

JÚLIA FONSECA DE SABÓIA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E INIBIÇÃO DE TOPOISOMERASES POR  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE ESPÉCIES DO GÊNERO *SELAGINELLA*

CAMPO GRANDE - MS  
2013

JÚLIA FONSECA DE SABÓIA

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E INIBIÇÃO DE TOPOISOMERASES POR  
EXTRATOS E FRAÇÕES DE ESPÉCIES DO GÊNERO *SELAGINELLA*

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria de  
Fatima Cepa Matos  
Co-orientadora: Profa. Dra. Renata  
Trentin Perdomo

CAMPO GRANDE - MS  
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÚLIA FONSECA DE SABÓIA

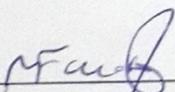
**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E DE INIBIÇÃO DAS  
TOPOISOMERASES POR EXTRATOS E FASES DE ESPÉCIES DO GÊNERO  
*SELAGINELLA***

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

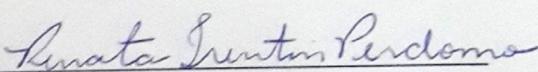
Resultado APROVADA

Campo Grande (MS), 25 de MARÇO de 2013.

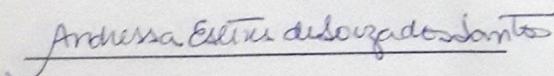
BANCA EXAMINADORA



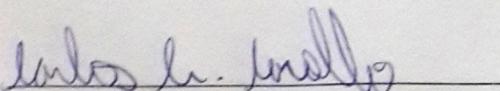
Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos - UFMS (Presidente e Orientadora)



Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo - UFMS (Suplente)



Profa. Dra. Andressa Esteves de Souza dos Santos – UFRRJ (Membro Titular)



Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo - UFMS (Membro Titular)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todas as pessoas que sofrem ou já sofreram de câncer, assim como seus familiares e amigos, e aos pesquisadores dessa área, que mesmo diante do enorme desafio para encontrar a cura para essa doença, permanecem realizando suas pesquisas e esperando por resultados melhores.

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio e Izilda, por tudo que me ensinaram, pelas oportunidades que me proporcionaram e por sempre me motivarem a estudar e a lutar por meus objetivos.

À minha orientadora, pela grande oportunidade e conhecimento adquiridos nesses anos, por estar sempre presente nos momentos importantes e pela exemplar orientação proporcionada.

À minha co-orientadora pelos ensinamentos e paciência.

Aos amigos e familiares que acreditaram em mim e me apoiaram a continuar 'no caminho' sempre me dando força quando pensava em desistir.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, pela orientação e ensinamentos científicos e pela enorme oportunidade que a senhora conferiu a mim, muito obrigada.

À minha co-orientadora, Renata Trentin Perdomo pelos ensinamentos e paciência, obrigada.

À professora Dra. Danielle Bogó, pela paciência e disposição de me ensinar quase tudo que sei de cultura celular.

À minha família, principalmente meus pais, e amigos pelo apoio e torcida durante essa jornada, a vocês minha eterna gratidão!

À minha querida amiga Natasha Costa Penatti, pela boa disposição, pelas ajudas infundáveis e esclarecimentos científicos. Por ser paciente e ter sempre uma palavra reconfortante para não me fazer desistir.

À minha amiga Stephani Demczuk pela ajuda nas correções e com opiniões úteis.

Ao querido amigo pesquisador Eduardo Aguiar pela enorme ajuda na hora da redação, sempre com ótimas dicas.

Ao meu querido amigo Rafael Porto, por sempre salvar meu computador e sempre me dar ótimas dicas de como usar melhores ferramentas, além da sempre boa disposição.

Às doutorandas Nathalia Novak Zobiolo e Priscila de Matos Cândido Bacani pela participação na banca de pré-defesa e pelas valiosas correções para melhorar este trabalho.

Às minhas colegas do laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares Laura, Priscila e Marillin pela paciência nos momentos difíceis e pelo companheirismo nas horas mais corridas; as farmacêuticas do laboratório Kelly e Fernanda pela disposição e boa vontade em ajudar sempre.

À equipe do laboratório de Farmacognosia da UFMS, ao professor Dr. Carlos Alexandre Carollo por ceder as espécies vegetais desse estudo e pelas correções na parte química, à mestrandia Alice Fisher por me ajudar na preparação dos extratos e frações, nas análises químicas e da sempre boa disposição em me ajudar, aos técnicos João Roberto Fabri, pela coleta das plantas e, Amanda Boaretto pela ajuda com o trabalho laboratorial.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As plantas constituem a principal fonte de produtos bioativos ou de substâncias protótipos, as quais, após transformações químicas e estudos da relação estrutura/atividade, ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínico, podem originar fármacos. As plantas do gênero *Selaginella* possuem diversas propriedades biológicas como, antiviral; leishmanicida; antifúngica e antitumoral. Diante dessa perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiproliferativa de extratos e partições obtidas das espécies *Selaginella sellowii* e *Selaginella convoluta*, a via de inibição da proliferação celular e o índice de seletividade nas células neoplásicas. Para tanto, foram realizados ensaios de citotoxicidade e de atividade inibitória sobre as topoisomerasas I e II humanas. O teste de citotoxicidade foi realizado com o corante sulforodamina B (SRB) em seis linhagens de células neoplásicas e uma linhagem de células normais para o cálculo do índice de seletividade. Os resultados mostraram que a fração acetato de etila de *S.sellowii* (SS3) apresentou a menor IC<sub>50</sub> (concentração que inibe cinquenta por cento do crescimento celular em µg/mL) em células de adenocarcinoma de mama, MCF-7 (1,81µg/mL), enquanto a fração clorofórmica, da mesma espécie (SS2), além da atividade em todas as linhagens, apresentou IC<sub>50</sub> em células de carcinoma de ovário resistente a múltiplos fármacos NCI/ADR-RES (2,62 µg/mL), próxima ao controle positivo (doxorubicina = 2,45 µg/mL). A fração clorofórmica de *S. convoluta* (SC2) e *S. sellowii* (SS2) e a fração acetato de etila de *S.sellowii* (SS3) apresentaram atividade inibitória sobre as topoisomerase II humanas (topo II). Além da citotoxicidade e de inibição de topo II, a SS3 foi de 4 a 13,5 vezes mais potente em células neoplásicas do que em células normais de fibroblasto murino (NHI/3T3). Os flavonoides são as moléculas presentes nas frações e podem ser responsáveis pela atividade observada nos testes.

**Palavras-chave:** citotoxicidade, SRB, índice de seletividade, topoisomerasas.

## ABSTRACT

The plants are the main source of bioactive compounds or prototypes substances, which after chemical transformations and structure/activity, *in vitro*, *in vivo* and clinical studies, they can originate drugs. The plants of *Selaginella* genus have a diversity of biological properties like antiviral, leishmanicidal, antifungal and anticancer. Given this perspective, the aim of this study was to evaluate the antiproliferative activity of extracts and partitions obtained from species *Selaginella sellowii* and *Selaginella convoluta*, the inhibition via of cell proliferation and the selectivity index in cancer cells. Therefore, cytotoxicity and inhibitory activity on human topoisomerases I and II tests were performed. The cytotoxicity assay was performed with the sulforhodamine B dye (SRB) in six neoplastic cell lines and a normal cell line for calculating the selectivity index. The ethyl acetate extract from *S. sellowii* (SS3) had the lowest IC<sub>50</sub> (concentration that inhibits 50% of cell growth) against MCF-7 breast adenocarcinoma cells (1.81 µg/mL), while the chloroform extract from this species proved strongly active against all cancer cell lines tested. Also, its activity against multidrug-resistant NCI/ADR-RES ovarian carcinoma cells (2.62 µg/mL) approached that of the positive control, doxorubicin (2,45 µg/mL). The chloroform extract of both species and the ethyl acetate extract from *S. sellowii* exhibited inhibitory activity against human topoisomerase II. In addition, ethyl acetate extract from *S. sellowii* proved 4 to 13.5 times more potent against tumor cells than against normal NHI/3T3 murine fibroblasts cells. Flavonoids present in the extract and characteristic of this genus could be responsible for observed activities.

**Keywords:** cytotoxicity, SRB, selectivity index, topoisomerases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

786-0 Linhagem de carcinoma de rim

DMSO Dimetilsulfóxido

DOXO Doxorubicina

GI<sub>50</sub> Concentração que inibe 50% do crescimento celular

HT-29 Linhagem de carcinoma de cólon intestinal

INCA Instituto Nacional do Câncer

IS Índice de seletividade

K-562 Linhagem de leucemia mieloide crônica

MCF-7 Linhagem de carcinoma de mama

NCI National Cancer Institute (EUA)

NCI/ADR-RES Linhagem de carcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas

NHI/3T3 Linhagem de fibroblasto murino

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão fosfato salino

PC-3 Linhagem de carcinoma de próstata

SC1 Fração hexânica de *Selaginella convoluta*

SC2 Fração clorofórmica de *Selaginella convoluta*

SC3 Fração acetato de etila de *Selaginella convoluta*

SC4 Fração aquosa remanescente de *Selaginella convoluta*

SCB Extrato bruto de *Selaginella convoluta*

SFB Soro Fetal Bovino

SRB Sulforrodamina B

SS1 Fração hexânica de *Selaginella sellowii*

SS2 Fração clorofórmica de *Selaginella sellowii*

SS3 Fração acetato de etila de *Selaginella sellowii*

SS4 Fração aquosa remanescente de *Selaginella sellowii*

SSB Extrato bruto de *Selaginella sellowii*

T0 Tempo zero

TCA Ácido tricloroacético

UFMS Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes, para ambos os sexos, estimadas para os anos de 2012/2013, segundo Unidade da Federação .....	17
Figura 2 - Taxas brutas de incidência estimadas para 2012, por sexo, segundo Estado e capital (MS) .....	18
Figura 3 – Fotografia das duas espécies estudadas: <i>Selaginella sellowii</i> e <i>Selaginella convoluta</i> .....	25
Figura 4 - Fluxograma da preparação das frações das 3 espécies de <i>Selaginella</i> sp .....	28
Figura 5 - Esquema da placa de 96 poços com as concentrações das amostras e controles positivo (DOXO) e negativo utilizados .....	31
Figura 6 - Atividade anticâncer e citotóxica do extrato bruto (SSB), da fração hexânica (SS1), da fração clorofórmica (SS2) e da fração acetato de etila (SS3) da espécie <i>Selaginella sellowii</i> ; relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.....	38
Figura 7 - Atividade anticâncer e citotóxica do extrato bruto (SCB), da fração hexânica (SC1), da fração clorofórmica (SC2) e da fração acetato de etila (SC3) da espécie <i>Selaginella convoluta</i> ; relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra .....	39
Figura 8 - Atividade anticâncer e citotóxica do quimioterápico Doxorubicina relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra .....	40
Figura 9 - Citotoxicidade das amostras-teste e de doxorubicina em células NHI/3T3..	41
Figura 10 - Gel de agarose 1% após eletroforese para avaliação da inibição de topoisomerase I .....	44
Figura 11 - Gel de agarose 1% após eletroforese para avaliação da inibição de topoisomerase II .....	45

Figura 12 - Perfil cromatográfico em 325 nm e espectros de absorção UV (240-400nm) da fração acetato de etila da espécie <i>Selaginella sellowii</i> Hieron .....	47
Figura 13 - Perfil cromatográfico em 325 nm e espectros de absorção UV (240-400nm) da fração acetato de etila da espécie <i>Selaginella convoluta</i> (Arn.) Spring .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extratos brutos e frações de *Selaginella* sp. estudados ..... 29

Tabela 2 - Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) das amostras estudadas e do quimioterápico doxorubicina (Doxo - controle positivo) em período de incubação de 48h em cultura de células ..... 36

Tabela 3 - Valores de IS das amostras estudadas entre as diferentes linhagens neoplásicas ..... 41

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 Câncer: Aspectos gerais e epidemiológicos.....	16
2.2 Agentes Anticâncer: Quimiopreventivos e Quimioterápicos .....	18
2.3 Cultura de células e Ensaio de citotoxicidade de SRB .....	20
2.4 Topoisomerases .....	21
2.5 Gênero <i>Selaginella</i> sp. ....	23
2.5.1 <i>Selaginella sellowii</i> .....	24
2.5.2 <i>Selaginella convoluta</i> .....	24
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1 Coleta do material vegetal .....	27
4.2 Obtenção dos extratos brutos e de suas frações .....	27
4.3 Cultura de células .....	29
4.3.1 Linhagens celulares .....	29
4.3.2 Preparo das células para teste de citotoxicidade .....	29
4.3.4 Teste de citotoxicidade .....	30
4.3.5 IC <sub>50</sub> .....	31

4.3.6 Índice de Seletividade (IS) .....	32
4.4 Ensaio sobre inibição das enzimas Topoisomerases I e II .....	32
4.4.1 Soluções tampão utilizadas na extração das enzimas .....	32
4.4.2 Extração das enzimas topoisomerase I e II das células .....	33
4.4.3 Preparação das amostras-teste e controles .....	33
4.4.4 Ensaio sobre a inibição de topoisomerases .....	34
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um tumor caracteriza-se por uma doença do mau funcionamento celular, no qual as células perdem a capacidade de forma e função normais (WEINBERG, 2008) devido às mutações que se acumularam com o tempo e passaram de célula para célula através das mitoses (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). O câncer é denominado um tumor maligno que apresenta, além das características já citadas para um tumor, a capacidade de invasão do tecido adjacente e metástase – capacidade de se instalar em órgãos/tecidos distantes do qual se originou (NCI - *National Cancer Institute*, 2004). Nos tumores malignos as células perdem a capacidade de diferenciação e deixam de fabricar as proteínas típicas do seu tipo celular, as quais ficam cada vez menos sensíveis aos estímulos normais regulatórios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005) e, dessa forma, toda a função do sistema/organismo é afetada, causando enormes prejuízos para a saúde de quem o possui, senão a morte.

