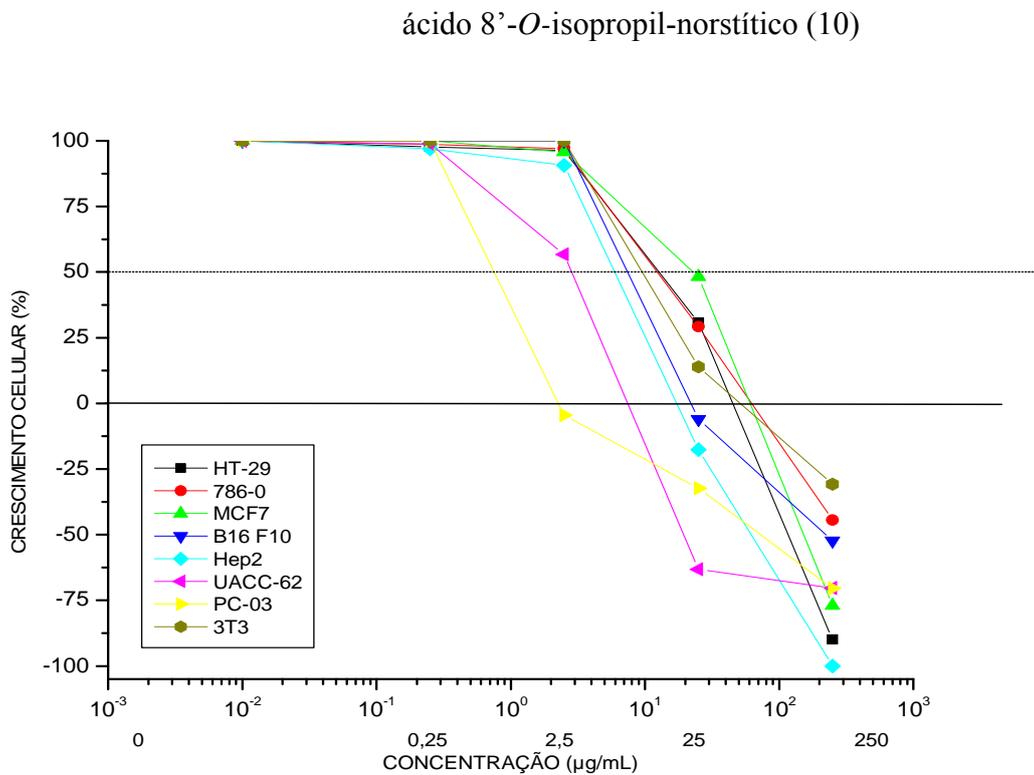
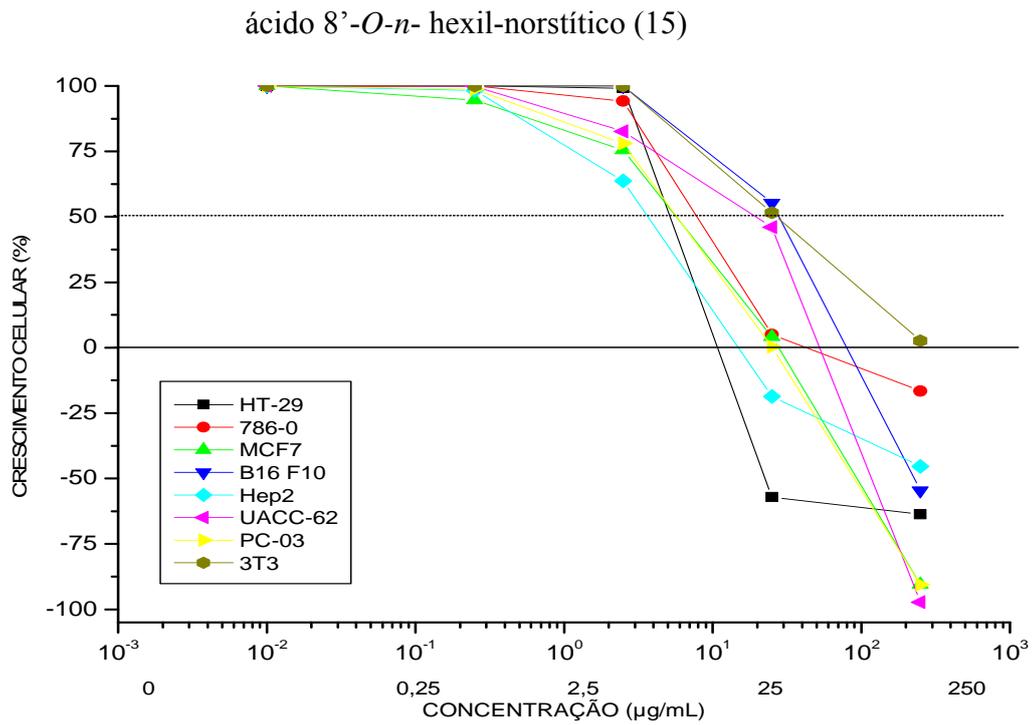


Figura 16 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido norstítico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

ácido 8'-*O*-*terc*-butil-norstítico (13)

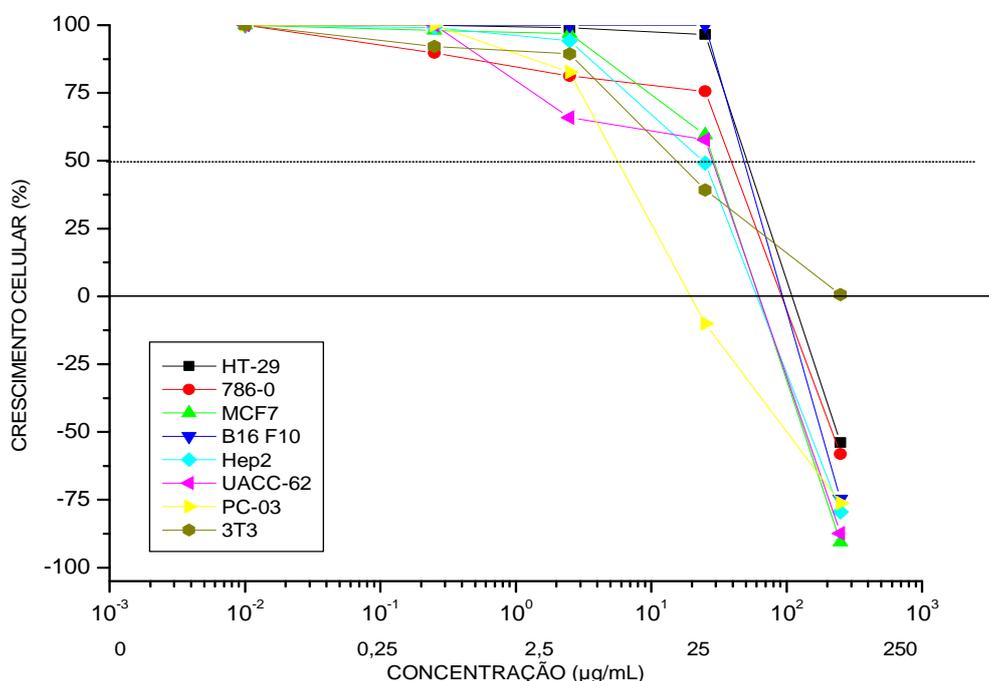


Figura 16 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido norstítico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

O ácido 8'-*O*-*n*-butil norstítico (11) foi ativo em todas as linhagens neoplásicas com valores de GI₅₀ abaixo de 20 µg/mL, destacando-se PC-03 (2,73 µg/mL - 6 µM), HEP₂ (3,4 µg/mL - 8 µM), UACC-62 (4,94 µg/mL - 12 µM) e MCF7 (5,68 µg/mL - 13 µM). Na linhagem normal, este composto não foi considerado citotóxico apresentando GI₅₀ = 267,83 µg/mL - 628 µM.

O comportamento do ácido 8'-*O*-*n*-butil-norstítico (11) pode ser observado na figura 16, indicando sua potente atividade, uma vez que os valores de GI₅₀ para todas as linhagens neoplásicas encontram-se próximos de 2,5µg/mL. O composto demonstrou ser inativo e, portanto não apresentou citotoxicidade na linhagem normal. Nas demais se verificou o perfil citostático e citocida.

O ácido 8'-*O*-*sec*-butil-norstítico (12) foi ativo em todas as linhagens neoplásicas, destacando-se GI₅₀ de 2,91 µg/mL - 7 µM para MCF7 e 22,49 µg/mL - 53 µM para PC-03. O valor de 254,47 µg/mL deste composto na linhagem 3T3 demonstra não ser citotóxico para células normais.

Analisando o gráfico do ácido 8'-*O-sec*-butil-norstítico (12), (Figura 16), pode-se notar que segue o mesmo comportamento do ácido 8'-*O-n*-butil-norstítico (11) em relação a linhagem de célula normal, com GI₅₀ > 250 µg/mL e portanto não citotóxico.

Os ácidos 8'-*O-n*-butil-norstítico (11) e 8'-*O-sec*-butil-norstítico (12), que apresentam o mesmo peso molecular (426,419g/mol), foram considerados compostos com elevada potência antiproliferativa uma vez que os valores de GI₅₀ variaram de 2,73µg/mL (6µM) em PC 03 a 19,29µg/mL (45µM) em B16 F10 para o primeiro e 2,91µg/mL (7µM) em MCF7 a 22,49µg/mL (53µM) em PC-03 para o segundo. Ressalta-se a importância destes dois compostos por apresentarem potente atividade antiproliferativa em todas as linhagens neoplásicas e valores de GI₅₀ maiores que 250µg/mL na linhagem normal 3T3. O composto ácido 8'-*O-n*-butil norstítico (11) foi 98 vezes mais seletivo em PC-03, 78,77 vezes mais seletivo em HEP₂ e 54,21 vezes mais seletivo em UACC-62. O ácido 8'-*O-sec*-butil-norstítico (12) foi 87,44 vezes mais seletivo em MCF7, 78,05 vezes em HEP₂ e 64,42 em B16 F10. A importância deste resultado reside no fato de que uma droga ideal para o combate ao câncer é aquela que seja tóxica para células cancerosas, mas pouco prejudicial às células normais. Na realidade, a grande maioria das drogas antineoplásicas é bastante lesiva para o organismo que a recebe, daí a validade dos ensaios de citotoxicidade como triagem preliminar (FÁVARO *et al.*, 1990).