Mais de 75% dos cânceres humanos estão associados a fatores ambientais cancerígenos como o tabagismo, exposição à poluição resultante da industrialização e estilo de vida (DAVID; ZIMMERMAN, 2010). Outro fator que colabora no aumento da incidência de câncer é a idade do organismo (FERLAY *et al.*, 2007), pois o câncer decorre não apenas de uma mutação pontual, mas de diversas mutações sequenciais que necessitam de um tempo para que ocorram, se acumulem, e desenvolvam a doença. Isso também é um fator que explica porque o câncer tem ocorrido cada vez com maior frequência em países que estão aumentando a expectativa de vida.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano de 2030 pode-se esperar 27 milhões de novos casos que, somados aos números de pessoas já doentes, serão 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer e, entre essas, ocorrerão dezessete milhões de mortes. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda e, no Brasil, a estimativa para 2012 e 2013, é de 518.510 casos novos (INCA, 2012). Já na Europa e América do Norte as pesquisas sugerem que uma, em cada quatro pessoas, irá morrer de câncer no futuro (ALBERTS *et al.*, 2011). E devido a esse elevado número de mortes, sua crescente incidência e a resistência que

muitos pacientes apresentam aos tratamentos utilizados, a cada ano tornam-se mais necessárias descobertas de novas terapias no tratamento e cura dessa doença.

As plantas tornaram-se fortes candidatas a protótipos para quimioterápicos no tratamento do câncer, dentre os fármacos utilizados na clínica destacam-se os taxanos, descobertos em 1964 (provenientes da espécie *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata*, utilizados no tratamento de câncer de ovário) e as camptotecinas, descobertas em 1966 (derivadas da planta ornamental chinesa *Camptotheca acuminata*, que são utilizadas no tratamento de câncer de cólon, ovário e pulmões) (CHABNER; ROBERTS JR., 2005).

No Brasil, por apresentar grande variedade de biomas, espera-se uma alta diversidade química proveniente das diferentes vias biossintéticas de seus organismos, o que proporciona um grande potencial de compostos biologicamente ativos que contribuem na descoberta de novas drogas e na química medicinal. Mas, mesmo o País possuindo essa enorme diversidade vegetal, existem ainda poucos componentes isolados de sua flora, o que representa um potencial a ser explorado a fim de identificar novos componentes bioativos e o uso sustentável das espécies vegetais (BOLZANI *et al.*, 2012).

Carvalho (2006) citou, em estudos realizados para investigação de potencial anticâncer de espécies vegetais da Amazônia e Cerrado, que este último bioma apresenta maior número de plantas com atividade anticâncer conhecida. Por possuir 65,5% de sua área coberta por vegetação de Cerrado (COSTA; SALLES; MOURA, 2003), espera-se que as espécies vegetais de Mato Grosso do Sul possam contribuir nas pesquisas da área de câncer.

Este trabalho corresponde a um estudo sobre a atividade anticâncer de duas espécies de plantas do mesmo gênero: *Selaginella sellowii* e *Selaginella convoluta*. O estudo de espécies vegetais que ocorre em Mato Grosso do Sul coopera para o desenvolvimento científico regional do estado além da descoberta de novos agentes anticâncer contribuir para o tratamento de pacientes resistentes às terapias já existentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

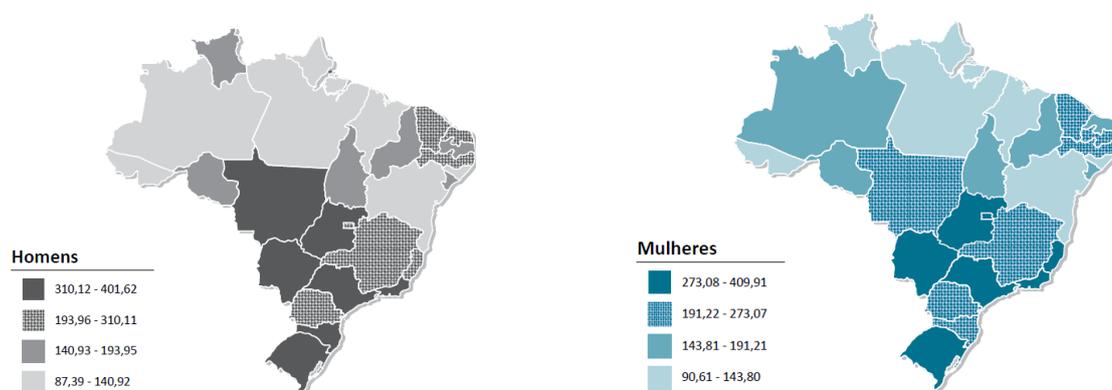
### 2.1 Câncer: Aspectos gerais e epidemiológicos

O câncer é um conjunto de mais de cem tipos de doenças, as quais apresentam características gerais semelhantes como: anaplasia frequente (indiferenciação celular); pleomorfismo (variação de tamanho e forma das células); morfologia nuclear anormal (muitas vezes o núcleo apresenta tamanho de mesma dimensão do citoplasma); mitoses múltiplas e descontroladas; além da capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metástases (STRICKER; KUMAR, 2010). Todas essas alterações produzem no organismo sérios colapsos que se manifestarão de diferentes formas, de acordo com o órgão ou a região afetada.

O câncer acontece devido a mutações que ocorrem por um defeito em alguma proteína necessária para o reparo de danos no DNA durante a replicação ou por falhas nos mecanismos de verificação, que são responsáveis por impedir que uma célula com DNA danificado tente se dividir antes que tenha finalizado o reparo; há também mutações que ocorrem devido a falhas na maquinaria da mitose (ALBERTS *et al.*, 2011) e no mecanismo de apoptose. Essas falhas ocorrem devido a danos em genes denominados genes supressores de tumor e proto-oncogenes. Não se conhecem os mecanismos de ação de todos os genes supressores de tumor, mas alguns codificam proteínas que mantêm as células em G<sub>0</sub>, bloqueando a proliferação celular, e impedindo que elas se tornem malignas (JUNQUEIRA; CANEIRO, 2005); basicamente, esses genes forçam as células a entrarem em um estado de latência quando há algum erro celular. Quando possuem mutações que caracterizam falhas em suas ações, os proto-oncogenes são chamados oncogenes. Esses genes defeituosos codificam proteínas que promovem a multiplicação desordenada das células, independente da qualidade em que esta proliferação ocorra, dando a oportunidade para que muitos erros na duplicação genética permaneçam no *pool* celular e que dessa maneira, convertam as células em malignas.

Devido ao câncer se desenvolver por não apenas uma mutação pontual, e esse processo levar anos para se completar, quanto mais velho o indivíduo mais tempo ele tem para que todas as mutações ocorram e se instalem a formar células malignas (ALBERTS *et al.*, 2011). Como a expectativa de vida tem aumentado em quase todos os países, o que se espera é que a incidência de câncer e, conseqüentemente, a morte causada pela doença, aumente.

Em virtude desse aumento da expectativa de vida, ao processo de urbanização e às ações de promoção e recuperação de saúde no Brasil, a partir dos anos sessenta, as doenças infecto-parasitárias deixaram de ser a maior causa de morte e deram lugar às doenças crônico-degenerativas, como doenças do aparelho circulatório e o câncer; e as estimativas para 2012 e 2013, no País, são de 518.510 novos casos, sendo os mais incidentes, respectivamente: o câncer de pele do tipo não melanoma, de próstata, de pulmão, de cólon e reto, e de estômago, para o sexo masculino, e para o sexo feminino, de pele não melanoma, de mama, de cólon do útero, de cólon e reto, e de glândula tireoide (INCA, 2012) (Figura 1).

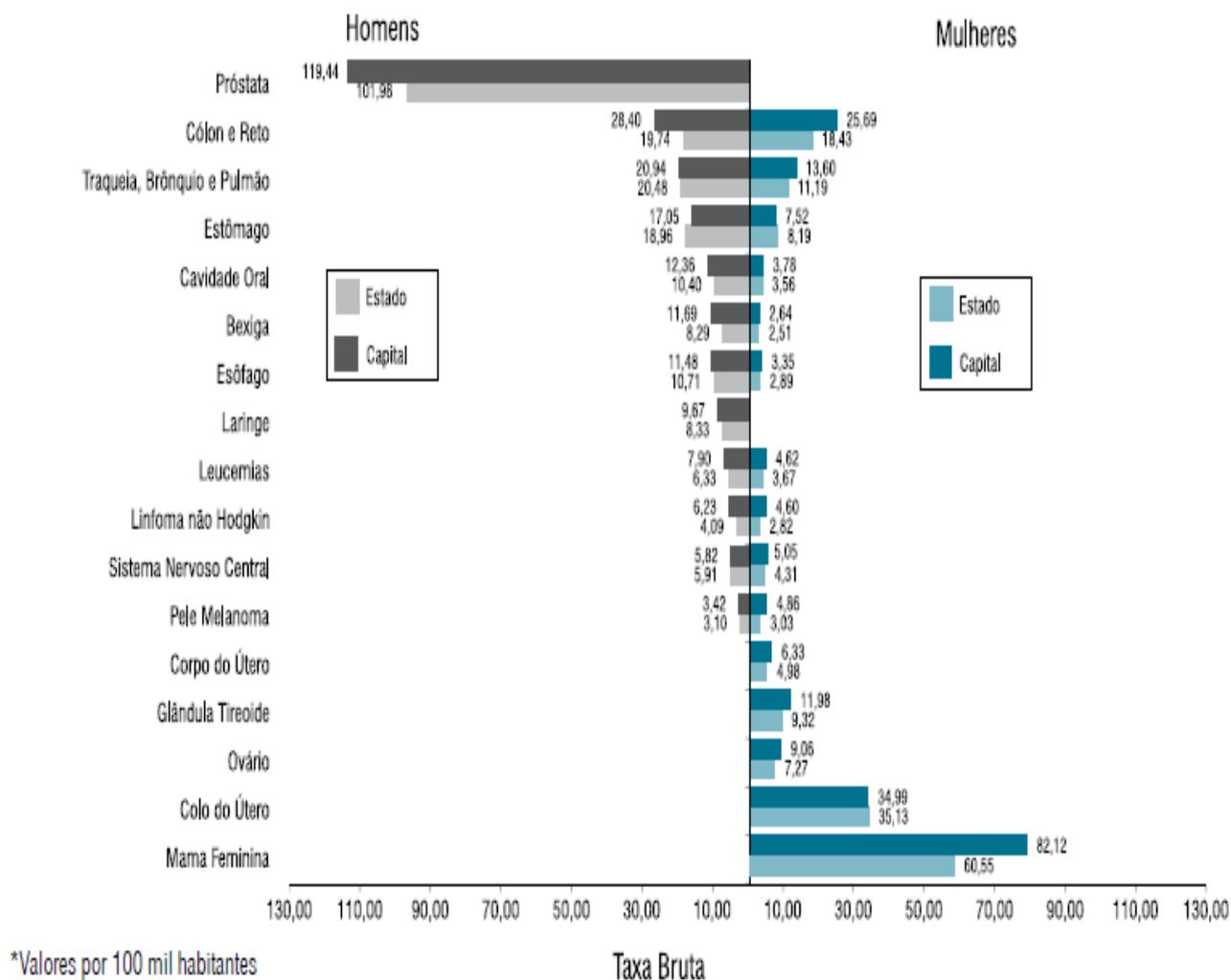


FONTE: INCA 2012

**Figura 1.** Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer, por sexo, por 100.000 habitantes, estimadas para os anos de 2012/2013, segundo Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, exceto de pele não melanoma).

No Estado de Mato Grosso do Sul as estimativas de novos casos de câncer, em 2012, válidas também para 2013, apontam o câncer de pele do tipo não melanoma, para os dois sexos, como o mais incidente, seguido pelos cânceres de próstata, de traqueia, brônquio e pulmão e de, cólon e reto, como os mais ocorrentes para o sexo masculino,

e, para o sexo feminino: o câncer de mama, de colo do útero, de cólon e reto e de traqueia, brônquio e pulmão. A soma do número de novos casos de câncer no Estado é de 4.850 casos (com uma taxa de incidência de 401,25 a cada 100.000 homens) e, para as mulheres, 4.520 novos casos e taxa de incidência de 371,16 a cada 100.000 habitantes (Figura 2).



FONTE: INCA 2012

**Figura 2.** Taxas brutas de incidência\* de câncer estimadas para 2012, por sexo, segundo Estado e capital (MS).

## 2.2 Agentes Anticâncer: Quimiopreventivos e Quimioterápicos

A procura por tratamento do câncer começou na Antiguidade, com relatos que datam desde 1955 a.C., nos quais foi citado o uso de soluções tópicas, que depois evoluiu para uso de ervas medicinais e, por fim, no século XI, o uso do composto

químico arsênio, indicado por Avicenna (PAPAC, 2001), dando uma nova ideia de tratamento do câncer: a quimioterapia. Porém, foram necessários centenas de anos para que o uso de compostos químicos passasse a ocorrer efetivamente nessa área clínica e, por isso, considera-se que a nova era da quimioterapia do câncer iniciou-se na segunda metade do século XX (DEVITA JR.; CHU, 2008).

Até a década de sessenta, era a cirurgia aliada à radioterapia que consistia no principal tratamento, porém, ambas as técnicas não conseguiam eliminar um câncer que fosse metastático, por não alcançar todas as partes e órgãos do corpo e por essa razão, pesquisadores continuavam a procura por compostos químicos que conseguissem esse alcance; Gordon Zubrod, que foi chefe da Divisão de Tratamento do Câncer do NCI, em 1956, possuía um grande interesse por produtos naturais e, dessa forma, estabeleceu um amplo programa de coleta e estudo de plantas e espécies marinhas que levou à descoberta dos taxanos e camptotecinas (CHABNER; ROBERTS JR., 2005).

Existem duas principais classes de agentes anticâncer: aquela que atua na prevenção da iniciação do processo carcinogênico, e aquela que atua após a promoção e progressão de um tumor (HOUGHTON *et al.*, 2007). As classes de compostos inibidores da iniciação, denominados quimiopreventivos, constituem-se de princípios ativos presentes em alimentos como: frutas e vegetais; nas bebidas como café, chá verde e vinho; ou em drogas que contenham princípios preventivos como curcumina e piperina (IZZOTTI, 2012; MANOHARAN; SINGH; BALAKRISHNAN, 2009). Agentes anticâncer que agem após as fases de promoção e progressão do tumor são os quimioterápicos, que constituem diversos tipos de moléculas com diversos mecanismos diferentes e são os mais procurados já que agem após a instalação da doença. Esses quimioterápicos podem ser sintetizados ou provenientes de produtos naturais (BRANDÃO *et al.*, 2010). Existem, no mercado, aproximadamente duzentas drogas liberadas para tratamento do câncer, outras centenas estão sendo desenvolvidas e elas apresentam uma grande variedade de mecanismos de ação (KAMB; WEE; LENGAUER, 2007).

As plantas proporcionam grande contribuição para o desenvolvimento de novas drogas, mesmo com estudos na área da química medicinal (combinatorial e síntese orgânica), cooperando para o surgimento de novas ideias e rotas para novas estruturas moleculares como modelos de novos fármacos (BOLZANI *et al.*, 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), entre 1940 e 2006, mais de dois terços das drogas anticâncer aprovadas ou são produtos naturais, ou foram desenvolvidas com base no conhecimento adquirido a partir de produtos naturais e, entre essas, podem ser citadas: os alcaloides da vinca (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina); taxanos (paclitaxel, docetaxel); epipodofilotoxinas (etoposídeo, tenoposídeo); camptotecina e seus derivados (topotecan, irinotecan); antraciclínicas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina) e outros (EFFERTH, 2010).

### **2.3 Cultura de células e Ensaio de citotoxicidade de SRB**

A técnica de cultivo de células iniciou-se no século XX, quando o pesquisador Ross Granville Harrison conseguiu manter células do tubo nervoso de um girino vivas fora do organismo. Com o passar do tempo, as técnicas de cultivo foram aprimoradas e, o termo ‘cultura de células’ foi estendido também para cultura de tecidos e órgãos e, a partir da década de sessenta, células tumorais passaram a serem incorporadas nas culturas celulares e, com isso, as pesquisas na área do câncer ganharam mais uma ferramenta de fundamental importância (ALVES; GUIMARÃES, 2009; HOUGHTON *et al.*, 2007).

Na pesquisa por produtos com atividade anticâncer a cultura de células tumorais tornou-se uma importante ferramenta de triagem inicial, diminuindo gastos com estudos *in vivo* e clínicos de substâncias que não apresentem atividade citotóxica, pois, conclui-se que, se não houver toxicidade para células, tampouco haverá para o tecido tumoral. Essa técnica foi aprimorada ainda mais, quando em 1989, o Departamento de Produção de Terapêuticos do Instituto Nacional do Câncer (NCI, EUA), iniciou um método de triagem *in vitro* de potenciais drogas anticâncer num painel de sessenta linhagens tumorais humanas, derivadas de diversos tipos de tecidos (HOLBECK, 2004), permitindo a realização de testes com diferentes tipos de câncer ao mesmo tempo.

Existem diversos mecanismos que podem ser estudados por meio do cultivo de células, porém, na área de pesquisa por agentes anticâncer, os ensaios de citotoxicidade são muito utilizados como triagem inicial. O teste de citotoxicidade é baseado na

coloração de células, que são submetidas a condições normais para o crescimento e proliferação que, por sua vez, têm sua intensidade quantificada (diretamente proporcional ao número de células viáveis) em que as taxas de crescimento e multiplicação são mensuradas e, dessa maneira, é feita a comparação desses resultados para uma linhagem tumoral na presença ou ausência de uma substância-teste (HOUGHTON *et al.*, 2007). A citotoxicidade inclui termos tanto citostático como citocida em que pode-se determinar quais perfis de citotoxicidade uma substância-teste apresenta sobre determinada linhagem tumoral.

Diversos ensaios de citotoxicidade foram desenvolvidos e eles são denominados de acordo com o corante utilizado. Entre eles, existem os métodos do MTT e XTT (desenvolvidos em 1986 e 1988, respectivamente), que são sais que reduzidos metabolicamente pelas mitocôndrias celulares de células viáveis, resultam em um produto formazan de coloração azul, que pode ser espectrofotometricamente mensurada. Porém o método mais utilizado é o denominado ensaio de colorimétrico da sulforodamina B (SRB), descrito por Skehan *et al.* (1990). Essa técnica consiste em quantificar o número de células por meio da absorbância (densidade óptica) apresentada pelas proteínas das membranas das células viáveis coradas pela SRB. Esse ensaio é sensível, reproduzível e mais rápido que os descritos anteriormente e, por isso, hoje é o método mais utilizado para estudar citotoxicidade de amostras.

## **2.4 Topoisomerases**

O DNA contém todo o conjunto de informações do organismo, o que nos remete a ideia de que essa molécula deve ser muito comprida para conter todas essas informações complexas. De fato, a molécula de DNA é bastante longa – aproximadamente dois metros de comprimento (BURDEN; OSHERORFF, 1998) e devido a sua alta dinâmica de estados intracelulares (ora condensados, noutra relaxados, dividindo), as topoisomerases constituem enzimas muito importantes para a divisão celular, pois elas agem desligando temporariamente uma fita do DNA (topoisomerase I) ou ambas as cadeias (topoisomerase II), durante os processos de transcrição, replicação

e recombinação do DNA e depois religando a fita no ponto em que foi desligada (KELLNER; RUDOLPH; PARWARESCH, 2000).

A existência das DNAs topoisomerases foi descoberta na década de sessenta, quando foi observado o relaxamento do DNA superenrolado negativamente em *E.coli* por uma proteína até então denominada  $\omega$  (WANG, 1971). Posteriormente foram descobertas essas classes de enzimas em diversas outras espécies e Reinos, inclusive em humanos e, por serem enzimas indispensáveis nos processos celulares inerentes à manutenção da vida dos organismos – regulam o problema topológico do superenrolamento negativo do DNA pela mudança de sua geometria tridimensional. Essas enzimas são muito estudadas/utilizadas hoje como alvos de substâncias antibacterianas e anticancerígenas que possam inibir a ação delas (POMMIER *et al.*, 2010).

O problema topológico solucionado por essas enzimas é a decatenação do DNA catenado; o desenovelamento do DNA *knotting* ou o relaxamento do DNA *supercoiling*, permitindo a abertura temporária das cadeias do DNA através da ligação covalente da enzima com a molécula do material genético, via uma ligação fosfotirosina durante a replicação do núcleo (CHAMPOUX, 2001).

Existem dois tipos de topoisomerases em humanos, de acordo com as funções catalíticas que elas exercem: topoisomerase I (com subdivisões em A e B) e II (CHAMPOUX, 2001; KELLNER; RUDOLPH; PARWARESCH, 2000). As topoisomerases do tipo I ligam-se a uma das fitas do DNA por meio de uma ligação covalente entre um resíduo de tirosina e o fosfato do DNA clivado, sem gasto de energia. Elas são monômeros e são classificadas na subfamília tipo IA quando ligam-se covalentemente no terminal 5' da quebra do DNA e, em tipo IB, quando ligam-se covalentemente no terminal 3' da quebra do DNA (complexo de quebra) permitindo a rotação de uma região dessa fita em relação a outra fita (STEWART *et al.*, 1998) resultando no relaxamento do DNA. As topoisomerases do tipo II ligam-se à fita dupla de DNA por meio de uma reação de substituição nucleofílica, clivando as duas fitas complementares, com gasto de ATP, causando um desligamento nas duas fitas do DNA e consequente translocação do cromossomo (KELLNER; RUDOLPH; PARWARESCH, 2000).

Há dois tipos de drogas que utilizam as topoisomerases como alvo, aquelas que atuam inibindo a atividade dessas enzimas (impedindo a transcrição) - chamadas inibidores catalíticos; ou, ainda, aquelas que aumentam o tempo de ligação da topoisomerase ao DNA até que este último seja quebrado. As substâncias que possuem o mecanismo deste segundo tipo são chamadas veneno de topoisomerases (CHAMPOUX, 2001; NITISS, 2009). Essa classe de drogas inclui o etoposídeo; a doxorrubicina e a mitoxantrona como os principais agentes utilizados na área clínica (que possuem a topoII como alvo molecular); esses quimioterápicos ao gerarem altos níveis de complexo de ligação enzima-droga-DNA, causam a quebra das fitas, bloqueando a transcrição e a replicação; levando os fragmentos de DNA a unirem-se a proteínas que sinalizam a apoptose (NITISS, 2009).

## **2.5 Gênero *Selaginella* sp.**

*Selaginella* sp. representa o único gênero da família Selaginellaceae, com cerca de setecentas espécies distribuídas no mundo inteiro (STAFFORD, 1991), principalmente nos Continentes Americano, África e Europa, na Ásia (Japão), Oceania (Nova Guiné e Austrália) e em ilhas do leste do Pacífico (Havaí, Marquesas, Taiti e Rapa) (HIRAI; PRADO, 2000). Com aproximadamente 270 espécies ocorrendo no Continente Americano (DE SÁ *et al.*, 2012), com os limites de sua distribuição ao norte no Alasca, a leste na Groelândia, e ao sul, em Mendonza e Buenos Aires (Argentina) (HIRAI; PRADO, 2000). Caracteriza-se por plantas pteridófitas do Filo Lycophyta, que representam as mais basais das plantas vasculares terrestres (PRYER *et al.*, 2001).

Esse gênero de distribuição ampla apresenta registro de 46 espécies no Brasil e, dessas, dezesseis são endêmicas (ALSTON; JERMY; RANKIN, 1981). A região que contém o maior número de espécies é a Bacia Amazônica (com 31 espécies) (TRYON; TRYON, 1982). Na região do Pantanal encontram-se distribuídas nas formações montanhosas, sendo que na região da borda oeste do Pantanal sul-mato-grossense, ocorrem seis espécies distribuídas em florestas estacionais, encostas de morros ou solo calcáreo/arenoso (ASSIS; LABIAK, 2009).

Esse gênero é muito estudado devido a características farmacológicas como antiplasmodial e leishmanicida (KUNERT *et al.*, 2008); antitumoral (LIU *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2007); antifúngica (LEE *et al.*, 2009); antiviral (CAO *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2001) e até mesmo antiglicêmica (ZHENG *et al.*, 2011). Essas atividades biológicas se dão pela riqueza em flavonoides que as espécies desse gênero possuem (CHEN *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2009; LIN; KUO; CHOU, 2000; MA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 1995; SUN *et al.*, 1997). Segundo Setyawan (2011a) o gênero contém flavonoides, alcaloides e terpenoides; porém, os biflavonoides apresentam-se como os principais compostos bioativos de *Selaginella*, especialmente amentoflavona e ginkgetin.

Apesar da riqueza farmacológica que as espécies desse gênero possuem, o uso de pteridófitas na medicina popular, no Brasil, ainda é pouco documentada (BARROS; ANDRADE, 1997) e esse número reduzido de espécies estudadas se deve ao fato de que a pesquisa nessa área se concentra principalmente em espécies de plantas superiores (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

### **2.5.1 *Selaginella sellowii***

Santos *et al.* (2005) fizeram estudos de análise fitoquímica dessa espécie na área de química ecológica; os outros poucos registros que existem na literatura sobre *S.sellowii* são de levantamentos florísticos citando sua ocorrência. Não existem estudos sobre atividade biológica dessa espécie, e sua distribuição geográfica se dá no México, Cuba, Hispaniola, Guatemala, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Colômbia, Bolívia, Argentina; e no Brasil nos Estados de Mato Grosso do Sul, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (HIRAI; PRADO, 2000) (Figura 3).

### **2.5.2 *Selaginella convoluta***

É uma espécie de hábito herbáceo que ocorre espontaneamente no Brasil, conhecida no Nordeste do País pelo nome popular de Jericó, mão-de-sapo ou mão-fechada (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; DE SÁ *et al.*, 2012), ocorre nos Estados do

Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo; e também em outros países como México, Guatemala, Honduras, Cuba, Hipaniola, Argentina e Paraguai (ASSIS; LABIAK, 2009) (Figura 3).

Essa espécie é muito utilizada na medicina popular como diurético, afrodisíaco e no tratamento da amenorréia (AGRA *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), como analéptico, antidepressivo (GIORGETTI; NEGRI; RODRIGUES, 2007), para tratar sangramento, tosse, aumentar a fertilidade feminina (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007) e, na região semiárida do Brasil, é muito utilizada para tratar dor e inflamação (DE SÁ *et al.*, 2012).



FONTE: SABÓIA, J.F.

**Figura 3.** À esquerda fotografia da espécie *Selaginella sellowii* e à direita, fotografia de *Selaginella convoluta*.

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral**

Avaliar a atividade antiproliferativa e de inibição das topoisomerasas por extratos e frações de espécies do gênero *Selaginella*.

#### **Específicos**

- Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila provenientes dos extratos brutos das espécies *Selaginella sellowii* e *Selaginella convoluta* em células neoplásicas humanas.
- Avaliar a seletividade dos extratos e frações em uma linhagem de células não tumorais (Índice de seletividade – IS).
- Avaliar a capacidade inibitória sobre as topoisomerasas tipo I e II das frações com potencial atividade citotóxica.
- Identificar as classes de moléculas presentes nas frações mais ativas por meio de cromatografia líquida.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta do material vegetal**

As espécies de *Selaginella* sp. estudadas neste trabalho foram coletadas na região de Porto Murtinho-MS em agosto de 2012. A coleta de *S.convoluta* e *S.sellowii* foi realizada pelo Biólogo e Técnico João Roberto Fabri (UFMS) e, após identificação realizada pelo Prof. Dr. Arnildo Pott (UFMS); foram registradas no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande-MS (CG/UFMS), com os respectivos números de registro CG/UFMS 36052 e 36051.