O ácido 8'-*O-n*-pentil-norstítico (14) foi considerado ativo em todas as linhagens com GI₅₀ de 3,88µg/mL (9µM) em PC-03 a 24,51µg/mL (16µM) em B16 F10. Porém também foi ativo na linhagem 3T3 com GI₅₀ igual a 25,33µg/mL (57µM). O mesmo aconteceu com o ácido 8'-*O-n*-hexil-norstítico (15), apresentando GI₅₀ igual a 25,06µg/mL (55µM) em 3T3 e forte atividade antiproliferativa nas demais linhagens como 2,72µg/mL (6µM) em HEP₂, 3,27 µg/mL (7µM) em HT-29, 3,3 µg/mL (7µM) em PC-03 e 4,35 µg/mL (10µM) em MCF7 sendo mais seletivo em HEP₂ (IS = 9,21).

Observando-se a figura 16, o ácido 8'-*O-n*-pentil-norstítico (14) produziu inibição do crescimento e morte celular em todas as linhagens com boa correlação concentração e efeito. Menor atividade foi verificada em 786-0. O ácido 8'-*O-n*-pentil-norstítico (14) foi mais ativo e mais seletivo em PC-03 e MCF7.

O ácido 8'-*O-n*-hexil-norstítico (15), (Figura 16) demonstrou potente atividade sobre as linhagens HEP₂, PC-03, HT-29 e MCF7. Em todas as linhagens o composto manifestou perfil citostático e citocida, exceto em 3T3, cuja atividade do composto foi apenas citostática.

O derivado ácido 8'-*O*-isopropil-norstítico (10) foi também ativo em todas as linhagens, inclusive na linhagem normal ($GI_{50} = 17,92\mu\text{g/mL}$ ($43\mu\text{M}$). Destaca-se a GI_{50} encontrada para a linhagem PC-03 que foi de $0,53\mu\text{g/mL}$ ($1\mu\text{M}$) (com $IS = 33,81$), seguido de UACC-62, HEP₂ e B16 F10, com GI $2,57\mu\text{g/mL}$ ($6\mu\text{M}$); $3,22\mu\text{g/mL}$ ($8\mu\text{M}$) e $4\mu\text{g/mL}$ ($10\mu\text{M}$). No gráfico da atividade antiproliferativa do ácido 8'-*O*-isopropil-norstítico (10), (Figura 16), verifica-se atividade citostática e citocida em todas as linhagens.

O composto ácido 8'-*O*-*terc*-butil-norstítico (13) foi ativo sobre 786-0, HEP₂, UACC-62, PC-03 e MCF7, com GI_{50} variando de $24,77\mu\text{g/mL}$ ($58\mu\text{M}$) a $28,77\mu\text{g/mL}$ ($67\mu\text{M}$) e GI de $3,26\mu\text{g/mL}$ ($8\mu\text{M}$) para a linhagem PC-03. Entretanto, este composto também apresentou atividade antiproliferativa em linhagem normal com $GI = 16,49\mu\text{g/mL}$.

A curva concentração-resposta (Figura 16) do ácido 8'-*O*-*terc*-butil-norstítico (13) mostrou a inibição do crescimento celular da linhagem normal, sem morte celular, demonstrando baixa toxicidade na linhagem 3T3. Perfil cotostático e citocida pode ser verificado nas demais linhagens neoplásicas. O composto foi mais potente frente a PC-03, indicando uma seletividade maior para esta linhagem.

Portanto, comparando a atividade do ácido norstítico e de seus derivados alquílicos frente às células testadas, pode-se afirmar que as modificações estruturais realizadas no ácido norstítico contribuíram para o aumento efetivo da atividade antiproliferativa.

Os derivados alquílicos do ácido protocetrário também foram avaliados frente às mesmas linhagens celulares (Figura 17). As tabelas 6 e 7 apresentam os resultados encontrados.

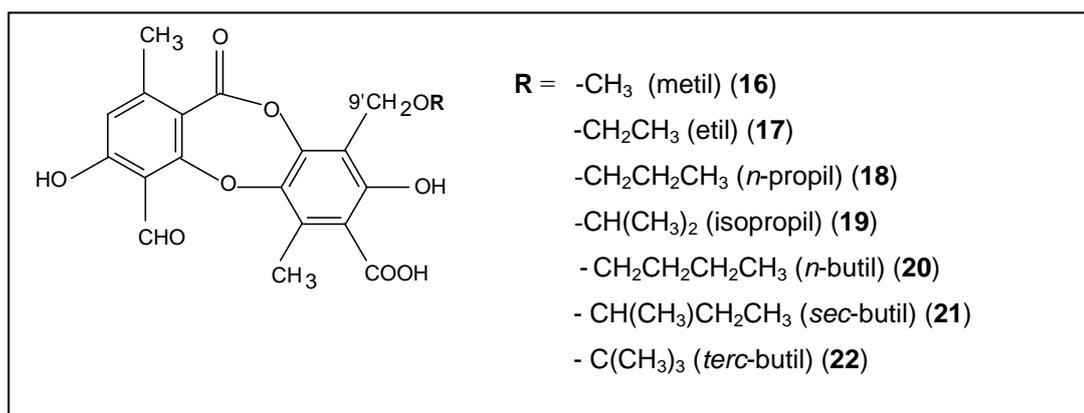


Figura 17 - Derivados alquílicos do ácido protocetrário (16)–(22).

Tabela 6 - Valores de GI₅₀* (µg/mL e µM) para os derivados alquílicos do ácido protocetrárico e doxorrubicina (controle positivo).

COMPOSTOS	786-0	MCF7	UACC-62	HT-29	PC-03	HEP ₂	B16 F10	3T3
SUBSTÂNCIAS	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM	µg/mL µM
Ác. 9'-O-metil protocetrárico (16)	83,38 215	34,25 88	44,11 114	46,86 121	232,23 598	30,18 78	247,74 638	20,97 54
Ác. 9'-O-etil – protocetrárico (17)	83,6 208	37,57 93	59,63 148	143,6 357	84,06 209	33,72 84	252,34 627	34,56 86
Ác. 9'-O-n-propil protocetrárico (18)	68,68 165	36,85 88	35,21 85	27,31 66	32,1 77	64,43 155	208,07 500	37,61 90
Ác. 9'-O-isopropil protocetrárico (19)	58,54 141	35,7 86	43,81 105	29,21 70	78,5 188	65,1 156	124,18 298	44,96 108
Ác. 9'-O-n-butil- protocetrárico (20)	59,3 138	28,36 66	38,48 89	32,42 75	38,04 88	44,09 102	81,54 190	63,54 148
Ác. 9'-O-sec-butil protocetrárico (21)	44,02 102	31,48 73	27,03 63	28,25 66	27,04 63	77,4 180	81,06 188	33,58 78
Ác. 9'-O-terc-butil protocetrárico (22)	55,51 129	49,99 116	27,42 64	32,54 76	65,72 153	39,65 92	30,5 71	43,35 101
Doxorrubicina	0,24 0,41	0,06 0,10	0,02 0,03	0,25 0,43	0,26 0,44	0,02 0,03	0,02 0,03	0,55 0,94

Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa *ORIGIN* 6,0.

Tabela 7- Índice de Seletividade (IS)* dos derivados do ácido protocetrário

COMPOSTOS	786-0	MCF7	UACC 62	HT-29	PC-03	HEP ₂	B16 F10
Ác. 9'- <i>O</i> -metil protocetrário (16)	0,25	0,61	0,47	0,44	0,09	0,69	0,08
Ác. 9'- <i>O</i> -etil – protocetrário (17)	0,41	0,91	0,57	0,24	0,41	1,02	0,13
Ác. 9'- <i>O</i> - <i>n</i> -propil protocetrário (18)	0,54	1,02	1,06	1,37	1,17	0,58	0,18
Ác. 9'- <i>O</i> -isopropil protocetrário (19)	0,76	1,25	1,02	1,53	0,57	0,69	0,36
Ác. 9'- <i>O</i> - <i>n</i> -butil- protocetrário (20)	1,07	2,24	1,65	1,95	1,67	1,44	0,77
Ác. 9'- <i>O</i> - <i>sec</i> -butil protocetrário (21)	0,76	1,06	1,24	1,18	1,24	0,43	0,41
Ác. 9'- <i>O</i> - <i>terc</i> -butil protocetrário (22)	0,78	0,86	1,58	1,33	0,65	1,09	1,42

* IS significativos para valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Comparando os resultados da atividade do ácido protocetrário com aqueles de seus derivados alquílicos frente às mesmas linhagens celulares, verifica-se que na maioria dos casos a atividade citotóxica foi moderada. Na linhagem 3T3, o ácido 9'-*O*-metil protocetrário (16) foi o mais citotóxico e apresentou uma GI₅₀ de 20,97µg/mL (54µM). O ácido 9'-*O*-*n*-propil protocetrário (18) apresentou elevada potencia em HT-29 (27,31µg/mL - 66µM) da mesma forma que o ácido 9'-*O*-butil protocetrário (20) com GI₅₀ de 28,36µg/mL (66µM) em MCF7. O ácido 9'-*O*-isopropil protocetrário (19) apresentou GI₅₀ = 29,21µg/mL (70µM) na linhagem HT-29 e o ácido 9'-*O*-*sec*-butil protocetrário (21) foi ativo em UACC-62, HT-29 e PC-03 com GI₅₀ variando de 27,03 a 28,25µg/mL (59 a 66µM). O ácido 9'-*O*-*terc*-butil protocetrário (22) foi ativo com uma GI₅₀ de 27,42µg/mL (64µM) na linhagem UACC-62.

As GI₅₀ dos derivados quando comparados com o ácido protocetrário, não demonstraram grandes diferenças dentro de uma mesma linhagem. O composto que

apresentou IS = 2,24 foi o Ácido 9'-*O-n*-butil-protocetrárico (20), os demais compostos não foram seletivos para nenhuma linhagem neoplásica.

Bezivin *et al.*, (2004) isolaram e elucidaram a estrutura da depsidona ácido 9'-*O*-metil protocetrárico do líquen *Caldonia convoluta*. A citotoxicidade deste composto foi determinada pelo método de MTT e nas linhagens celulares L1210 (carcinoma murino de pulmão de Lewis), K562 (leucemia mielogênica), DU 145 (metástase de cérebro humano de carcinoma de próstata), MCF7 (adenocarcinoma de mama), U251 (glioblastoma humano). O composto ácido 9'-*O*-metil protocetrárico apresentou atividade > 100µg/mL.

A figura 18 permite uma melhor visualização da atividade antiproliferativa dos derivados do ácido protocetrárico.

No gráfico do ácido 9'-*O*-metil protocetrárico (16) representado na Figura 18, pode-se verificar que o composto inibiu o crescimento de B16 F10, PC-03 e HT-29 (efeito citostático) e causou morte celular em UACC-62, 3T3, MCF7 e HEP₂ (efeito citocida). Não houve seletividade para nenhuma linhagem.