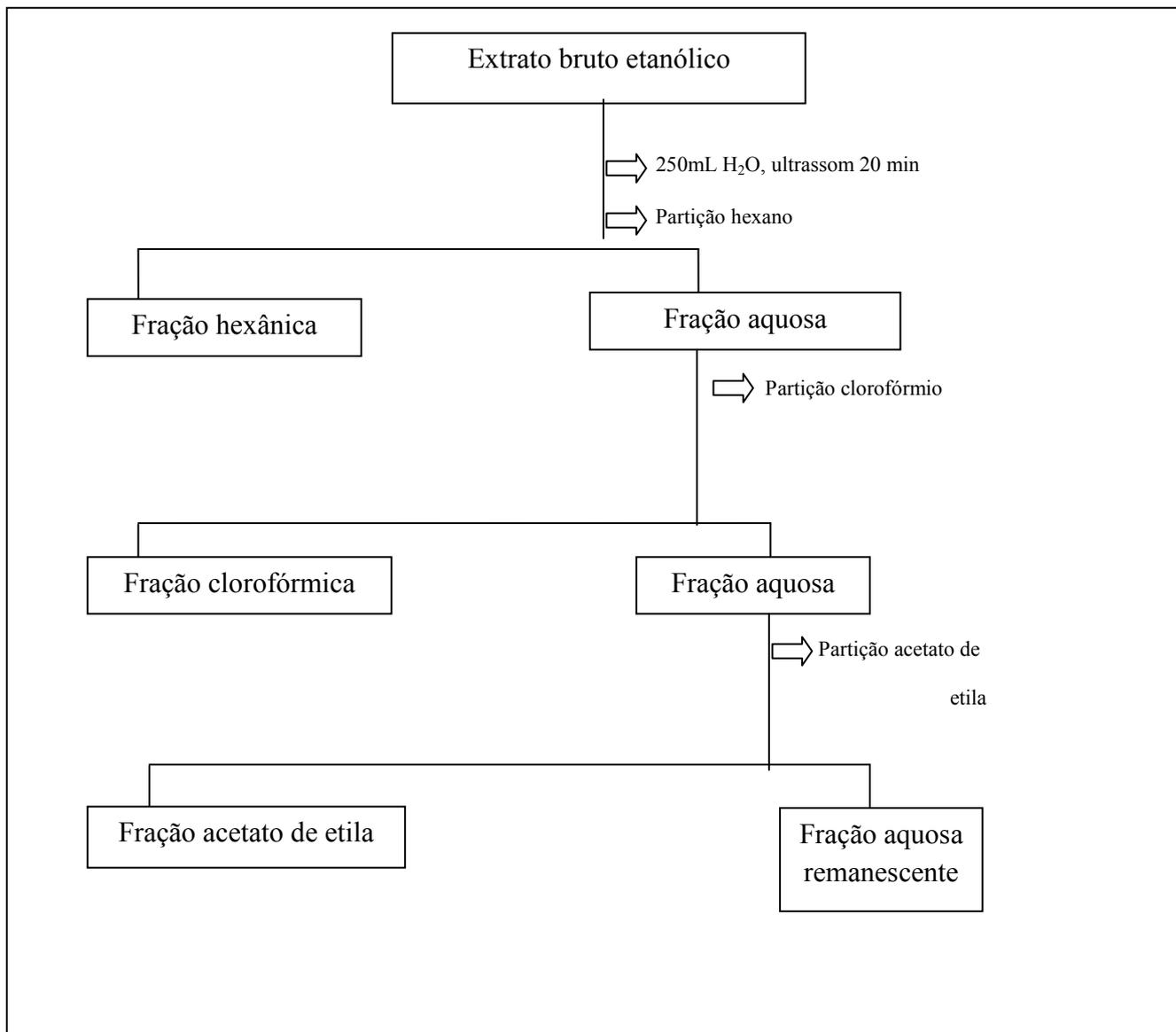
### **4.2 Obtenção dos extratos brutos e de suas frações**

A obtenção dos extratos e frações foi feita em parceria com o Laboratório de Farmacognosia da UFMS (Campo Grande-MS), sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo.

Primeiramente, foi feita uma extração de forma exaustiva por percolação para a obtenção, de forma mais seletiva, das substâncias de interesse contidas no vegetal e, posteriormente, foram preparadas as frações por partição líquido-líquido.

As espécies foram separadas (60g), lavadas e colocadas para secar em temperatura ambiente, em local ventilado e protegido da luz solar. Logo após, foram pulverizadas (utilizou-se as plantas inteiras) e deixadas por doze horas em um béquer contendo etanol/água, 70%. Foi preparado percolador, para cada uma das espécies, nos quais essas amostras foram extraídas com 2L de etanol/água 70%. Esses extratos foram concentrados em rota evaporador até que o etanol fosse completamente evaporado e só sobrasse a água junto com o extrato no balão volumétrico. O extrato foi transferido para um recipiente e deixado por dois dias em capela e uma semana em dessecadora. Desses extratos, uma parte foi separada para os testes de citotoxicidade e a outra para fazer o fracionamento.

No fracionamento, cada extrato bruto foi retomado em 250 mL de água destilada e colocado em cuba de ultrassom por 25 minutos. Depois, foi feita a partição entre água e hexano; água e clorofórmio e água e acetato de etila, que resultou nas frações hexânica; clorofórmica; acetato de etila e aquosa remanescente (Figura 4).



**Figura 4.** Fluxograma da preparação das frações das espécies de *Selaginella* sp.

Dessa maneira, cada espécie possui, além do extrato bruto, quatro frações para testes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Extratos brutos e frações de *Selaginella* sp. estudados

	<i>S.sellowii</i>	<i>S.convoluta</i>
Extrato hidro etanólico (Bruto)	SSB	SCB
Fração Hexano	SS1	SC1
Fração Clorofórmio	SS2	SC2
Fração Acetato de Etila	SS3	SC3
Fração Aquosa (remanescente)	SS4	SC4

### 4.3 Cultura de células

#### 4.3.1 Linhagens celulares

Foram cultivadas seis linhagens de células neoplásicas humanas: MCF-7 (carcinoma de mama, ATCC: HTB-22), 786-0 (carcinoma de rim, ATCC: CRL-1932), PC-03 (carcinoma de próstata, ATCC: CRL-1435), HT-29 (carcinoma de cólon, ATCC: HTB-38), K-562 (leucemia mieloide crônica, ATCC: CCL-243) e NCI/ADR-RES (carcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas, NCI: NCI-ADR-OVCAR). Além das linhagens neoplásicas foi cultivada uma linhagem de células não tumorais NIH/3T3 (fibroblasto murino, ATCC: CRL-1658), adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ). Todas as linhagens celulares neoplásicas citadas foram doadas pelo Prof. Dr. João Ernesto Carvalho (Unicamp).

#### 4.3.2 Preparo das células para o teste de citotoxicidade

Para o cultivo, as células que são mantidas congeladas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas conforme descrito por Freshney (2005), em garrafas de cultivo estéreis (25 cm<sup>2</sup>) contendo o meio apropriado, RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) ou DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e tratado com

penicilina/estreptomicina; e então mantidas em incubadora à 37°C, 100% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

Conforme as células cresciam nas garrafas e chegavam a uma densidade ótima para serem testadas quanto à citotoxicidade das amostras, as linhagens celulares aderentes (que se fixam no fundo da garrafa) eram “descoladas” pela adição de solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS e pH 7,4. Após a ação desejada da tripsina, as células eram centrifugadas a 1.000 rpm por quatro minutos para a troca de meio contendo tripsina por meio completo novo. Para a linhagem não aderente (K-562), foi realizado o mesmo procedimento, sem a etapa de tripsinização. Ressuspendidas em meio novo, a contagem das células viáveis era feita em Câmara de Neubauer com o corante de exclusão Trypan Blue®.

#### 4.3.4 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi feito com o corante sulforodamina B (SRB), seguindo a metodologia proposta por Skehan *et al.* (1990).

Quando as células chegavam a um crescimento exponencial, elas eram contadas em câmara de Neubauer e era calculada a densidade de inoculação de 10.000 células em 100µL de meio para serem adicionados em cada cavidade de uma placa de 96 micropoços. As placas eram colocadas em incubadora de CO<sub>2</sub> por 24h a 37°C para que se fixassem no fundo dos poços.

Após esse período eram adicionados 100µL das amostras de interesse nos poços a quatro concentrações fixas: 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (Tecnofarma International®, Uruguai), sendo as concentrações dez vezes menores que aquelas usadas para as amostras testadas (0,025µg/mL; 0,25µg/mL; 2,5µg/mL e 25µg/mL) (Figura 5).

As amostras foram diluídas com Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,25%, concentração que não altera viabilidade celular. Todas as amostras foram testadas em cada concentração em triplicata, originando média e desvio padrão da porcentagem de crescimento. O controle negativo consiste nas células e o meio de cultura, sem amostrateste. Para cada concentração da amostra foi obtido um controle da coloração da amostra (branco da amostra), no qual consiste em uma cavidade que contém apenas a amostra e o meio de cultura, sem células. Após esses procedimentos as placas eram incubadas novamente por 48h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BCO 0,25µg/mL	BCO 2,5µg/mL	BCO 25µg/mL	BCO 250µg/mL	MEIO DE CULTURA	MEIO DE CULTURA						
B	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL	250µg/mL	C-	C-						
C	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL	250µg/mL	C-	C-						
D	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL	250µg/mL	C-	C-						
E	0,025µg/mL	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL								
F	0,025µg/mL	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL								
G	0,025µg/mL	0,25µg/mL	2,5µg/mL	25µg/mL								
H	BCO DOXO 0,025µg/mL	BCO DOXO 0,25µg/mL	BCO DOXO 2,5µg/mL	BCO DOXO 25µg/mL								

BCO = branco; DOXO = doxorubicina; C- = controle negativo.

**Figura 5.** Esquema da placa de 96 poços com as concentrações das amostras e controles positivo (DOXO) e negativo utilizados.

Para fazer a leitura das absorvâncias, o meio de cada cavidade da placa de 96 poços foi aspirado e as células viáveis foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 20%, na quantidade de 100µL/poço, por sessenta minutos a 4°C. Na etapa seguinte, o TCA foi descartado e a placa lavada com água e deixada secar em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 50µL de SRB 0,1% (diluído em ácido acético 1%) em cada poço e deixados agir em local escuro por 30 minutos para corar as células. Após esse período, cada poço foi lavado quatro vezes com 100µL de ácido acético 1% para retirar o excesso de corante. Por último, após o descarte do ácido acético, foram adicionados 100 µL de tampão Trizma base (10 mM) em cada poço e as placas colocadas para agitação por quinze minutos (para uma diluição homogênea da SRB) para a realização da leitura em leitor de microplacas a 540 nm.

#### 4.3.5 Concentração de inibição de 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>)

Os resultados obtidos durante a leitura (absorvâncias) foram usados para calcular a porcentagem de crescimento de cada linhagem (*Excel 2007*) utilizando a fórmula (representada abaixo) de Monks *et al.* (1991) e, conforme o padrão de proliferação das células, foram associados os parâmetros de efeito citostático ou citocida para cada amostra. Os valores abaixo de 100% e acima de 0% representam inibição de crescimento (efeito citostático), enquanto os valores negativos, abaixo de 0%, representam morte celular (efeito citocida).

$$\text{Se } T \geq T_0 \text{ e } T < CN, \text{ efeito citostático: } 100 \times [(T - T_0) / (CN - T_0)];$$

$$\text{Se } T < T_0, \text{ efeito citocida: } 100 \times [(T - T_0) / T_0]$$

(MONKS *et al.*, 1991)

A concentração de uma amostra que inibe 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) foi determinada em programa para gráficos e análises de dados (*Origin Versão 6.0*).

#### 4.3.6 Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) relaciona a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral e uma linhagem não tumoral. Neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da  $IC_{50}$  de cada amostra-teste na linhagem de células não tumorais NHI/3T3 e o valor da  $IC_{50}$  de cada composto na linhagem de células neoplásicas ( $IS = IC_{50} \text{ 3T3} / IC_{50} \text{ células neoplásicas}$ ). As amostras com  $IS \geq 2,0$  serão consideradas seletivas, inferindo-se que a amostra é duas vezes mais citotóxica para a linhagem neoplásica em relação às células normais (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Quando a  $IC_{50}$  é  $>250 \mu\text{g/mL}$  não é possível calcular o IS para determinada amostra em estudo.

### **4.4 Ensaio sobre inibição das enzimas Topoisomerases I e II**

#### 4.4.1 Soluções tampão utilizadas na extração das enzimas

Tampão 1 – NaCl 150mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1mM pH=6,4;  $\text{MgCl}_2$  5mM; EDTA 1mM; DTT 0,2mM; PMSF 1Mm; (Triton X-100 0,3% v/v).

Tampão 2 – Tris-HCl 10mM pH=7,5; contendo: KCl 25mM;  $\text{MgCl}_2$  5mM; DTT 1mM; PMSF 1mM.

Tampão 3 – Tris-HCl 50mM pH=7,5; contendo: NaCl 1mM; EDTA 1mM; DTT 1Mm; PMSF 1Mm (colocar este somente na hora do uso).

Tampão 4 – Tris-HCl 50mM pH=7,5; contendo: EDTA 1mM; NaCl 1M; DTT 1mM; PMSF 1mM (colocar este somente na hora do uso).

Tampão 5 – Tris-HCl 50mM pH=8,0; contendo KCl 120mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, DTT 0,5mM e ATP 0,5mM.

Tampão 6 - Tris-HCL 100mM pH= 7,9; contendo: EDTA 10mM, NaCl 1,5M, albumina de soro bovino 1% (v/v).

EDTA= ácido etilenoglicol bis ( $\beta$ -amino etil éter)-N,N,N',N', tetra acético; DTT= ditionitritol; PMSF = fenil metil sulfonyl fluoreto.

#### 4.4.2 Extração das enzimas topoisomerases I e II das células

Para a extração das enzimas topoisomerases I e II, foi utilizado um protocolo modificado de TopoGen®, Grivicich (1999) e Faria (2000), foram cultivadas células HT-29 (carcinoma de cólon) em garrafa de cultivo estéril de área de 150 cm<sup>2</sup>. Quando foi observado que as células formaram uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência no fundo das garrafas, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS para a retirada do soro. Após a lavagem, foram adicionados mais 4 mL de PBS e então, com o auxílio de um *scraper*, as células foram rasteladas da garrafa e transferidas para um tubo cônico estéril de 15 mL e centrifugadas a 1.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi aspirado e as células resuspendidas em 5 mL de tampão 1 (NaCl 150mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM pH=6,4; MgCl<sub>2</sub> 5mM; EDTA 1mM; DTT 0,2mM; PMSF 1Mm). Dessa solução foram feitas alíquotas em microtubos que foram colocados para centrifugar a 4°C a 1.200 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi desprezado e 1 mL de tampão 1 (com Triton X-100 0,3% v/v) foi adicionado ao *pellet* de células. Essa solução foi alíquotada em microtubos (cada um contendo 200µL de solução). Em seguida, cada microtubo teve seu volume completado para 1 mL com solução tampão 2 (Tris-HCl 10mM pH=7,5; contendo: KCl 25mM; MgCl<sub>2</sub> 5mM; DTT 1mM; PMSF 1mM). Foi realizada homogeneização por inversão durante dez minutos para se extrair os núcleos celulares. Depois, os microtubos foram colocados novamente em centrifuga por dez minutos a 4°C a 1.700 rpm. O sobrenadante foi desprezado e foi feita a sonicação com nitrogênio líquido. Para a obtenção final de topoisomerase AI, foi acrescentado ao microtubo 200 µL de solução tampão 4 (Tris-HCl 50mM pH=7,5; contendo: EDTA 1mM; NaCl 1M; DTT 1mM; PSMF 1mM) e, para obtenção de topoisomerase AII, foi acrescentado 200 µL de solução tampão 3 (Tampão 3 – Tris-HCl 50mM pH=7,5; contendo: NaCl 1mM; EDTA 1mM; DTT 1Mm; PMSF 1Mm) em outro microtubo. Ambas as alíquotas foram centrifugadas a 12.700 rpm por quarenta minutos, após isso, foram reservadas e o sobrenadante (enzima) coletado e armazenado em *freezer* à -70°C.