O ácido 9'-*O*-etil protocetrárico (17), (Figura 18) apresentou inibição do crescimento da linhagem HT 29 e não foi ativo na linhagem B16 F10. Nas demais linhagens a atividade deste composto foi citocida. Porém não houve seletividade para nenhuma linhagem neoplásica.

A curva concentração-resposta do ácido 9'-*O-n*-propil protocetrárico (18), (Figura 18), demonstra que o composto produziu inibição do crescimento para a linhagem B16 F10 e morte celular para as demais linhagens, inclusive para a normal. A maior atividade foi observada na linhagem HT-29, porém não houve seletividade em nenhuma linhagem.

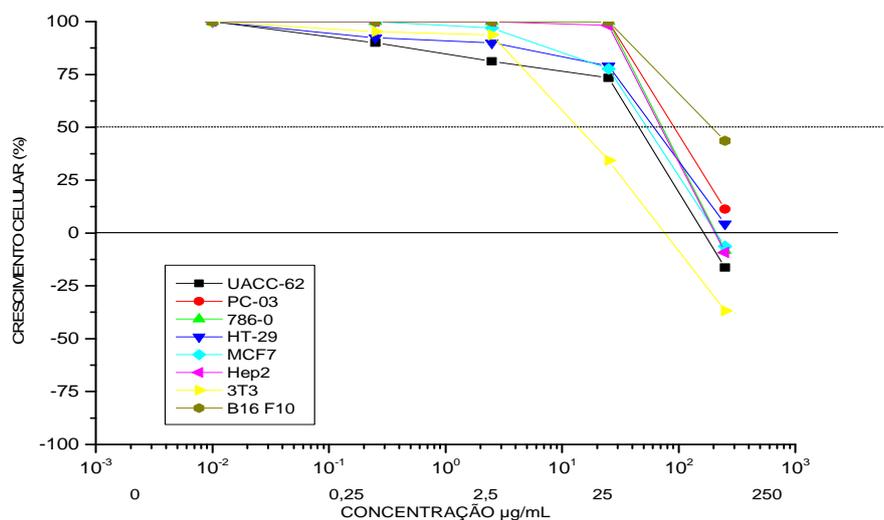
O perfil de ação do ácido 9'-*O-n*-butil-protocetrárico (20), (Figura 18), demonstra comportamento semelhante para todas as linhagens, apresentando efeito citostático e citocida nas oito linhagens testadas.

O gráfico da atividade antiproliferativa do ácido 9'-*O*-isopropil protocetrárico (19), (Figura 18) retrata a ação citocida do composto em todas as linhagens, exceto na B16 F10, cuja atividade foi de inibição de crescimento mas não de morte celular. Não houve seletividade para nenhuma linhagem.

A análise do gráfico da atividade antiproliferativa do ácido 9'-*O-sec*-butil protocetrárico (21) mostrou sua atividade citostática e citocida presente em todas as linhagens, inclusive na normal (Figura 18). A curva concentração-resposta do ácido 9'-*O-terc*-butil

protocetrário (22) demonstrou inibição de crescimento e morte celular para todas as linhagens. O composto não apresentou seletividade para nenhuma linhagem (Figura 18).

ácido 9^o-*O*-metil protocetrário (16)



ácido 9^o-*O*-etil protocetrário (17)

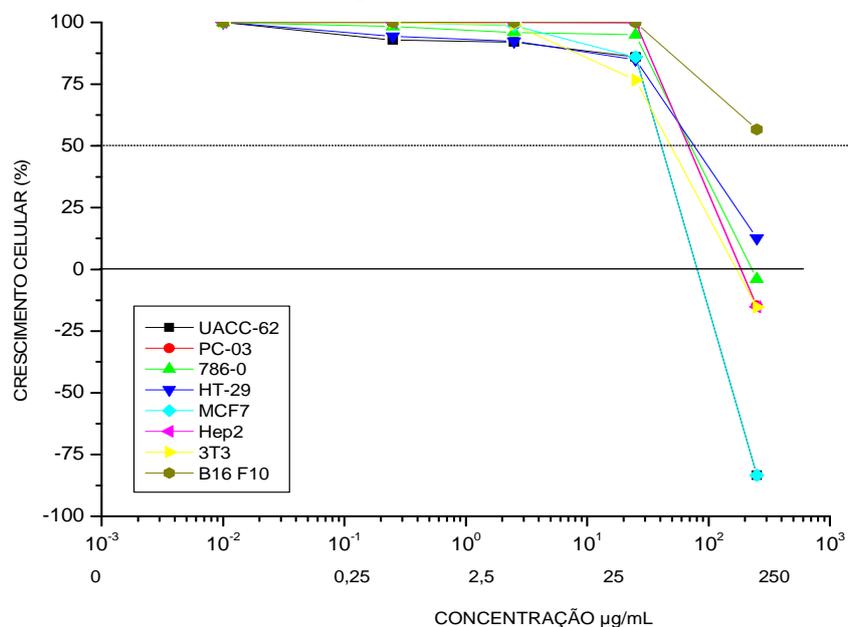
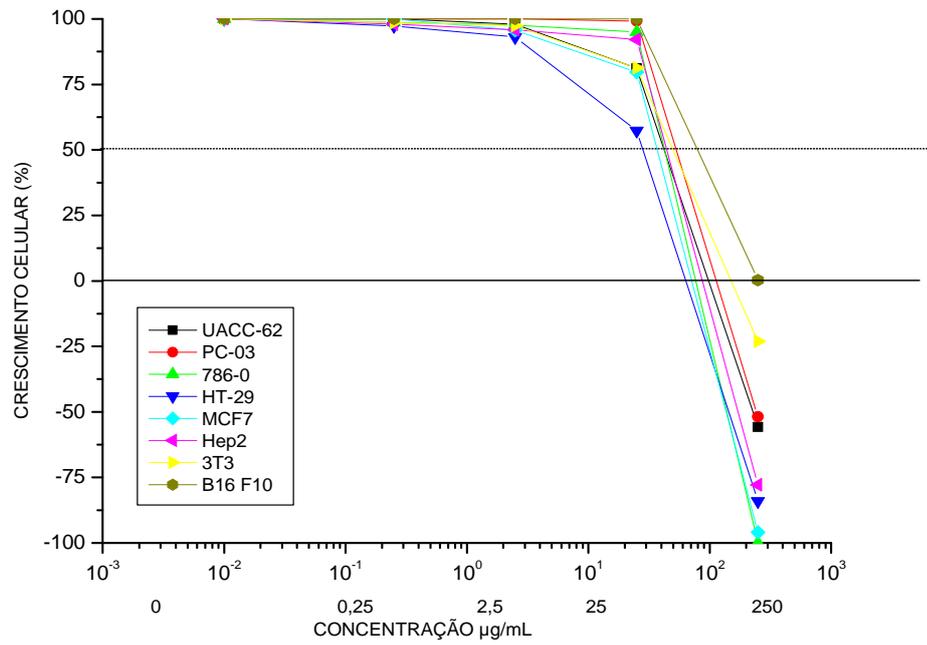


Figura 18 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido protocetrário frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

ácido 9'-*O*-*n*-propil protocetrário (18)



ácido 9'-*O*-isopropil protocetrário (19)

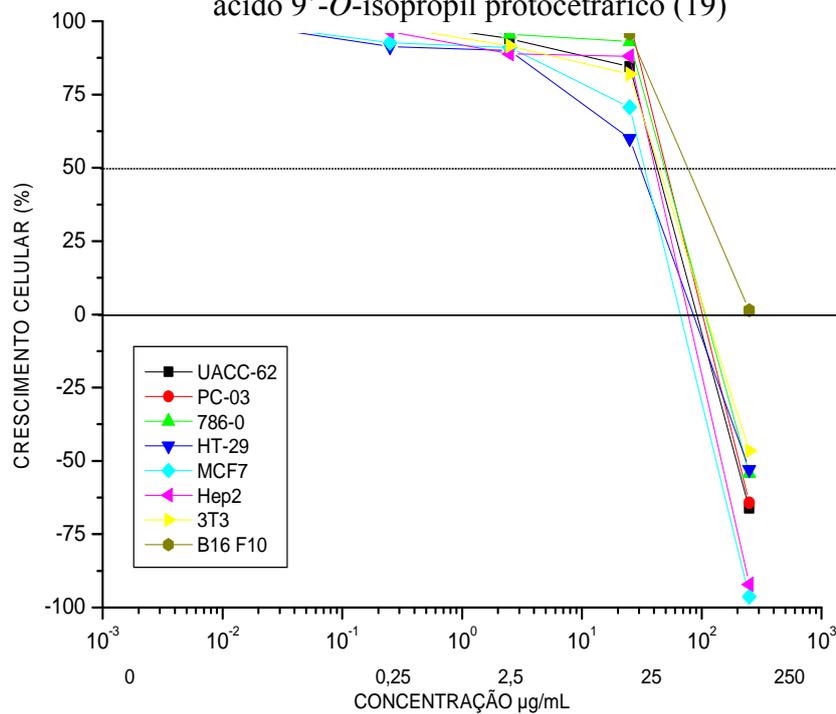
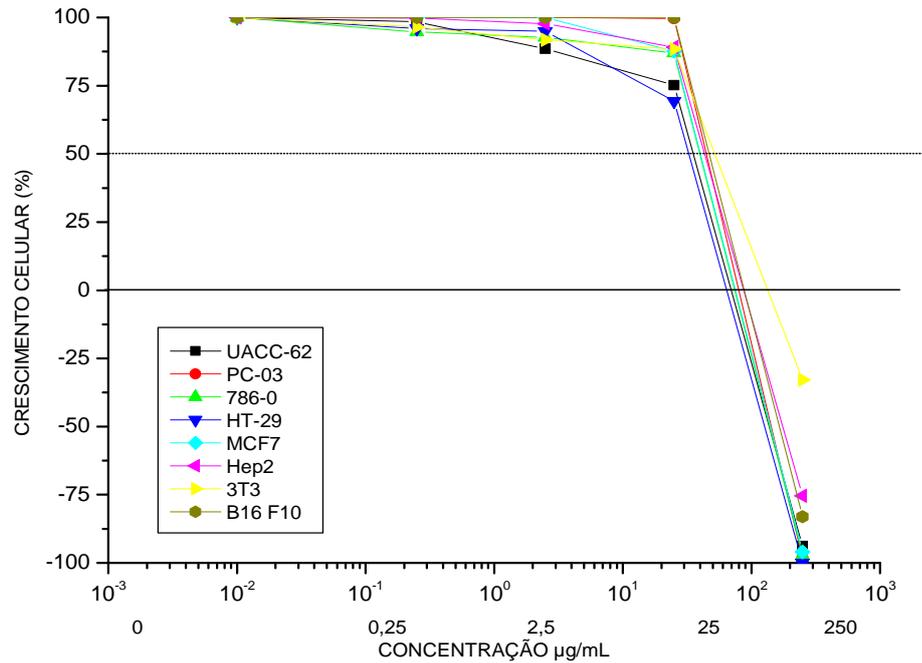


Figura 18 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido protocetrário frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48h.