#### 4.4.3 Preparação das amostras-teste e controles

Foram testadas as amostras SC2, SS2 e SS3, as quais apresentaram potencial atividade citotóxica.

As amostras previamente diluídas em DMSO (100.000 µg/mL) foram convertidas a 600µg/mL (6µL em 994µL de água de Milli-Q) para a reação de inibição das topoisomerases.

Os controles positivos e as amostras-teste foram incubados por 1h a 37°C na presença de 6,7µL de água; 6µL de tampão 6 (Tris-HCL 100mM pH= 7,9; contendo: EDTA 10mM, NaCl 1,5M, albumina de soro bovino 1% v/v) para topoisomerase I ou tampão 5 (Tris-HCl 50mM pH=8,0; contendo KCL 120Mm, MgCl<sub>2</sub> 10mM, DTT 0,5mM e ATP 0,5Mm) para topoisomerase II; 3,3µL de irinotecan (quimioterápico que inibe a topoisomerase I) ou de etoposídeo (inibidor de topoisomerase II) ou 4µL da amostra; 0,5 µL (0,125µg) de plasmídeo pBR322 (Invitrogen®) e 7µL de extrato nuclear (EN) contendo topo I ou topo II.

Para o preparo dos controles negativos, foram incubados 10µL de água de milli-Q; 6µL de tampão de reação de topo I ou II; 0,5µL de sulforodamina e 7µL de extrato nuclear (EN) contendo topoisomerase I ou II.

Após o período de incubação foram adicionados 4µL de tampão de parada (50% glicerol, 10% dodecil sulfato de sódio SDS e 25% de azulbromofenol) aos controles e amostras-teste e, estes, foram deixados no congelador por vinte minutos. Depois foram adicionados 2µL de proteinase K (pK 1mg/mL) e deixados em banho-maria a 55°C por quarenta minutos.

#### 4.4.4 Ensaio sobre a inibição de topoisomerases I e II (Miller, Liu, Englund, 1981; Muller *et al.*, 1988 ; Trask, Didonato, Muller, 1984)

Os produtos das reações das topoisomerases foram aplicados em poços no gel de agarose 1% (p/v), contendo cada um 4 µL da reação, 2 µL de 10x Blue Juice®, 2 µL de GelRed por 1h30 a 45v para a visualização. Posteriormente, o gel foi fotografado sobre luz ultravioleta com câmera digital para visualização dos produtos de relaxamento. A interpretação do gel é feita comparando as bandas de DNA relaxado e DNA enovelado, na presença e ausência da enzima. Os perfis que se obtêm dos produtos das reações são:

1. Inibição da topoisomerase - presença das bandas de DNA relaxado (o plasmídeo utilizado nesse estudo possui 20% de DNA relaxado em sua composição, ou seja, a

banda de DNA relaxado sempre estará marcada, mesmo se a amostra for inibitória da ação de topoisomerases) e enovelado, como acontece na reação com os controles positivos); 2. Sem inibição de topoisomerase, quando a banda de DNA enovelado é relaxada total ou parcialmente ou quando há formação de DNA linear (banda entre as posições de DNA relaxado e DNA enovelado).

#### **4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

As frações acetato de etila das espécies *Selaginella sellowii* e *Selaginella convoluta* foram analisadas em um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com sistema binário de solvente modelo LC-20AD, acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A (Shimadzu) e injetor manual com alça de amostragem de 20 µL, operando em comprimento de onda de 270 nm e 325 nm. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa Shimadzu octadecil Shim-pack PREP-ODS (H) KIT (250 mm x 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm) e pré-coluna (4 cm x 3 mm) com mesma fase estacionária. Fase móvel H<sub>2</sub>O (A) e MeOH (B) ambas com ácido acético 1%, a fluxo de 0,8 mL/min em sistema de gradiente linear: 0,01-8 min 75% (B), 8-25 min 90% (B), 25-35 min 100% (B) e 35-45 min 75% (B). Os dados cromatográficos foram analisados em um sistema operacional computadorizado com software Lcsolution (Shimadzu). Os solventes utilizados foram de grau de pureza CLAE (Vetec) e a água Milli-Q (Millipore).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de sulforodamina (SRB) foi utilizado para avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos brutos e frações das espécies *S.sellowii* e *S.convoluta* em seis linhagens de células neoplásicas MCF-7 (carcinoma de mama), 786-0 (carcinoma de rim), PC-03 (carcinoma de próstata), HT-29 (carcinoma de cólon), K-562 (leucemia mieloide crônica) e NCI/ADR-RES (adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas) e em uma linhagem de células não tumorais NHI/3T3 (fibroblasto murino) (Tabela 2).

Devido às porcentagens de crescimento das frações aquosas remanescentes das duas espécies (SC4 e SS4) terem sido próximas a 100% até a maior concentração testada (250µg/mL), elas foram consideradas inativas e não foi possível o cálculo de IC<sub>50</sub>. Por esse motivo, elas foram excluídas dos testes e não foram testadas em todas as linhagens celulares.

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) dos extratos brutos e frações das espécies de *Selaginella* sp. e de Doxorubicina em período de incubação de 48h em cultura de células

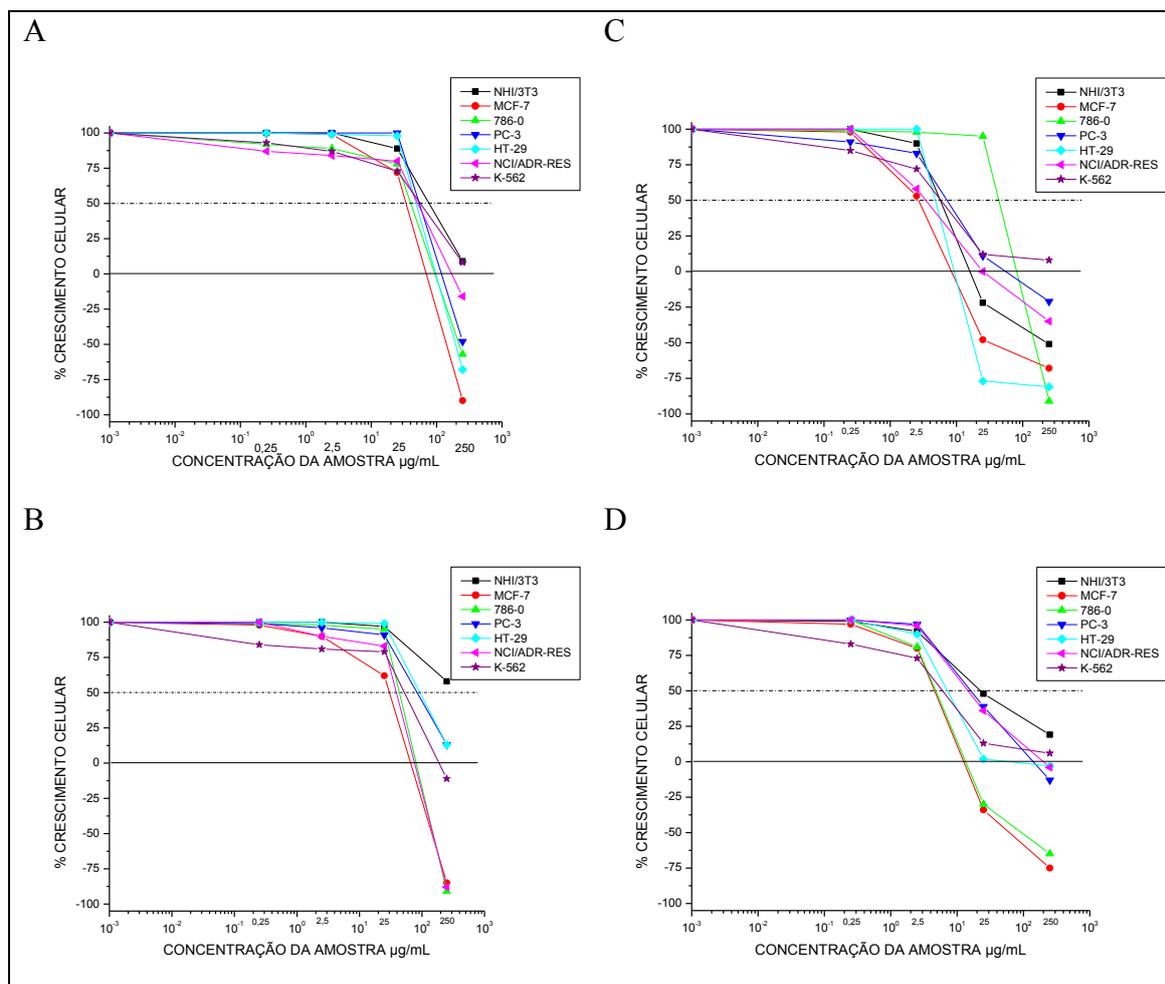
	MCF-7	786-0	PC-3	HT-29	NCI/ADR-RES	K-562	NHI/3T3
<b>SSB</b>	29,40	46,63	77,15	80,68	59,55	50,1	151,75
<b>SS1</b>	29,75	70,59	89,18	118,55	47,86	62,22	>250
<b>SS2</b>	2,57	2,55	6,74	3,36	2,62	5,27	11,17
<b>SS3</b>	1,81	2,68	24,67	6,1	18,96	5,29	24,53
<b>SS4</b>	>250	>250	>250	>250	NT	NT	>250
<b>SCB</b>	41,57	62,42	>250	>250	174,85	53,25	>250
<b>SC1</b>	32,95	51,35	107,10	77,23	57,03	86,51	248
<b>SC2</b>	6,69	23,46	24,71	187,90	42,75	9,55	54,73
<b>SC3</b>	59,12	75,65	30,65	>250	43,65	2,53	82,52
<b>SC4</b>	>250	>250	>250	>250	NT	NT	>250
<b>Doxo*</b>	0,03	0,03	0,23	0,44	2,45	0,19	0,55

Doxo = Doxorubicina (controle positivo); NT = não testado.

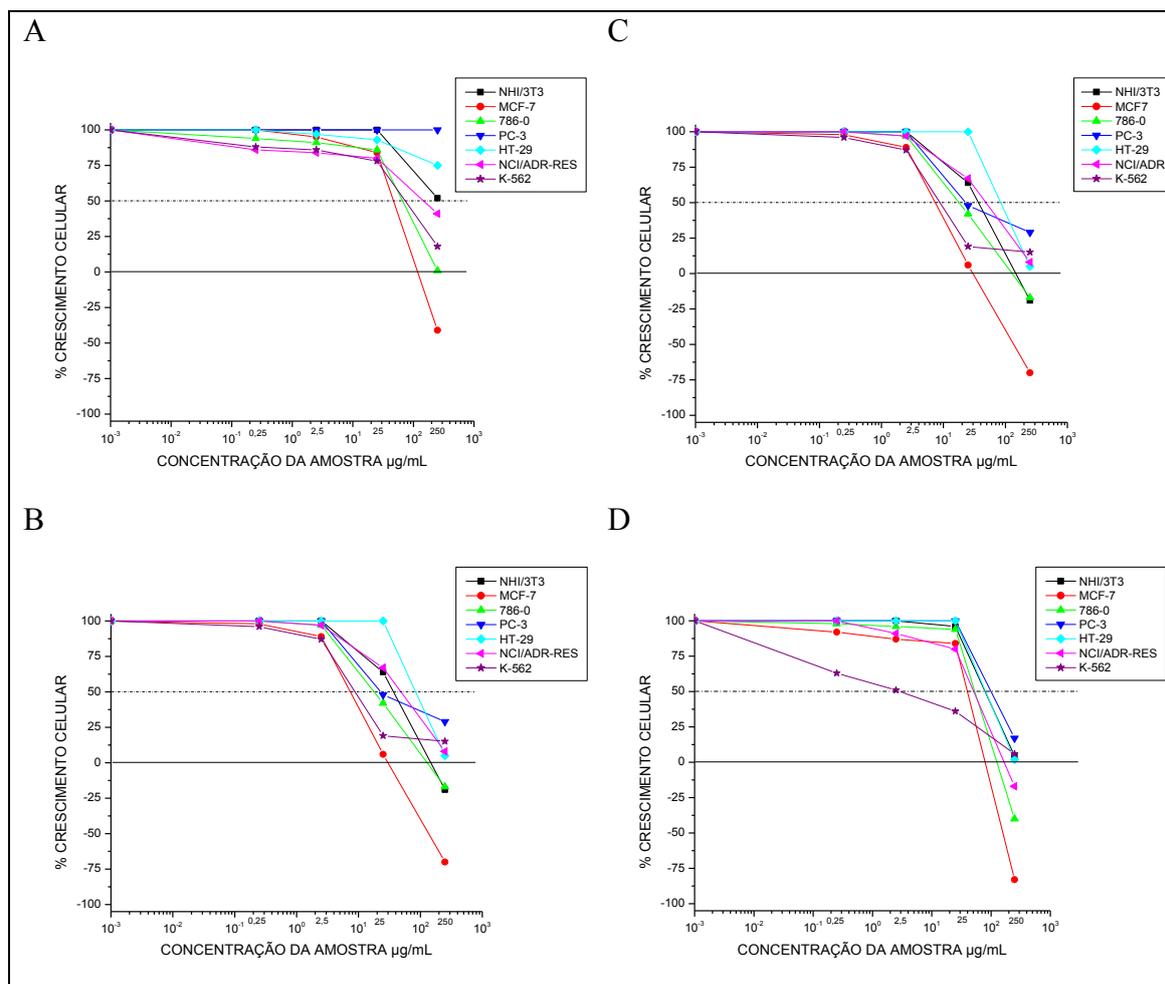
Ao considerar o valor de 30 µg/mL (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991) a fração acetato de etila de *Selaginella selowii* (SS3) foi a mais ativa entre todas as amostras

testadas em células MCF-7 ( $IC_{50}$  de 1,81 $\mu$ g/mL), enquanto a fração clorofórmica (SS2) foi fortemente ativa para todas as linhagens estudadas. Destaca-se também para esta última fração, uma atividade tão potente quanto àquela apresentada pela Doxorubicina (2,62 e 2,45 $\mu$ g/mL, respectivamente) na linhagem de carcinoma de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI/ADR-RES), o que pode indicar resultados promissores para o isolamento de novos compostos a partir dessa espécie com importância na busca de novos fármacos, em especial para pacientes que apresentam resistência à quimioterapia (KAMB; WEE; LENGAUER, 2007; EFFERTH, 2010; TAN *et al.*, 2010). A fração de acetato de etila (SC3) de *Selaginella convoluta* apresentou a mais forte atividade para a linhagem de células leucêmicas K-562 ( $IC_{50}$ = 2,53 $\mu$ g/mL).

As Figuras 6 e 7 representam os gráficos que associam a porcentagem de crescimento celular de todas as linhagens estudadas (NHI/3T3, MCF-7, 786-0, PC-3, HT-29, NCI/ADR-RES e K-562) em cada concentração (0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL) das amostras testadas.

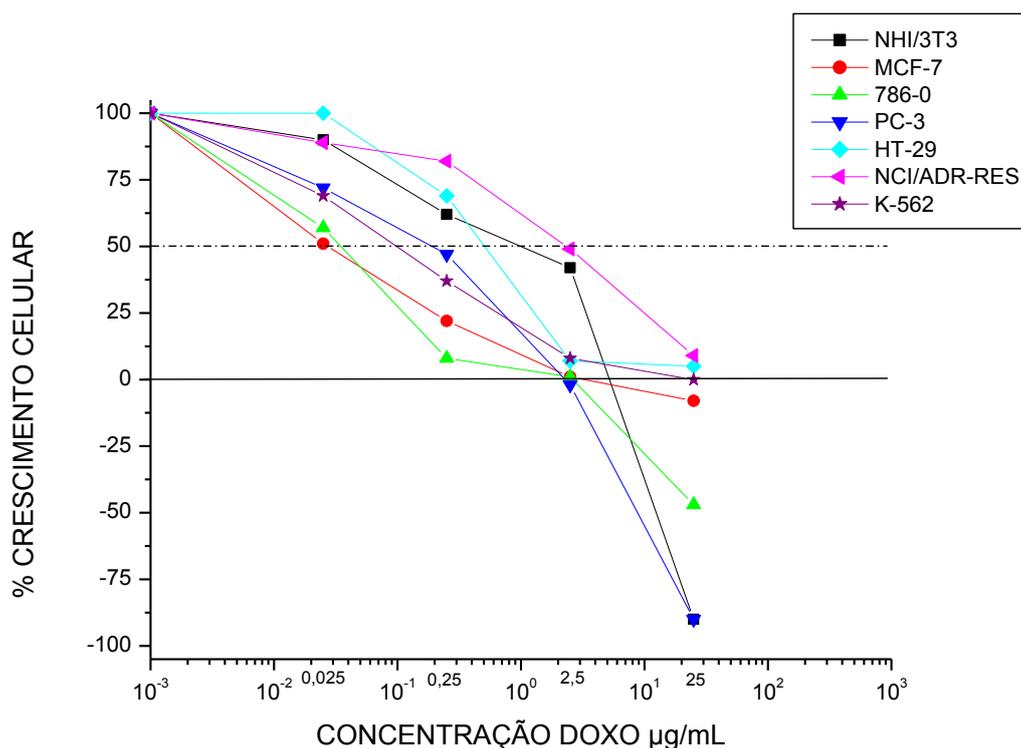


**Figura 6.** Atividade antiproliferativa do extrato bruto - SSB (A), da fração hexânica - SS1 (B), da fração clorofórmica - SS2 (C) e da fração de acetato de etila - SS3 (D) da espécie *Selaginella sellowii*; relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.



**Figura 7.** Atividade antiproliferativa do extrato bruto - SCB (A), da fração hexânica – SC1 (B), da fração clorofórmica – SC2 (C) e da fração acetato de etila SC3 (D) da espécie *Selaginella convoluta*; relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

Na Figura 8 está representado o gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico Doxorrubicina sobre as linhagens NHI/3T3, MCF-7, 786-0, PC-3, HT-29, NCI/ADR-RES e K-562. Esse gráfico relaciona a porcentagem de crescimento das células com a concentração do quimioterápico.

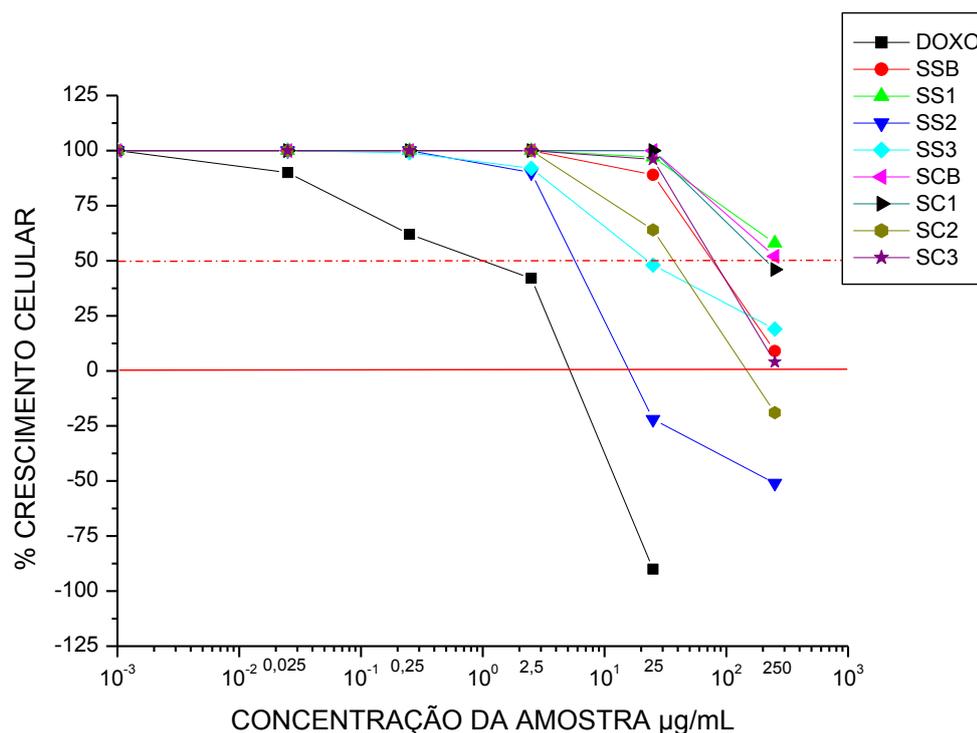


**Figura 8.** Atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorrubicina relacionando porcentagem de crescimento versus concentração da amostra.

A Figura 9 representa a citotoxicidade das amostras na linhagem de células não tumorais NHI/3T3 (fibroblasto murino). Das onze amostras testadas, sete delas apresentaram baixa/nenhuma citotoxicidade para as células não tumorais, sendo que somente a SS2 foi altamente citotóxica nessa linhagem ( $IC_{50(3T3)} = 11,17 \mu\text{g/mL}$ ). A não citotoxicidade, ou baixa citotoxicidade, em células não tumorais, indicam uma importância muito grande na pesquisa por fármacos anticâncer já que, isso garante poucos efeitos colaterais em pacientes em tratamento.

As amostras mais citotóxicas em células NHI/3T3 foram SS2 e SS3 ( $IC_{50} = 11,17$  e  $24,53 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto as amostras SSB, SC1 e SC3 não foram citocidas para esta linhagem e a fração hexânica de *S. selowii* (SS1) e o extrato bruto de *S. convoluta* (SCB) não apresentaram citotoxicidade alguma para esta mesma linhagem ( $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ).

Na Tabela 3 estão representados os índices de seletividade das amostras para cada linhagem tumoral estudada.



**Figura 9.** Citotoxicidade das amostras testadas e de doxorrubicina em células NHI/3T3.

**Tabela 3.** Índice de Seletividade das amostras estudadas entre as diferentes linhagens neoplásicas

	SSB	SS1	SS2	SS3	SCB	SC1	SC2	SC3	DOXO
MCF-7	5,16	**	4,34	13,5	**	7,52	8,18	1,39	18,33
786-0	3,25	**	4,38	9,15	**	4,82	2,33	1,09	18,33
PC-3	1,96	**	1,65	0,99	**	2,31	2,21	2,69	2,39
HT-29	1,88	**	3,32	4,02	**	3,21	0,29	**	1,25
NCI/ADR	2,54	**	4,26	1,29	**	4,34	1,28	1,89	0,22
K-562	3,02	**	2,11	4,63	**	2,86	5,73	32,61	2,89

\*\* Valores não calculados; DOXO = doxorrubicina (controle positivo).

Nas linhagens MCF-7, 786-0 e HT-29, a amostra mais seletiva foi SS3 com valores de IS iguais a 13,5; 9,15 e 4,02, respectivamente. A amostra mais seletiva para a linhagem PC-3 foi SC3 (IS=2,69), para NCI/ADR-RES foi SC1 (IS= 4,34) e para K-562, foi a SC3 (IS=32,61).

O extrato bruto de *S. selowii* (SSB) foi ativo em apenas duas linhagens estudadas, MCF-7 (IC<sub>50</sub>=29,4 µg/mL) e 786-0 (IC<sub>50</sub>=46,63 µg/mL). Também foi cinco

vezes mais seletivo para a primeira linhagem tumoral mencionada e três vezes para a segunda. As linhagens sensíveis à amostra SS1 foram: MCF-7 ( $IC_{50}=29,75 \mu\text{g/mL}$ ) e NCI/ADR-RES ( $IC_{50}=47,86 \mu\text{g/mL}$ ). Seus índices de seletividade não puderam ser calculados, pois a linhagem NHI/3T3 não apresentou sensibilidade nas concentrações testadas ( $IC_{50}>250\mu\text{g/mL}$ ). A SS2 corresponde a uma amostra altamente citotóxica em todas as linhagens testadas. Sendo ela mais seletiva para: 786-0 ( $IS=4,38$ ), MCF-7 ( $IS=4,34$ ), NCI/ADR-RES ( $IS=4,26$ ), HT-29 ( $IS=3,32$ ) e K-562 ( $IS=2,11$ ). As outras linhagens tumorais possuem sensibilidade a esta amostra semelhante (um pouco maior) à linhagem NHI/3T3.

Conforme mencionado anteriormente, a SS2 apresentou atividade tão potente quanto à doxorrubicina ( $2,62$  e  $2,45\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) na linhagem NCI/ADR-RES, e deve-se destacar que foi menos citotóxica para as células não tumorais NHI/3T3 do que o referido controle positivo ( $IC_{50}=11,17 \mu\text{g/mL}$  e  $0,55 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e, conseqüentemente, apresentou uma seletividade maior para esta linhagem tumoral ( $IS = 4,26$ ).

A fração SS3 que apresentou forte atividade citotóxica para a maioria das linhagens neoplásicas apresentou também altos valores de índice de seletividade nas linhagens MCF-7 ( $IS=13,55$ ), 786-0 ( $IS=9,15$ ), HT-29 ( $IS=4,02$ ) e K-562 ( $IS=4,63$ ), indicando que o isolamento de novos compostos a partir dessa espécie, poderá auxiliar na busca de novos fármacos menos citotóxicos para células normais.

O extrato SCB foi ativo somente para a linhagem MCF-7 ( $IC_{50}=41,57\mu\text{g/mL}$ ) e não foi citotóxico até a maior concentração testada em NHI/3T3 (linhagem de célula não tumoral). A fração SC1 foi ativa somente em MCF-7 ( $IC_{50}=32,95 \mu\text{g/mL}$ ) e apresentou-se com  $IS=7,52$  para esta linhagem.

A fração SC2 foi ativa para a maioria das linhagens tumorais exceto para HT-29 ( $IC_{50}= 187,9 \mu\text{g/mL}$ ). Para MCF-7 e K-562, a sua atividade citotóxica foi alta ( $IC_{50}=6,69\mu\text{g/mL}$  e  $IC_{50}=9,55\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Além de sua atividade antiproliferativa em células tumorais, ela foi pouco citotóxica na linhagem de células não tumorais. Entre as células que sofrem ação citotóxica dessa amostra, apenas NCI/ADR-RES possui sensibilidade a essa amostra semelhante à NHI/3T3 ( $IS=1,28$ ), as demais linhagens apresentam sensibilidade maior que a de NHI/3T3 para essa amostra ( $IS>2,0$ ).

A amostra SC3 apresentou alta atividade citotóxica em K-562 ( $IC_{50}=2,53$ ) e foi ativa em PC-3 ( $IC_{50}=30,65 \mu\text{g/mL}$ ) e NCI/ADR-RES ( $IC_{50}=43,65\mu\text{g/mL}$ ) e, otimizando ainda mais seu potencial anticâncer, sua citotoxicidade em NHI/3T3 foi baixa ( $IC_{50}=82,52 \mu\text{g/mL}$ ) com seletividade duas e trinta e duas vezes maior para PC-3 e K-562, respectivamente.

Neste estudo, as frações clorofórmica e acetato de etila apresentaram um aumento da atividade antiproliferativa em relação aos seus respectivos extratos brutos. Na espécie *Selaginella convoluta* a fração mais ativa foi a clorofórmica, exceto para linhagem K-562, na qual a fração acetato de etila foi mais ativa. A linhagem HT-29 não apresentou sensibilidade para as amostras dessa espécie ( $IC_{50}>50 \mu\text{g/mL}$ ). Para a espécie *Selaginella sellowii* a fração clorofórmica foi a mais ativa para as linhagens 786-0, PC-3, NCI/ADR-RES, K-562 e HT-29; para a linhagem MCF-7 a fração acetato de etila foi mais ativa.