ácido 9²-*O*-*n*-butil-protocetrárico (20)



ácido 9²-*O*-*sec*-butil protocetrárico (21)

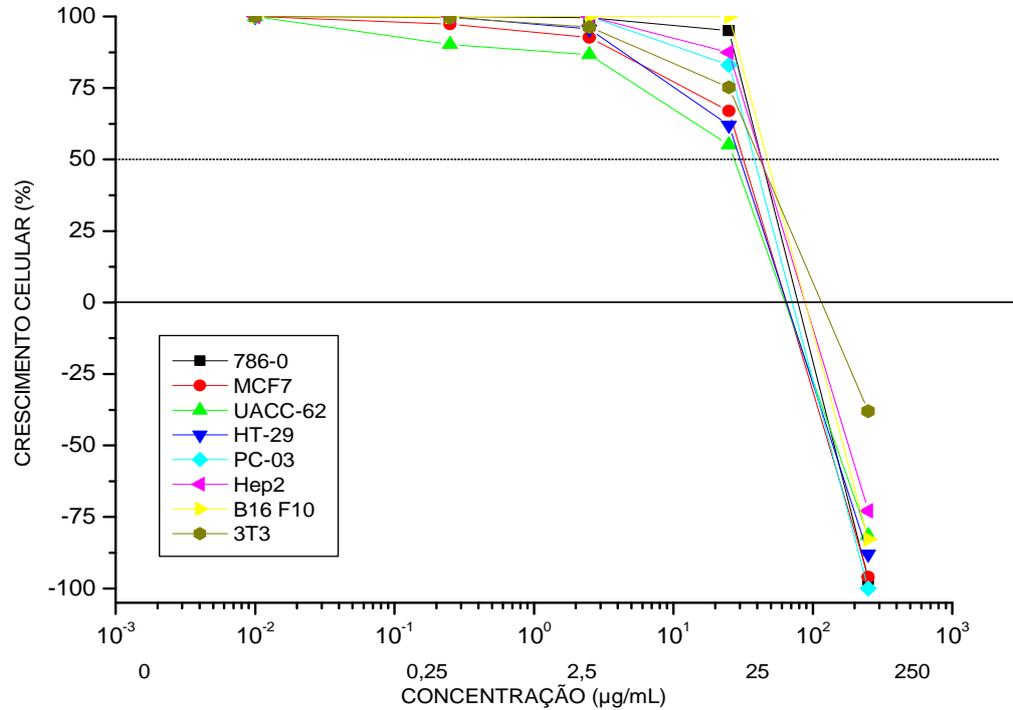


Figura 18 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido protocetrárico frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/mL), durante 48h.

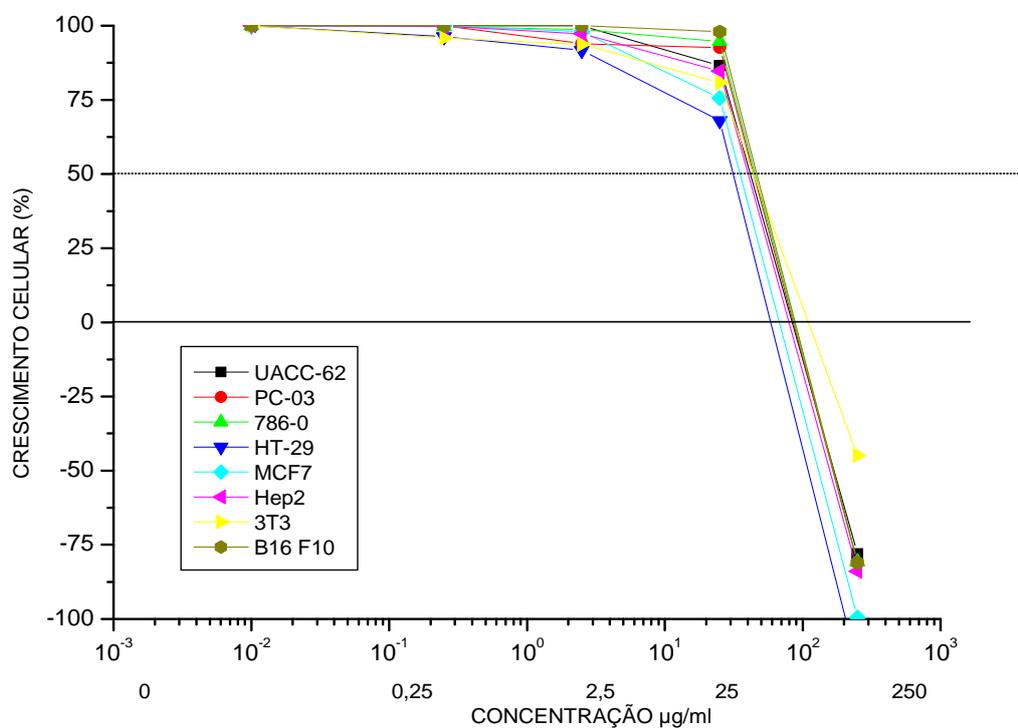
ácido 9'-*O*-*terc*-butil protocetrário (22)

Figura 18 - Atividade antiproliferativa dos derivados alquílicos do ácido protocetrário frente a linhagem de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL), durante 48h.

5.2 Avaliação da atividade anticâncer *in vivo* do ácido protocetrárico sobre o melanoma B16 F10

5.2.1 Ensaio *in vivo* com ácido protocetrárico

A biotransformação de uma droga frequentemente influencia a magnitude dos seus efeitos em suas atividades biológicas *in vivo*, bem como sua absorção, distribuição e excreção (STRAUGHAM *et al.*, 1997). O ácido protocetrárico demonstrou resultados promissores quanto a atividade antiproliferativa *in vitro* (GI = 23,99 na linhagem B16-F10), tornando-se relevante avaliar esse efeito *in vivo*.

Após a administração do ácido protocetrárico foram observados os sinais físicos e comportamentais dos animais nos tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos. Após 5 minutos da administração da doxorrubicina, um animal foi a óbito. Os animais tratados com doxorrubicina e ácido protocetrárico nas concentrações de 15mg e 22,5mg/animal apresentaram tremores, respiração ofegante e piloereção nos primeiros 60 minutos, permanecendo assim até os 120 minutos. Os animais do grupo controle negativo (PBS) apresentaram comportamento normal.

No tempo de 240 minutos, todos os animais do estudo já se apresentavam sem nenhuma alteração física e comportamental. Após 20 horas da administração do ácido protocetrárico 22,5mg/animal, um animal foi a óbito. O mesmo acontecendo com um animal do grupo controle negativo.

A Figura 19 mostra o efeito do tratamento com diferentes concentrações do ácido protocetrárico sobre o melanoma induzido pela linhagem B16-F10 em camundongos.

A figura 20 representa um animal do grupo controle (PBS) e ao lado, o nódulo tumoral. A média e erro padrão do peso do nódulo, volume tumoral e área encontram-se descritas na Tabela 8.

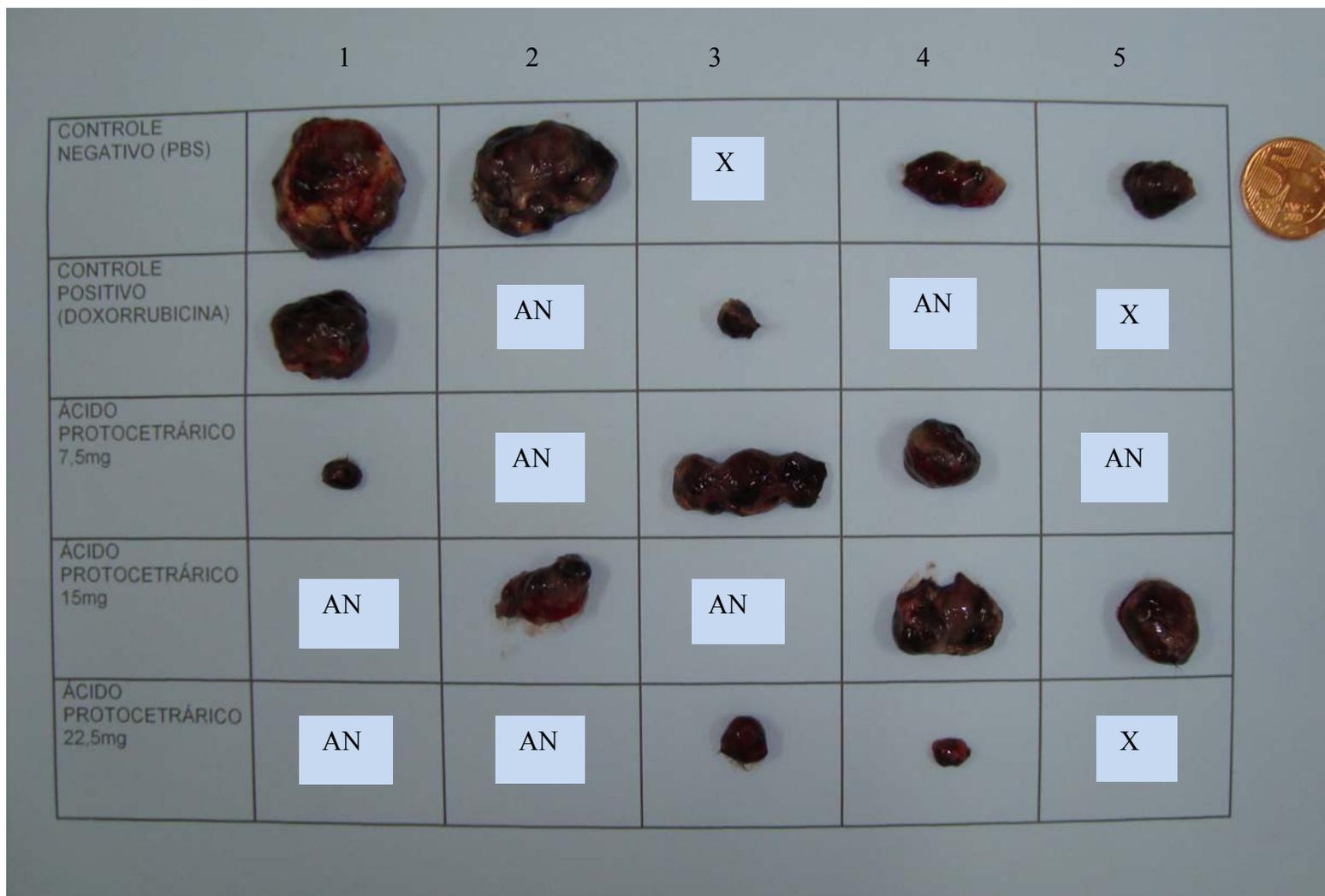


Figura 19 – Efeito do tratamento com diferentes concentrações do ácido protocatechuico sobre o crescimento dos nódulos tumorais em camundongos C57/B16 inoculados com células B16-F10 (melanoma murino), 11 dias após o tratamento. NA= Ausência de nódulo X = óbito