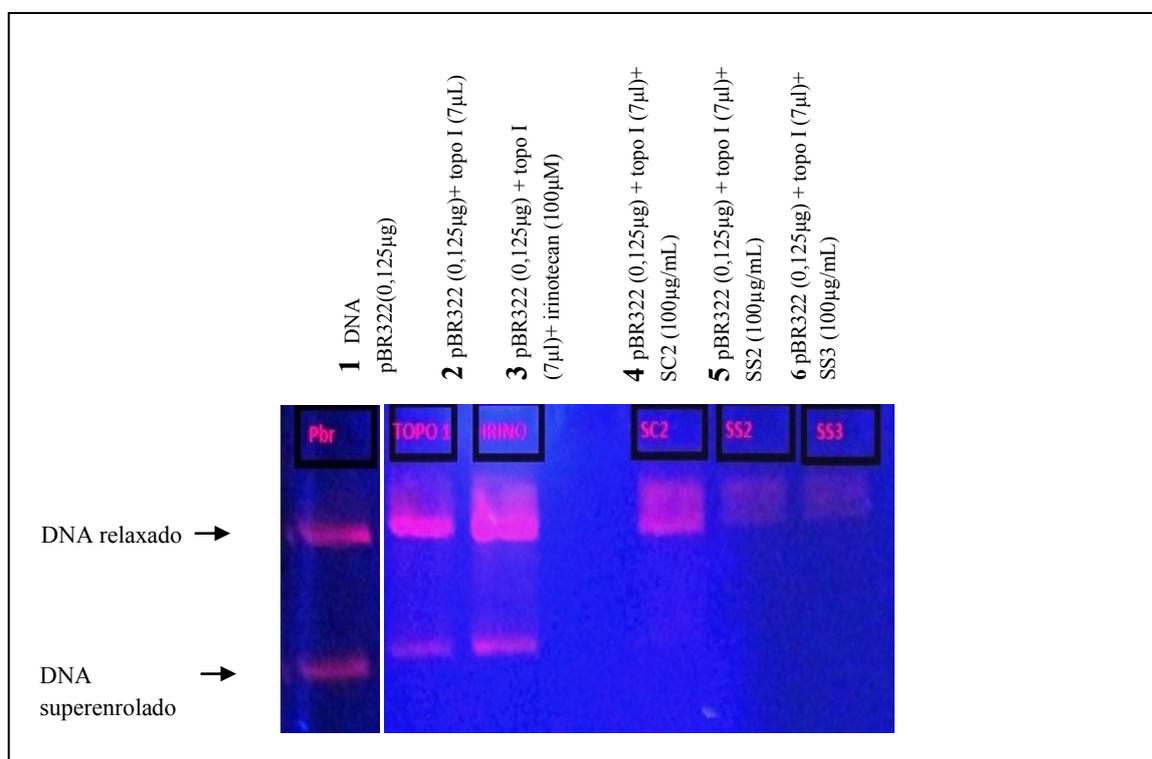
As amostras de extratos hidroetanólicos e frações hexânicas que foram ativas apresentaram seletividade para as células tumorais ( $IS>2,0$ ), mas as amostras ativas da fração clorofórmica e acetato de etila foram seletivas para algumas linhagens tumorais e para outras não ( $IS<2,0$ ), indicando que as mesmas amostras podem ser ao mesmo tempo tóxicas para linhagens tumorais e para a linhagem não tumoral NHI/3T3. O controle positivo (doxorubicina) também apresentou este último perfil, sendo seletiva para as linhagens MCF-7, 786-0, PC-3 e K-562; mas embora a doxorubicina apresente seletividade para as linhagens citadas, ela é extremamente citotóxica para NHI/3T3 ( $IC_{50}=0,55\mu\text{g/mL}$ ).

Estudos de citotoxicidade selecionam substâncias para que investigações mais aprofundadas sejam feitas na finalidade de descobrir os mecanismos de ação pelos quais elas agem dentro das células tumorais como: indução de apoptose; parada da célula em determinada fase no ciclo celular; inibição das vias de sinalização ou enzimas necessárias para a proliferação celular (BERDOWSKA *et al.*, 2013).

A interferência sobre a atividade da enzima topoisomerase consiste em um dos mecanismos de ação apresentado por alguns fármacos já amplamente utilizados na área clínica (etoposídeo, doxorubicina e irinotecan) e embora este mecanismo de ação seja muito estudado, ainda não há relatos literários sobre a inibição de topoisomerases para espécies do gênero *Selaginella*. Neste trabalho avaliamos se a fração clorofórmica de

*Selaginella convoluta* (SC2) e as frações clorofórmica e acetato de etila de *Selaginella sellowii* (SS2 e SS3, respectivamente), por serem citotóxicas nas linhagens tumorais, apresentam atividade inibitória das enzimas topoisomerase I e II (Figura 10 e 11). O estudo da inibição da atividade das enzimas topoisomerasas é muito importante na busca por novas substâncias anticâncer, já que a inibição da atividade dessas enzimas pode inibir a proliferação celular excessiva, causada pelo câncer.

Os resultados obtidos das amostras SC2, SS2 e SS3 sobre a ação inibitória de topoisomerase I estão apresentados na Figura 10.



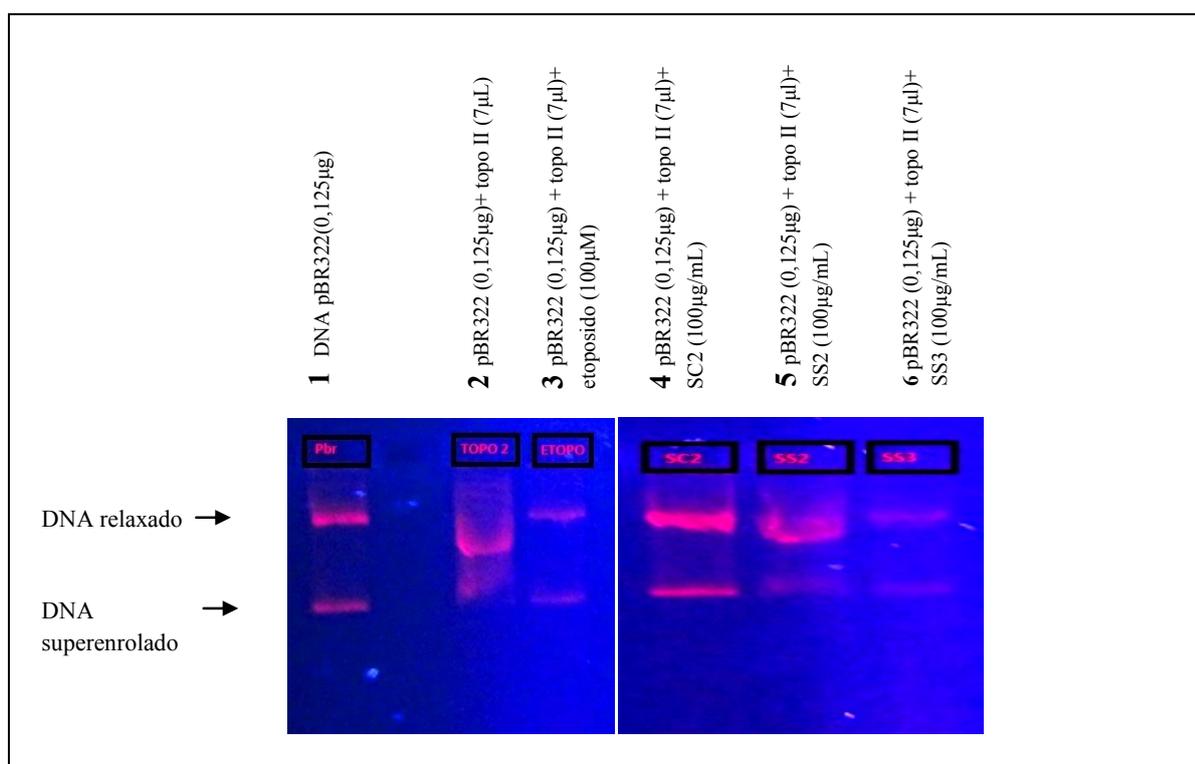
**Figura 10.** Gel de agarose 1% após eletroforese em tampão TBE. Estudo da atividade inibitória da enzima topoisomerase I pelas amostras SC2, SS2 e SS3. Em todas as linhas as amostras contêm 4 µL da reação-teste (exceto a coluna 1, que contém somente 0,125 µg de pBR322 – Controle negativo), 2 µL de blue juice® 10x e 2 µL de gel red. A coluna 2, contém o controle positivo com 0,125 µg pBR322 e 7 µL de EN contendo topoisomerase I; a coluna 3 contém 0,125 µg de pBR322, irinotecan e 7 µL de EN (topoisomerase I); coluna 4 com pBR322, topoisomerase I e SC2; a coluna 5 com pBR322, topoisomerase I e SS2 e; por último, a coluna 6 contendo pBR322, topoisomerase I e SS3.

Como representado na Figura 10 (coluna 1), o sulforodamina utilizado (pBR322), apresenta duas bandas marcadas no gel, a mais próxima da aplicação consiste no DNA relaxado, por ele ser maior e mais pesado, fica retido próximo à aplicação da amostra, pois não consegue passar pelas tramas do gel de agarose; o contrário acontece com o DNA superenovelado, que por ser de volume menor, consegue deslizar pelo gel, ficando em uma posição mais longe da aplicação.

A coluna número 2 representa a atividade enzimática da topoisomerase I, destaca-se nessa área uma forte marcação da banda de DNA relaxado (mostrando que a enzima está agindo normalmente) e na banda do DNA superenrolado, essa marcação é fraca e mais alta (o enovelado fica um pouco acima). Já na presença do controle positivo (irinotecan) existe a presença de DNA relaxado, porém, na banda de DNA superenrolado, a marcação está forte, demonstrando que a substância reagiu conforme o esperado, ou seja, inibindo a ação da topoI.

Pode-se observar que os resultados de ação das três amostras testadas apresentam somente a primeira banda marcada, indicando que não houve uma inibição do relaxamento do DNA, logo, não interferiu na ação da topo I. Ao contrário, a atividade das amostras-teste pareceu ser de sinergismo, pois apenas a banda de DNA relaxado aparece marcada no gel (a banda de DNA superenrolado desapareceu completamente).

A análise da atividade inibitória de topoisomerase II por SC2, SS2 e SS3 está apresentada na Figura 11.



**Figura 11.** Gel de agarose 1% após eletroforese em tampão TBE. Produtos da reação da enzima topoisomerase II com as amostras SC2, SS2 e SS3. Em todas as colunas as amostras contêm 4 µL da reação-teste (exceto a coluna 1, que contém somente 0,125 µg de pBR322 – Controle negativo), 2 µL de blue juice® 10x e 2 µL de gel red. A coluna 2, contém o controle positivo com 0,125 µg de pBR322 e 7 µL de EN contendo topoisomerase II; a coluna 3 contém 0,125 µg de pBR322, etoposido e 7 µL de EN (topoisomerase II); coluna 4 com pBR322, topoisomerase II e SC2; a coluna 5 com pBR322, topoisomerase II e SS2 e; por último, a coluna 6 contendo pBR322, topoisomerase II e SS3.

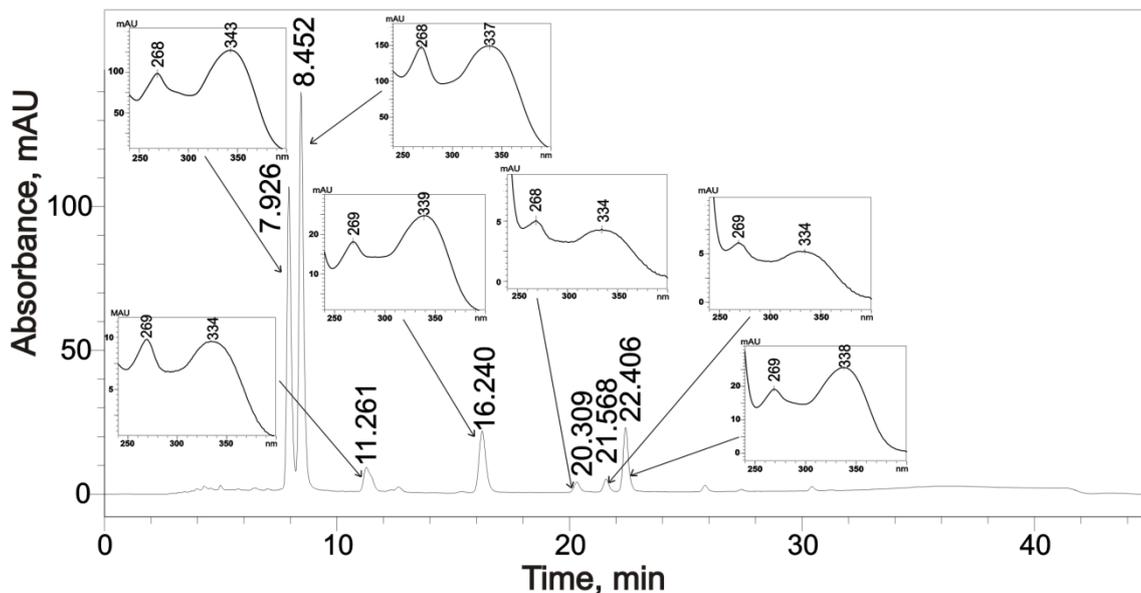
As amostras apresentaram diferentes maneiras de inibição da topo II. A amostra que melhor inibiu a ação enzimática foi a SS3, na sua reação observa-se que a banda de DNA relaxado está fracamente marcada, e a de DNA superenrolado aparece também marcada, se assemelhando muito ao controle positivo (etoposídeo). É possível que o principal mecanismo intracelular que cause uma alta citotoxicidade por essa fração seja a inibição da topoisomerase II, mas ainda existem mais avaliações, de outros mecanismos, que devem ser investigados, como: número e tempo de ligação da substância ao complexo de ligação topoisomerase II-DNA (NITISS, 2009).