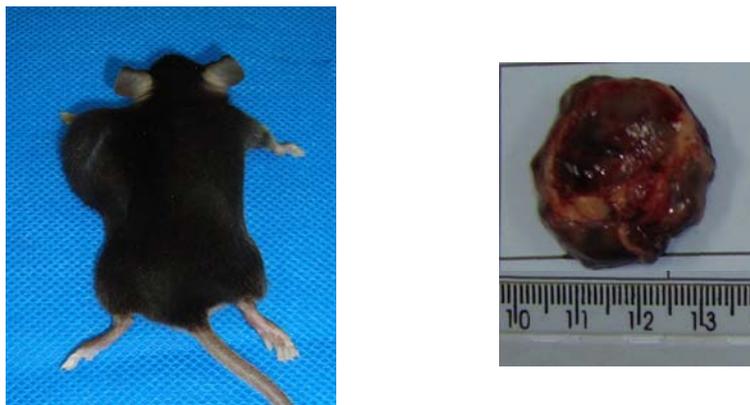


Figura 20 - Nódulo hipodérmico na região do dorso de camundongo C57BL/6 tratado com PBS. Fonte: Bogo, 2012.

Tabela 8 – Valores referentes ao Peso, Volume Tumoral e Área dos nódulos obtidos dos camundongos C57/Bl6 após tratamento com diferentes concentrações de ácido protocetrárico.

GRUPOS TRATADOS (10º dia)	PESO (g)	VOLUME (mm ³)	ÁREA (cm ²)
CONTROLE NEGATIVO (PBS) (n = 4)	3,28±1,37	3,69±2,19	3,58±1,27
CONTROLE POSITIVO (DOXORRUBICINA) (n = 4)	0,68±0,61	0,77±0,71	0,83±0,68
ÁCIDO PROTOCETRÁRICO 7,5mg (n = 5)	0,70±0,41	0,83±0,51	1,03±0,59
ÁCIDO PROTOCETRÁRICO 15mg (n = 5)	0,88±0,37	1,19±0,53	1,32±0,57
ÁCIDO PROTOCETRÁRICO 22,5mg (n = 4)	0,11±0,07*	0,14±0,10	0,24±0,16*

* = diferença significativa entre controle (PBS) e grupo tratado (ANOVA, seguida de teste de Tukey; $p < 0,05$).

Resultados expressos como média±EPM.

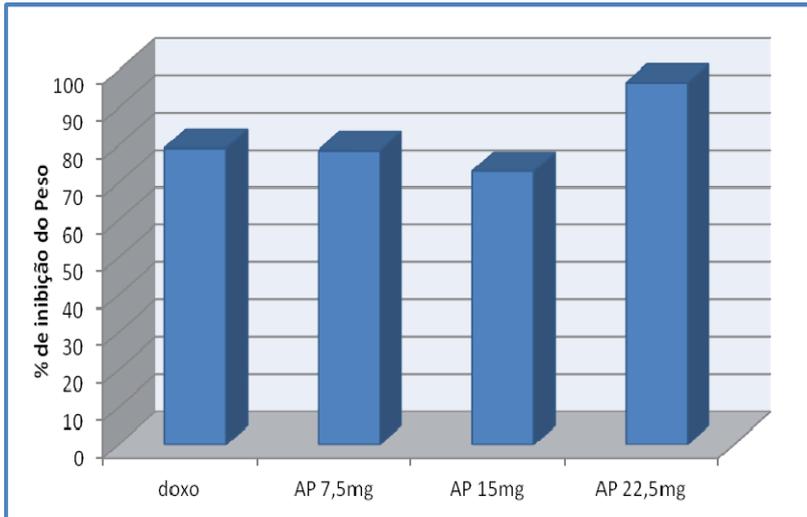
Os resultados obtidos evidenciam uma diminuição dos nódulos dos animais tratados com ácido protocetrárico nas três concentrações em relação ao controle negativo (PBS).

Na concentração de 22,5mg/animal o ácido protocetrárico mostrou uma marcante diminuição no peso e na área tumoral ($p < 0,05$). No entanto, com as concentrações de 7,5 e 15mg/animal, esses efeitos não foram estatisticamente diferentes.

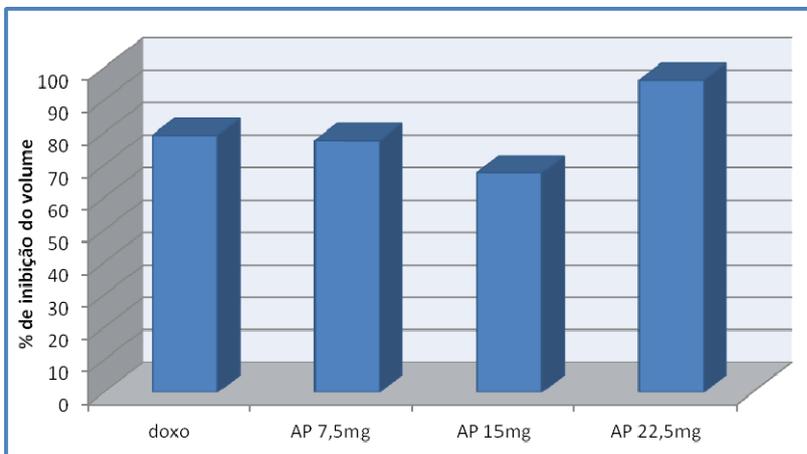
Considerando o volume tumoral, observou-se que houve uma redução do mesmo com todas as concentrações utilizadas, particularmente com a de 22,5 mg/animal. No entanto, esses valores não foram estatisticamente diferentes nas concentrações 7,5 e 15mg/animal.

Em se tratando da área, houve uma redução importante nas concentrações de 7,5 e 15mg/animal. Mas, foram estatisticamente diferentes apenas no tratamento com 22,5mg/animal em relação ao grupo controle.

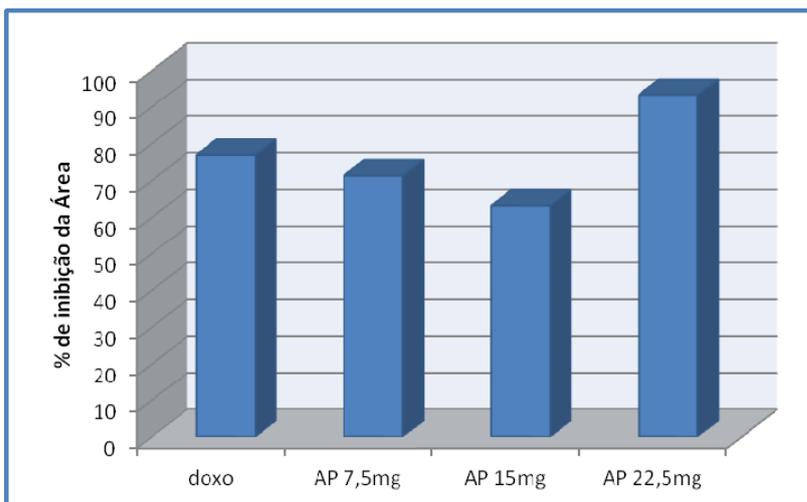
Quanto a percentagem de inibição do crescimento tumoral (Figura 21), foi observada uma redução de 96,63% do peso do nódulo do grupo tratado com AP na concentração 22,5mg/animal em relação ao grupo controle negativo. Os grupos tratados com AP 15 e 7,5mg/animal também demonstraram redução (73,17 e 78,65%, respectivamente).



(A)



(B)



(C)

Figura 21 - Percentagem de inibição do peso (A), volume (B) e área (C) dos nódulos tumorais induzidos pelas células B16-F10 após o tratamento com diferentes concentrações de ácido protocetrário em camundongos C57/BL6. AP - ácido protocetrário Doxo - doxorubicina

Vários autores realizaram estudos com modelos tumorais semelhantes para obtenção da percentagem de redução da massa tumoral. Kudunguti *et al.* (2011) investigaram o efeito do ácido pentil éster cafeico (CAPE) em várias linhagens de melanoma (entre elas, B16 F10) e estudaram *in vivo* seu efeito no modelo tumoral de melanoma subcutâneo em camundongos C57BL/6. O CAPE (10mg/kg/dia) causou significativa inibição do crescimento tumoral (61%). Este modelo subcutâneo também foi utilizado para verificar o efeito do interferon alfa no crescimento de células B16 F10, *in vitro* e *in vivo*. Os autores verificaram uma redução de 77,74% no peso tumoral e 70,8% na proliferação celular (CONESA *et al.*, 2009).

Meneguelo e colaboradores (2005) avaliaram a massa de tumor primário do modelo B16 F10 de camundongos Swiss tratados com a fosfoetanolamina sintética, molécula encontrada na membrana neuronal. Nesse estudo, foi obtida uma redução de 88% da massa tumoral para os animais tratados com a dose de 6,6 mg/kg. Em outro trabalho, utilizando também o modelo B16 F10 subcutâneo, camundongos tratados com a dihidrocucurbitacina-B (10 mg/kg) advinda de *Wilbrandia ebracteata*, apresentaram redução do tumor primário em cerca de 84% (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Outro trabalho, com camundongos C57B16 portadores do melanoma humano ANDO-2 foram tratados oralmente com a dose de 50 mg/kg do extrato da planta *Calendula officinalis*, rica em flavonóides e saponinas, apresentando redução de cerca de 75% do volume tumoral (JIMENÉZ-MEDINA *et al.*, 2006).

Lavhale *et al.* (2009) observaram 80% de redução do volume do tumor primário com o alquilante cisplatina (100 µg), e uma redução bem menor (cerca de 22%) em animais tratados com o antitumoral taxano paclitaxel (20 µg).

Dentre os estudos envolvendo extratos de plantas, podemos exemplificar a atividade antitumoral do extrato aquoso de *Indigosfera suffruticosa* (planta típica do nordeste brasileiro) rica em alcalóides, flavonóides e proteínas e com alta atividade citotóxica, no tratamento de camundongos BALB/C com sarcoma 180 na dose de 50 mg/kg, via *i.p.*, por sete dias, gerando uma redução tumoral de cerca de 75% (VIEIRA *et al.*, 2007).

Gupta e colaboradores (2004) relataram que o tratamento com extrato metanólico de *Caesalpinia bonducella* (200 mg/kg), cujos componentes químicos incluem flavonóides, diterpenóides e esteróides, reduziu em cerca de 71% o volume tumoral em modelo de carcinoma de Ehrlich.

A presença de um tumor gera uma resposta inflamatória, como uma tentativa do organismo de controlar a doença (TALMADGE *et al.*, 1981). Por essa razão, o microambiente

tumoral é rico em células inflamatórias, especialmente macrófagos, sendo que estas células podem afetar o desenvolvimento do tumor de várias formas. Lu e colaboradores (2006) afirmaram que macrófagos ativados são recrutados para a eliminação das células transformadas. Verificou-se que a análise do microambiente tumoral é de importância crucial para uma melhor compreensão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O microambiente tumoral consiste, além das próprias células tumorais, principalmente da matriz extracelular, fibroblastos, células do sistema imune e elementos neurais sustentados por uma rede vascular, além dos diversos fatores solúveis; como citocinas, hormônios, cininas e fatores de crescimento (BLANKENSTEIN, 2005; PARK *et al.*, 2000).

As células inflamatórias do microambiente têm papel bastante relevante, podendo atuar tanto reprimindo quanto promovendo o crescimento tumoral. O recrutamento local e a ativação de efetores imunes, tais como macrófagos, granulócitos e linfócitos podem elicitar uma efetiva resposta antitumoral. Porém, condições inflamatórias também podem favorecer o crescimento e a disseminação tumoral pela promoção da angiogênese e destruição do tecido, bem como pela produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e cininas (WILSON ; BALKWILL, 2002; BISACCHI *et al.*, 2003).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígeno para iniciar a resposta imune e para mediar lise tumoral. Dados *in vitro* e *in vivo* mostram que os macrófagos lisam células cancerosas por meio da produção de TNF- α e óxido nítrico (NO) (ADAM; ODHAV; BLOOLA, 2003).

O NO produzido por macrófagos tem papel importante no controle do crescimento de tumores, apresentando funções na imunidade inata. Macrófagos ativados iniciam os programas de morte celular através da liberação de mediadores. Um destes mediadores é o óxido nítrico. Este gás causa toxicidade no alvo celular por causa da sua reatividade, inibindo a respiração mitocondrial e a síntese de DNA. Por sua vez, a indução da transição da permeabilidade mitocondrial leva à perda do potencial elétrico de membrana e à liberação do citocromo C para o citoplasma, sendo este um importante desencadeador da apoptose (LIU *et al.*, 1996; MIGNOTTE & VAYSSIERE, 1998; SUSIN *et al.*, 1998; VERMES *et al.*, 2000; STRASSER *et al.*, 2000; BERNARDI *et al.*, 2001; WANG, 2001; WATERHOUSE *et al.*, 2001; RICCI *et al.*, 2003).

Santos *et al.* (2004) constataram efeitos imunoestimulatórios do ácido protocetrárico, que apresentou elevada atividade em relação ao controle, quando da determinação da concentração de NO. Estudos posteriores realizados com os derivados do ácido protocetrárico

indicaram aumento na produção de NO, demonstrando serem promissores agentes imunoestimulantes (CARLOS *et al.*, 2008).

Outra hipótese para o mecanismo de ação do ácido protocetrárico seria a possibilidade de atuação como agente citotóxico, uma vez que no ensaio *in vitro* de avaliação da citotoxicidade, o mesmo apresentou $IC_{50} = 23,99 \mu\text{g/mL}$ (BRANDÃO, 2011). Entretanto, sua seletividade em linhagem de célula normal foi 2,0. Herr e Debatin (2001) defendem que o tratamento anticâncer usando drogas citotóxicas leva em consideração sua capacidade em mediar a morte celular pela ativação de elementos chaves da apoptose.

Vale ressaltar que os resultados obtidos não podem ser extrapolados diretamente para os seres humanos, contudo, tais estudos são fundamentais como base para avaliação antitumoral de drogas, dando procedimento a inúmeros trabalhos de investigação pré-clínica e, portanto, oferecendo possibilidades na terapia clínica do câncer (TAKAGI *et al.*, 2003; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2003;2004).

Considerando que o modelo de melanoma utilizado neste estudo é muito resistente ao tratamento quimioterápico, os resultados encontrados para o ácido protocetrárico são de grande importância para a confirmação da atividade antitumoral.

6 CONCLUSÕES

O ácido protocetrário foi ativo em células HEP₂ (15,4 µg/mL), enquanto as modificações estruturais (derivados alquílicos), não afetaram a atividade antiproliferativa.

A modificação estrutural do ácido norstítico, potencializou em aproximadamente 100 vezes sua atividade antiproliferativa para o composto - ácido 8'-*O*-isopropil-norstítico, em células de carcinoma de próstata (PC-03, GI₅₀ = 0,5µg/mL), com alta seletividade (IS=33,8).

Esse composto, o ácido 8'-*O*-isopropil-norstítico, também foi fortemente ativo em células de melanoma humano UACC-62 e de carcinoma renal HEP₂, porém com menor seletividade nestas linhagens celulares (IS= 6,9 e 5,5, respectivamente).

Outros derivados alquílicos do ácido norstítico também se destacaram, pela alta seletividade *in vitro* em células de carcinoma de mama MCF7, ácidos 8'-*O*-*n*-butil norstítico (IS=47,1) e 8'-*O*-*sec*-butil norstítico (IS=87,4) e este índice, pode ser útil como guia inicial para a seleção e desenvolvimento de novos agentes antitumorais em modelos *in vivo*.

O ácido divaricático foi ativo em todas as linhagens testadas, com atividade antiproliferativa de forte (PC-03; GI₅₀ = 3,7 µg/mL) a moderada (786-0; GI₅₀ =27,9 µg/mL), enquanto o ácido perlatólico foi o composto mais ativo em células 786-0 (GI₅₀ =10,4 µg/mL, tendo também apresentado forte atividade em células MCF7 e PC-03 com GI₅₀ próximas a 7,0 µg/mL. Ambos depsídeos foram seletivos nestas linhagens (IS entre 2,4 e 3,8).

O ácido difractáico apresentou atividade antiproliferativa de moderada a fraca nas linhagens testadas e não houve seletividade para as linhagens de células neoplásicas testadas.

Os compostos atranorina, ácido psorômico e ácido fumarprotocetrário foram inativos nas linhagens testadas (GI₅₀ maiores que 40 µg/mL).

O ácido protocetrário (22,5mg/animal) inibiu 96,63% do crescimento tumoral (peso) no modelo de melanoma murino com células B16-F10. Assim, os testes *in vivo* realizados com o este composto confirmaram a efetividade *in vitro* em linhagem B16-F10 determinada em trabalho anterior. Portanto, mostra-se como uma droga promissora para futuros testes pré-clínicos envolvendo o tratamento do melanoma.

REFERÊNCIAS

- Adam JK, Odhav BB, Bloola KD. Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 99:113-132.
- Alberts B, Bray D, Lewis J. *Biologia molecular da célula*. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; 1997
- ATCC. [Acesso em 10 de janeiro de 2012]. Disponível em:
<http://www.atcc.org/About/WhoWeAre/tabid/139/Default.aspx>
- Backorová M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedorocko P, Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. in Vitro*. 2012; doi:10.1016/j.tiv.2012.01.017
- Backorová M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyroforic acid. *Toxicology in Vitro*. 2011; 25: 37-44.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, Mcmasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman G,H, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J. Clin. Oncol*. 2001; 19:3622-3634.
- Baylin, S B, Ohm J E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006; 6 (2):107-16.
- Berking C, Herlyn M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol. Histopathol*. 2001; 16(2): 669-674.

Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26(2):112-117.

Bézivin C, Tomasi F, Lohézie-Le D, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine.* 2003; 10:499-503.

Bézivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Medica.* 2004; 70(9):874-877.

Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, Poupon MF. A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Met.Rev.* 2008; 27(1):5-10.

Billiar TR, Hofman RA, Curran RD, Langehr JM, Simmons RL. A role of inducible nitric oxide biosynthesis in liver in inflammation and in the allogenic immune response. *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 120:192-197.

Bisacchi D, Benelli R, Vanzetto C, Ferrari N, Tosetti F, Albini A. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev.* 2003; 27(3):229-238.

Blagosklonny M V. Molecular theory of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4 (6):621-7.

Blanco G, Saornil MA, Domingo E, Diebold Y, López R, Rábano G, Tutor JC. Uveal melanoma model with metastasis in rabbits: Effects of different doses of cyclosporine A. *Curr. Eye Res.* 2000; 21(3):740 -747.

Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Cur Opin Immunol.* 2005; 17:180-186.

Blaschek W, Käsbauer J, Kraus J, Franz G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. Carbohydr. Res. 1992; 231:293-307.

Bogo D, Matos MFC, Honda NK, Pontes EC, Oguma PM, Santos da SEC, Carvalho JE, Nomizo A. *In vitro* Antitumour Activity of Orsellinates. Z. Naturforsch. 2010; 65:43-48.

Boustie J, Tomasi S, Grube M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. Phytochem Rev. 2011; 10:287-307.

Brandão LFG. Estudo Químico de Líquens e Avaliação da Atividade Enzimática e Anti-Tumoral. [Dissertação de mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.

Britto AS. Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo. Campinas, SP: Editora da Unicamp; 1994.

Cardarelli GS, Serino G, Campanella L, Ercole F, de Cicco NF, Alesiani O, Rossiello F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. Cellular Molecular Life Science. 1997; 53(8):667-672.

Carlos IZ, Carli CBA, Maia DCG, Benzatti FP, Lopes FCM, Roese FM, Watanabe M, Micheletti AC, Santos LC, Vilegas W, Honda NK. Efeito imunoestimulante de compostos fenólicos de líquens na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009; 19(4):847-852.

Carlos IZ, Quilles MB, Carli CBA, Maia DCG, Benzatti FP, Lopes TIB, Gianni AS, Brum RL, Vilegas WS, Loudes C, Honda NK. Lichen metabolites modulate hydrogen peroxide and nitric oxide in mouse macrophages. Zeitschrift für Naturforschung, C. 2009; 64(9/10):664-672.

Chen JS, Wei CI, Rolle RS, Otwell WS, Balaban MO, Marshall MR. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991; 39(8):1396-401.

Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant Melanoma, modern black plague and genetic black box. *Genes Dev*.1998; 12:3467-81.

Cingi MR, De Angelis I, Fortunati E. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicology in vitro*. 1991; 5:119-125.

Conesa CM, Sánchez NA, Ortega VV, Reverte JG, Carpe FP, Aranda MC. In vitro and in vivo effect of IFN α on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). *Biomed Pharmacother* (2008).

Cooper, GM. A célula – uma abordagem molecular. 2ed. Artmed, Porto Alegre, 2001. p. 633-669.

Correche ER, Enriz RD, Piovano M, Garbarino J, Gomezlechon MJ. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *ATLA, Alternatives to Laboratory Animals*. 2004; 32(6):605-615.

Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MOA. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim*. 2010; 2 (1):47-58.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic Basis of Disease. 6th. WB Saunders International. Chapters 1,2,4,6 e 8; 1999.

Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1/2):72-79.

Cruz M, Enes M, Pereira M. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. Rev Port Pneumol. 2009; 15(4):669-682.

De Almeida VL, Leitão A, Reina B del CL, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com DNA: uma introdução. Química Nova. 2005; 28(1):118-129.

Devlin TM. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher; 2007.1186p.

DPT (Developmental Therapeutics Program) [Acesso em 8 de janeiro de 2012]. Disponível em : <http://dtp.nci.nih.gov/>

Falcão SPE, da Silva NH, Gusmão NB, Ribeiro SM, Honda NK, Pereira EP. Atividade Antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. Acta Farm. Bonaerense. 2002; 21(1):43-9.

Falcão SPE, da Silva NH, Gusmão NB, Ribeiro SM, Pereira EP. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron. Acta bot. bras. 2004; 18(4):911-918.

Fávaro OCN, Oliveira MM, Rossini A, Kamara CR, Pinto AV, Pinto MC. Seleção por meio de Células KB de Substâncias e Extratos potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. Anais Acad. Bras. Ciências. 1990; 62(3):217-224.

Fernandez E, Quilhot W, Gonzalez I, Hidalgo ME, Molina X, Meneses I. Lichen metabolites as UVB filters. Lichen metabolites show photoprotector capacity. Cosmetics & Toiletries. 1996, 111(12), 69.

Fischle W, Wang Y, Allis C D. Histone and chromatin cross-talk. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15 (2):172-83.

Freshney IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5 ed. New York: Wiley-Liss; 2005.

Galloway DJ. Global environmental change: lichens and chemistry. *Bibl. Lichenol.* 1993; 53:87-95.

Garty J. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *Crit Rev Plant Sci.* 2001; 20:309-371.

Gianini AS, Marques MR, Carvalho NC, Honda NK. Activities of 2,4-dihydroxy-6-n-pentylbenzoic acid derivatives. *Z Naturforsch C.* 2008; 63(1-2):29-34.

Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Marques MR. Bioactive derivatives obtained from lecanoric acid, a constituent of lichen *Parmotrema tinctorium* (Nyl.) Hale (Parmeliaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2002; 12:74-75.

Gomes AT, Honda NK, Roese FM, Muzzi RM, Sauer L. Cytotoxic activity of orsellinates. *Z Naturforsch.* 2006; 61:653-657.

Gomes AT, Smânia-Júnior A, Seidel C, Smania EFA, Honda NK, Roese FM, Muzzi R. Antibacterial Activity of Orsellinates. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2003, 34:194-196.

Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Sivakumar T, Vamsi MLM. Antitumor Activity and Antioxidant Status of *Caesalpinia bonducella* Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94(2):177-184.

Halama P, Van Halumin C. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl.* 2004; 49: 95-107.

Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry.* 1991; 30:3864-3874.

Hanahan DE, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.

Haraldsdóttir S, Guolaugsdóttir E, Ingólsdóttir K, Ögmundsdóttir HM. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Medica*. 2004; 70(11): 1098-1100.

Hasslberger K, Peterson DC, Thomas DG, Darling JL. Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs*. 1996; 7(3):331-8.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellstrom JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill *in vitro* between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal*. 2006; 42:320-323.

Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001; 98(9):2603-2614.

Higuchi M, Miura Y, Boohene J, Kinoshita Y, Yamamoto Y, Yoshimura I, Yamada Y. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta Medica*. 1993; 59(3):253-255.

Hill PH, Tannock IF. Introduction: Cancer as a Cellular Disease. *In: The Basic Science of Oncology*. Tannock IF, Hill RP. 2nd ed. USA: McGraw-Hill; 1992.

Holbeck SL. Update on nci *in vitro* drug screen utilities. *Eur. J Cancer*. 2004; 40:785-793.

Holbeck SL. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *European Journal of Cancer*. 2004; 40:785-793.

Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, de Andrade LSR, Micheletti AC, Lopes TIB, Misutsu MY, Beatriz A, Brum RL, Leite CQF. Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*. 2009; 17(5):328-332.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. *Methods*. 2007; 42:377-387.

Huncharek M, Caubet JF, McGarry R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res*. 2001; 11:75-81.

INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>

INCA. Fisiopatologia do câncer. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>

INCA. Instituto Nacional de Câncer.[Acesso em fevereiro de 2011]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335.

Ingólfssdóttir K, Bloomfield SF, Hylands PJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985; 28:289-292.

Ingósdóttir K, Wiedemann B, Birgisdóttir M, Nenninger A, Jónsdóttir S, Wagner H. Inhibitory effects of baecomycesic acid from the lichen *Thamnolia subuliformis* on 5-lipoxygenase *in vitro*. *Phytomedicine*. 1997; 4:125.

Ingólfssdóttir, K.; Chung, G. A.; Skúlason, A. C.; Gissurarson, S. R.; Vilhelmsdóttir M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro* *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6:141-144,1998.

Ingólfssdóttir, K. Molecules of Interest Usnic Acid. *Phytochemistry*. 2002; 61:729-736.

Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson, JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 90:33-38.

Jiménez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 6: 119., 133, 2006;

Junqueira Jr G; Braga LMGM; Motta MS; Pilla HS. Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. *Na. Bras. Dermatol*. 1997; 72:487-9.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 332p.

Keapradub N. Eno-Amooquaye E, Burke PJ *et al*. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Medica*. 1999; 65:311-315.

Khodjakov A, Rieder CL. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol*. 2009; 8 (10):88.

Kinoshita K, Matsubara H, Koyama K, Takahashi K, Yoshimura I, Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Kawai KI. Topics in the chemistry of lichen compounds. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. 1994; 76:227-233.

König GM, Wright AD. ¹H and ¹³C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochemistry Annals*. 1999; 10:279-284.

Koparal AT, Ayaz Tuylu B, Turk H. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their nongenotoxicity on human lymphocytes. *Natural Products Research, Part B*. 2006; 20(14):1300-1307.

Kristmundsdóttir T, Jónsdóttir E, Ögmundsdóttir HM, Kristín I. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 24(5):539-543.

Kudugunti SK, Vad NM, Ekogbo E, Moridani MY. Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) in skin B16-F0 melanoma tumor bearing C57BL/6 mice. *Invest New Drugs*. 2011; 29:52-62

Kumar KCS, Müller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of Natural Products*. 1999; 62:821-823.

Kumar V et al. *Patologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. 608p.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & COTRAN. *Patologia - bases Patológicas das doenças*. 7ed. Rio de Janeiro, Elsevier; 2005.

Lavhale MS, Kumar S, Mishra SH, Sitasawad SL (2009) A Novel Triterpenoid Isolated from the Root Bark of *Ailanthus excelsa* Roxb (Tree of Heaven), AECHL-1 as a Potential Anti-Cancer Agent. *PLoS ONE*. 2009; 4(4):1-11.

Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth, S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000; 12:547-54.

Lindee SM. The culture of cell culture. *Science*. 2007; 316(5831):1568-1569.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996; 86:147-157.

Lotze MT, Dallal RM, Kirkwood JM, Flickinger JC. Melanoma: Cutaneous melanoma. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6 ed. Lippincott and Williams & Wilkins; 2001.

Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation: a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(4):221-33.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VE. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova.* 2002; 23:429-438.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (3):153-66.

Marchetti GM. Atividade anticâncer do extrato bruto e das frações das folhas de *Calea Pinnatifida* Banks. [Dissertação de mestrado]. Universidade Estadual de Campinas; 2008.

Matsubara H, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Yoshimura Y, Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y. Anti-tyrosinase activity of lichen metabolites and their synthetic analogues. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory.* 1997; 83:179-185.

Mayer M, O'Neill MA, Murray R KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AMA, Thompson AM, Appleyard VCL. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-Cancer Drugs.* 2005; 16(8): 805-809.

Meneguelo R, Maria DA, Chierice GO. Efeitos antitumorais da fosfoetanolamina sintética no melanoma murino B16F10. *Cad Res 5º EncoBio.* 2005; 26.

Micheletti AC, Beatriz A, Lima DP, Honda NK, Pessoa CO, Moraes MO, Lotufo FV, Magalhães HIF, Carvalho NCP. Chemical constituents of *Parmotrema ichexanthonicum* Eliasaro & Adler - isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. *Química Nova.* 2009; 32(1):12-20.

Micheletti AC, Honda NK, de Lima DP, Beatriz A, Sant'Ana MR, Carvalho ACP, Matos MFC, Queiróz MML, Bogo D, Zorzatto JR. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity against human tumor cell lines. *Quim. Nova.* 2011; 34(6):1014-1020.

Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 1998; 252:1-15.

Molnar K, Farkas E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Z. Naturforsch.* 2010; 65:157-173.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langlet J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Ray GM, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of National Cancer Institute.* 1991; 83(11):757-766.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983; 65:55-63.

Motta RR, Zettler GC, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. Valor prognóstico da correlação do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermoides da cavidade oral e língua. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2009; 75(4):544-49.

Muller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 56:9-16.

Nakamura D, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 2002; 70:791-798.

Nakazawa S, Komatsu N, Yamamoto I, Fujikawa F, Harai K. Antitumor activity of components of lichens. 1. Effect of psoromic acid. *Journal of Antibiotics.* 1962; 15:282-289.

NCI. Nacional Cancer Institute. [Acesso em 30 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/>

Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Suner S, Nicklaus MC, Milne GWA, Proska B, Pommier Y. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 Integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997; 40:942-951.

Neto AG, Pessoa BBGP, Aguiar AS, Furtado BM, Moraes MO, Ribeiro RA. Modelo de tumor de pulmão em rato com carcinossarcoma de WALKER. *Acta Cir. Bras.* 2002; 17(1):12-22.

Noonan FP, Dudek J, Merlino G, De Fabo EC. Animal Models of Melanoma: An HGF/SF Transgenic Mouse Model May Facilitate Experimental Access to UV Initiating Events. *Pigm. Cell Res.* 2003; 16(1):16.

Park CB, Yi K, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline ring is responsible for the cell-penetrating ability of buforin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97(15):8245-8250.

Pengsuparp T, Cai L, Constant H, Fong HHS, Lin LZ, Kinghorn AD, Pezzuto JM, Cordell G A, Ingolfssdottir K, Wagner H, Hughes SH. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*. 1995; 58:1024.

Pereira EC, Nascimento SC, Lima RC, Silva NH, Oliveira AFM, Bandeira E, Boitard M, Beriel H, Vicente C, Legaz ME. Analysis of *Usnea fascicata* Crude Extract with Antineoplastic Activity. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 1994; 19(1/2):47-52.

Peres PLMT, Mapeli AM, Faccenda O, Gomes TA, Honda NK. Allelopathic Potential of Orsellinic Acid Derivatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology An International Journal*. 2009; 52 (4):1019-1026.

Peter I, Mezzacasa A, Ledonne P, Dummer R, Hemmi S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. *Melanoma Res.* 2001; 11:21-30.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio R. de A. *Quim. Nova.* 2002, 25:45.

Podterob AP. Medicinal plants chemical composition of lichens and their medicinal applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2008; 42 (10).

Pomerantz J, Screiber-Agus N, Liégois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, Pinho RA. The Ink4a Tumor suppressor gene product p19Arf. Interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's. Inhibition of p53. *Cell.* 1998; 96:713-23.

Ponder BAJ, Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL, Weatherall DJ. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced epithelial dysplasia in chimeric mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1986; 77: 967.

Rang HP, Ritter JM, Dale MM. In: *Farmacologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2004

Ranković B, Misić M, Sukdolak S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2008; 24: 1239-1242.

Rashid, M. A.; Majid, M. A.; Quader, M. A. Complete NMR assignments of (+)-usnic acid. *Fitoterapia.* 1999; 113-115.

Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. *Biologia Vegetal* 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2007.

Ren DL, Wang JZ, Noda H, Amano H, Ogawa S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Med.* 1995; 61:120-125.

Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves ECP, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J.Microencapsulation.* 2004; 21(4):371-384.

Ricci J, Gottlieb RA, Green DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell Biol.* 2003; 160(1):65-75.

Rodriguez-Vicente J, Vicente-Ortega V, Canteras-Jordana M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. *Cancer.* 1998; 82(3):495-502.

Rothhammer T, Bosserhoff AK. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* 2007; 20 (2):92-111.

Rubinstein LV, Shoemaker KD, Paull RM. *In Vitro* Anticancer-Drug-Screening. *Journal of the National Cancer Institute.* 1990; 82: 1113-1118.

Santos Jr AR, Wada MLF. Diferenciação celular. *In: A célula.* São Paulo: Editora Manole Ltda; 2005.

Santos LC, Honda NK, Carlos IZ, Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by brazilian lichens. *Fitoterapia.* 2004; 75:473-479.

Santos LC, Honda NK, Carlos IZ, Vilegas W. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens . *Fitoterapia.* 2004; 75:473-479

Santos NP, Nascimento SC, Silva JF, Pereira ECG, Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhães NS. Usnic acid-loaded nanocapsules: Na evaluation of cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2005; 15(5):355.

Santos NP. Estudo Comparativo da Ação Antitumoral dos Extratos e Frações Purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) Contra Diferentes Tumores Sólidos Experimentais. Preparação a partir de depsídeos de líquens. [Tese]. Universidade Federal de Pernambuco; 1996.

Schäfer & Werner. Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nat. Rev.* 2008; 9:1-11.

Schäfer G, Büchel K. Cyclic response of energy linked functions of liver mitochondria to uncoupling thiophene derivatives. *FEBS Lett.* 1970; 6:217-220.

Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM. Effect of a New 1,3,4-thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on B16-F10 Murine Melanoma. *Melanoma Res.* 2003; 13(5):465-472.

Senff-Ribeiro A, Echevarria A, Silva EF, Veiga SS, Oliveira MBM. Antimelanoma Activity of 1,3,4-thiadiazolium Mesoionics: a Structure-Activity Relationship Study. *Anti-Cancer Drugs.* 2004; 15(3):269-275.

Sherr C J. Cancer cell cycles. *Science.* 1996; 274 (5293):1672-7.

Shibuya M, Ebizuka Y, Noguchi H, Iitaka Y, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 4-O-methylcryptochlorophaeic acid; synthesis of monomeric arylcarboxylic acids for inhibitory activity testing and X-ray analysis of 4-O-methylcryptochlorophaeic acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 1983; 31:407.

Shoeb M, Jaspars M, Macmanus SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. Anti-cólon cancer potencial of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantean* (Asteraceae). *J Nat Med.* 2007; 61:164-169.

Shukla K, Joshi PG, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochem Rev.* 2010; 9: 303-314.

Sieber OM, Heinemann K, Tomlinson IPM. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nature Rev.* 2003; 3:701-708.

Signorelli M, Lissoni AA, Garbi A, Perego P, Mangioni C. Primary malignant vaginal melanoma treated with adriamycin and ifosfamide: a case report and literature review. *Gynecol. Oncol.* 2005; 97(2):700-703.

Silverman RB. *The organic chemistry of drug design and drug action.* California: Academic Press, Inc., 1992.

Sinclair (Research Center Inc.). *Research Models.* [Acesso set. 2004] Disponível em: <<http://www.sinclairresearch.com/melanoma.htm>>

Siqueira JM, Gazola AC, Farias MR, Volkov L, Rivard N, Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-do-Valle RM. Evaluation of the antitumoral effect of didydrocucurbitacin B in both *in vitro* and *in vivo* models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 64(3):529-538.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of The National Cancer Institute.* 1990; 82(13):1107-1112.

Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Gynecologic Oncology.* 2005; 98:141-145.

Sober AJ, KHO HK. Melanoma e outras lesões cutâneas pigmentadas. In: Isselbacher KJ, Braunwald, E. Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. (Ed). *Harrison: Medicina Interna.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1995. p. 1958-1962.

Sotillo R, Garcia JF, Ortega S, Martin J, Dubus P, Barbacid M, Malumbres M. Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98:13312-13317.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000; 69:217-245.

Straughan DW, Fentem JH, Balls M. Replacement alternative and complementary *in vitro* methods in pharmaceutical research. In: Castell JV, Gómez-Lechón MJ. (Eds) *In vitro* methods in pharmaceutical research. San Diego: Academic Press; 1997, p. 1-14.

Su BN, Cuendet M, Nikolic D, Kristinsson H, Ingólfssdóttir K, Breemen RB, Fong HHS, Pezutto JM, Kinghorn AD. NMR Study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata*. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 2003; 41:391-394.

Suarez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone RS, Arvelo F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Natural Product Research.* 2004; 18(5):421-426.

Suffness M, Pezzuto JM. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). London Academic Press; 1991.

Suggit M, Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clinical Cancer Research.* 2005; 11:971-981.

Sundholm RG, Huneck S. ¹³C NMR-Spectra of Lichen Depsides, Depsidones and Depsones. *Chemica Scripta.* 1981; 18:233-236.

Susin, S.A.; Zamzami, N.; Kroemer, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1366:151-165.

Takagi M, Honmura T, Watanabe S, Yamaguchi R, Nogawa M, Nishimura I, Katoh F, Matsuda M, Hidaka H. *In vivo* antitumor activity of a novel sulfonamide, HMN-214, against

human tumor xenografts in mice and the spectrum of cytotoxicity of its active metabolite, HMN-176. *Investig. New. Drugs.* 2003; 21:387-399.

Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1979; 22:1380-1384.

Thomas G. Traduzido por Rumjaneck, F. D. *Química Medicinal – Uma Introdução.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A; 2003.

Thompson MW, Thompson JS, Nussbaum R, McInnes R, Willard H. *Genética médica.* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 387 p.

Thongtan J, Blaschek W, Käsbauer J, Kraus J.; Franz G. *Phythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumor storage and solubilised cell-wall β -D-glucans (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- *Carbohydr. Res.* 1992; 231:293-307.

Tietze MK, Chin L. Murine models of malignant melanoma. *Mol. Med. Today.* 2000; 6:408-10.

Tokiwano T, Satoh H, Obara T, Hirota H, Yoshizawa Y, Yamamoto Y. A lichen substance as an antiproliferative compound against HL-60 Human Leukemia Cell: 16-O-acetyl-leucyolic Acid isolated from *Myelochroa aurulenta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009; 73 (11):2525-2527.

Tourinho A, Buzaid C. Fotemustina no tratamento de melanoma metastático. *Prática Hospitalar.* 2004, 4(33).

Turgay T, Ozdemir TA, Meral Y, Hayrettin T, Meri K. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences.* 2004; 59(5/6): 384-388.

Umezawa K, Maramatsu S, Ishizuka M, Sawa T, Takeuchi T, Matsushima T. Inhibition of histidine decarboxylase and tumor promoter-induced arachidonic acid release by lecanoric acid analogs. *Biochemical and Biophysical Communications*. 1983; 110:733-739.

Van Dyke T, Jacks T. Cancer modelling in the modern era: progress and challenges. *Cell*. 2002; 108:135-44.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*. 2000; 243:167-190.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B: colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 2006; 1(3):1112-1116.

Vieira JRC, Souza IA, Nascimento SC, Leite SP. *Indigofera suffruticosa*: An Alternative Anticancer Therapy. *Ann Oncol*. 2007; 4(3):355-359.

Vinjayakumar, C.S.; Viswanathan, S.; Reddy, M.K.; Parvathavarthini, S.; Kundu, A B.; Sukumar, E. Anti-inflammatory activity of (+) –unic acid. *Fitoterapia*, 71:564-566, 2000.

Wack C, Becker JC, Bröcker EB, Lutz WK, Fischer WH. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4-dinitrochlorobenzene: results from a murine tumor model. *Melanoma Res*. 2001; 11:247-253.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001; 15:2922-2933.

Waterhouse NJ, Goldstein JC, Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and atp generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol*. 2001; 153(2):319-328.

WHO. (World Health Organization) Cancer. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>

Willians DE, Karunamanda B, Emil L, Dilip de S, Veranja K, Allen T, Clardy J, Andersen R, Ambewelamides A e B, antineoplastic epidithiapiperaziinediones isolated from the lichen *Usnea sp.* Tetrahedron Letters. 1998; 39:9579-9582.

Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2002 Apr; 12(2):113-120.

Yamamoto Y, Kinoshita Y, Matsubara H, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Kurokawa T, Yoshimura I. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. *Recent Res. Devel in Phytochem.* 1998; 23-34.

Yamamoto Y, Miura M, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* 1995; 43(8):1388-1390.

Yuan X, Xiao A, Taylor TN. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science.* 2005; 308:1017.

Zhao W, Liu H, Xu S, Entschladen F, Niggemann B, Zanker KS, Han R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. *Cancer Lett.* 2001;162:49-55.

Zhu H, Gooderham N. Neoplastic transformation of human lung fibroblast MRC-5 SV2 cells induced by benzo[α]pyrene and confluence culture. *Cancer Res.* 2002; 62:4605-4609.