A segunda melhor atividade inibitória foi da amostra SC2 que, embora a banda de DNA relaxado tenha aparecido fortemente marcada no gel, a banda de DNA superenrolado também está fortemente marcada, se assemelhando ao controle negativo (somente o pBR322). A amostra SS2, embora tenha aparecido com a banda de DNA relaxado fortemente marcada e a de DNA superenrolado com uma marcação mais fraca, apresentou a atividade inibitória da enzima, pois se comparada ao controle da topoII (Coluna 2) - que não apresenta a banda de DNA superenrolado marcada, essa amostra apresentou alguma atividade inibitória de topo II.

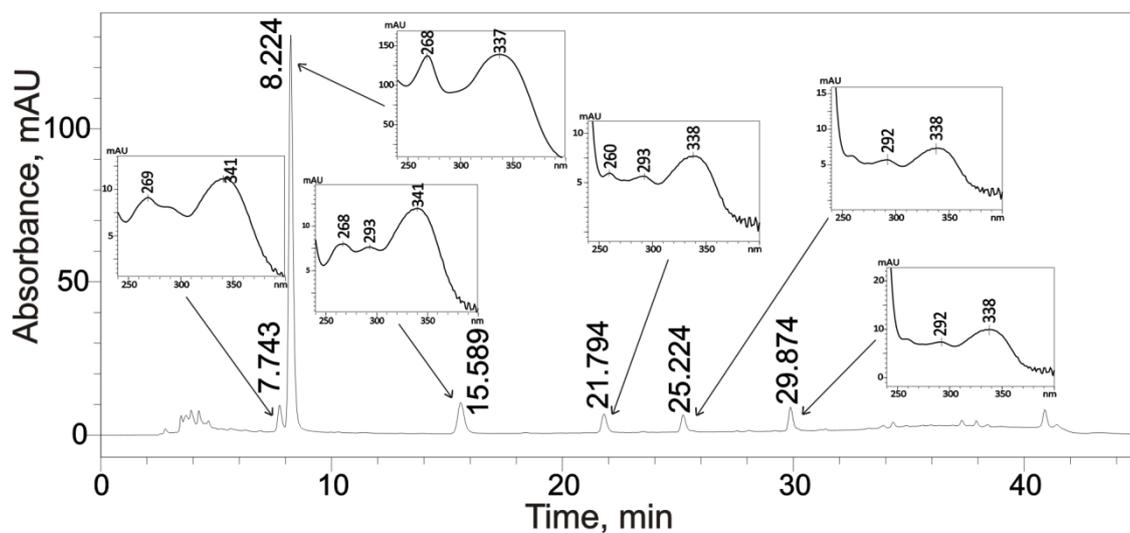
A enzima topoisomerase II atua em funções cruciais na replicação celular (replicação do DNA, transcrição e segregação cromossômica), drogas muito utilizadas na clínica, como doxorrubicina e o etoposídeo, atuam como venenos de topoisomerase II (NITISS, 2009), o que indica a grande importância do estudo de substâncias que apresentem esse mecanismo de ação.

Para as amostras que apresentaram forte atividade citotóxica, mas que não inibiram as topoisomerasas, é provável que possam agir por outros mecanismos intracelulares e que devem ser investigados no futuro como: inibição da enzima timidilato sintase; danos ao DNA; interferência na expressão de oncogenes; e genes supressores de tumor e apoptose.

As espécies vegetais do gênero *Selaginella* podem ser importantes para a descoberta de novos quimioterápicos; análises por meio de cromatografia líquida foram feitas com o objetivo de identificar as moléculas presentes nas frações acetato de etila das duas espécies para aprofundar os conhecimentos sobre a ação das substâncias presentes nessas espécies vegetais (Figuras 12 e 13).



**Figura 12.** Perfil cromatográfico em 325 nm e espectros de absorção UV (240-400nm) da fração acetato de etila da espécie *Selaginella sellowii* Hieron. Condições cromatográficas: eluição através de sistema gradiente linear a um fluxo de 0,8 mL/min, MeOH:ácido acético 1% (v/v, eluente B) e H<sub>2</sub>O:ácido acético 1% (v/v, eluente A), injeção 20 µL.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico em 325 nm e espectros de absorção UV (240-400nm) da fração acetato de etila da espécie *Selaginella convoluta* (Arn.)Spring. Condições cromatográficas: eluição através de sistema gradiente linear a um fluxo de 0,8 mL/min, MeOH:ácido acético 1% (v/v, eluente B) e H<sub>2</sub>O:ácido acético 1% (v/v, eluente A), injeção 20 µL.

Segundo Silva *et al.* (1995), substâncias como 4',7''-di-O-metil-amentoflavona e 7''-O-metil-robustoflavona, isoladas de espécies de *Selaginella*, mostraram-se ativas contra células humanas tumorais de mama, intestino, colon, próstata, fibrossarcoma, glibostoma, carcinoma epidermóide oral e leucemias. Segundo Setyawan (2011a), os

principais metabólitos secundários das espécies do gênero *Selaginella* são os flavonoides, mas as espécies desse gênero também apresentam alcalóides, taninos, saponinas e terpenoides e há ainda, a espécie *S. lepidophylla* que possui óleos voláteis em sua composição.

Os flavonoides constituem uma classe de aproximadamente quatro mil compostos fenólicos naturais presentes em diversos vegetais e frutas consumidos na alimentação humana, além de estar presente em algumas bebidas como vinho e chá (SIWAK *et al.*, 2013). Eles compõem o principal grupo de moléculas das plantas e, possuem atividades biológicas como: antibactericidas, antialérgicas, antitrombóticas, papel na prevenção de doenças cardíacas e câncer (BIESAGA, 2011). Essas diversas atividades ocorrem devido a propriedades antioxidantes por apresentar habilidade em eliminar espécies reativas ou influência nas reações de oxirredução; modulação nos sinais de transdução das vias de proliferação celular e angiogênese; influenciam em enzimas que participam da biossíntese de estrogênios e naquelas necessárias para a ativação metabólica de protooncogenes e desintoxicação de oncogenes (PICK *et al.*, 2011).

Os picos apresentados nos cromatogramas das figuras acima são característicos de flavonoides e foram caracterizados pelo espectro de U.V. e, segundo a quimiotaxonomia da família, provavelmente são biflavonoides. Estudos em andamento (FISHER, A.; dados não publicados) mostraram que a espécie *S.sellowii* apresentou uma predominância de flavonas no extrato hidroetanólico. No mesmo estudo da fração acetato de etila foram isolados os biflavonoides amentoflavona e hinokiflavona.

Devido aos flavonoides apresentarem as importantes propriedades biológicas já citadas anteriormente as duas espécies em questão são promissoras no estudo anticâncer e análises mais aprofundadas no intuito de isolar as principais moléculas responsáveis pela atividade antiproliferativa deverão ser realizadas.

## 6. CONCLUSÃO

A fração acetato de etila de *S.sellowii* (SS3) apresentou a mais forte atividade em células de carcinoma de mama (MCF-7) com IC<sub>50</sub> de 1,81µg/mL.

A fração clorofórmica (SS2), além da forte atividade em todas as linhagens testadas, apresentou atividade próxima ao controle positivo (Doxorrubicina) em células de leucemia mieloide crônica NCI/ADR-RES (2,62 µg/mL e 2,45 µg/mL, respectivamente) e foi seletiva para quase todas as linhagens tumorais estudadas (exceto para PC-3).

As frações clorofórmicas das espécies *S. convoluta* (SC2) e *S. sellowii* (SS2) e a fração acetato de etila de *S.sellowii* (SS3) apresentaram atividade inibitória sobre a enzima topoisomerase II humana.

A fração SS3 apresentou atividade antiproliferativa; alta seletividade em células neoplásicas (com IS de 4 a 13,5 vezes maior em células neoplásicas do que em células normais) e inibição de topoisomerase II.

As espécies de *Selaginella* avaliadas no presente trabalho demonstraram ser promissoras nos estudos anticâncer.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basílio, I.J.L.D.; Coelho, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383–395, 2007.

ALBERTS, B.; HOPKIN, J.; LEWIS, R.; ROBERTS, W. Comunidades Celulares: tecidos, células-tronco e câncer. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p.717-729, 2011.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S; MONTEIRO, J.M; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325–354, 2007.

ALSTON, A.H.G.; JERMY, A.C.; RANKIN, J.M. The genus *Selaginella* in tropical South America. **Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany**, v.9, p.233-330, 1981.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. Cultivo Celular. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. In: \_\_\_\_\_. Rio de Janeiro, RJ: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, 2010, p.215-253.

*American Type Culture Collectio* (ATCC). Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 2012.

ASSIS, E.L.M.; LABIAK, P.H. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.23, p.703-712, 2009.

BARROS, I.C.L.; ANDRADE, L.H.C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. In: \_\_\_\_\_. Recife, PE: Ed. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 1997.

BERDOWSKA, I.; ZIELINSKI, B.; FECKA, I.; KULBACKA, J.; SACZKO, J.; GAMIAN, A. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. **Food Chemistry**, v.141, p.1313-1321, 2013.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.2118, p.2505-2512, 2011.

BOLZANI, V.S.; VALLI, M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR., C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 84, p.1837–1846, 2012.

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

BURDEN, D.A; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p.139-154, 1998.

CAO, Y.; TAN, N.H.; CHEN, J.J.; ZENG, G.Z.; MA, Y.B.; WU, Y.P.; YAN, H.; YANG, J.; LU, L.F., WANG, Q. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. **Fitoterapia**, v.81, p.253-258, 2010.

CARVALHO, J.E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Revista MultiCiência**, n.7, p.1-18, 2006.

CHABNER, B.A.; ROBERTS, JR.T.G. Chemotherapy and War on Cancer. **Natural Reviews Cancer**, v.5, p.65-72, 2005.

CHAMPOUX, J.J. DNA Topoisomerases: Structure, Function and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.369-413, 2001.

CHEN, J.J.; DUH, C.Y.; CHEN, J.F. New Cytotoxic Biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Planta Medica**, v.71, p.659-665, 2005.

COSTA, R.B.; SALLES, A.T.; MOURA, H.H.S. Degradação de reservas florestais particulares e desenvolvimento sustentável em Mato Grosso do Sul. **Revista internacional em desenvolvimento local**, v.4, p.41-46, 2003.

DAVID, A. R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Natural Reviews Cancer**, v.3, p.1-5, 2010.

DE SÁ, P.G.; NUNES, X.P.; LIMA, J.T.; FILHO, J.A.S.; FONTANA, A.P.; SIQUEIRA, J.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, p.187-193, 2012.

DEVITA, JR.V.T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v.68, p.8643-8653, 2008.

EFFERTH, T. Personalized Cancer Medicine: From Molecular Diagnostics to Targeted Therapy with Natural Products. **Planta Medica**, v.76, p.1143–1154, 2010.

FARIA, D.H. Efeitos citotóxicos do Teniposide, um derivado semi-sintético das epipodofilotoxinas, sobre linhagens celulares de carcinoma renal humano (2000). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERLAY, J.; AUTIER, P.; BONIOL, M.; HEANUE, M.; COLOMBET, M.; BOYLE, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Annals of Oncology**, v.18, p.581–592, 2007.

FRESHNNEY, I.R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. In: \_\_\_\_\_. New York, Wiley-Liss, 2005.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.338–347, 2007.

GRIVICICH, I. A Importância da Sequencia de Administração do Irinotecan e 5-fluorouracil na Inibição da proliferação do carcinoma de cólon humano *in vitro* (1999). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HIRAI, R.Y.; PRADO, J. Selaginellaceae Willk. no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista brasileira de Botanica**, v.23, p.313-339, 2000.

HOLBECK, S.L. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, v.40, p.785–793, 2004.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C.C. The Sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377–387, 2007.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 2012.

IZZOTTI, A. Molecular medicine and development of cancer chemopreventive agents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1259, p.26–32, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. A Célula Cancerosa. In:\_\_\_\_. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.288- 297, 2005

KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, K. Why is cancer drug discovery so difficult? **Natural Reviews Drug Discovery**, v.6, p.115-120, 2007.

KELLNER, U.; RUDOLPH, P.; PARWARESCH, R. Human DNA topoisomerase diagnostic and therapeutic implications for cancer. **Onkologie**, v.23, p.424- 430, 2000.

KUNERT, O.; SWAMY, R.C.; KAISER, M.; PRESSER, A.; BUZZI, S.; RAO, A.V.N.A.; SCHÜHLY. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. **Phytochemistry Letters**, v.1, p.171–174, 2008.

LEE, J.; CHOI, Y.; WOO, E.R.; LEE, D.G. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.379, p.676–680, 2009.

LIN, L.C.; KUO, Y.C.; CHOU, C.J. Cytotoxic Biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.627-630, 2000.

LIU, H.; ZHAO, S.; ZHANG, Y.; WU, J.; PENG, H.; FAN, J.; LIAO, J. Reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE cells induced by *Selaginella doederleinii* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.138, p.184-191, 2011.

MA, S.C.; BUT, P.P.H.; OOI, V.E.C.; HE, Y.H.; LEE, S.H.S.; LEE, S.F.; LIN, R.C. Antiviral Amentoflavone from *Selaginell sinensis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.311-312, 2001.

MANOHARAN, S.; SINGH, R.B.; BALAKRISHNAN, S. Chemopreventive Mechanisms of Natural Products in Oral, Mamary and Skin Carcinogenesis: an Overview. **The Open Nutraceuticals Journal**, v.2, p.52-63, 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured

human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p.757-766, 1991.

MILLER, K.G.; LIU, L.F.; ENGLUND, P.T. A homogenous type II DNA topoisomerase from Hela cell nuclei. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, p.9334-9339, 1981.

MULLER, M.T.; SPITZNER, J.R.; DIDONATO, J.A.; MEHTA, V.B.; TSUTSUI, K.; TSUTSUI, K. Single-strand DNA cleavages by eukaryotic topoisomerase II. **Biochemistry** v.27, p. 8369-79, 1988.

*National Cancer Institute* (NCI). Disponível em: <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em: 2012.

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

Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 2012.

PAPAC, R.J. Origins of cancer therapy. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.74, p.391-398, 2001.

PICK, A.; MÜLLER, H.; MAYER, R.; HAENISCH, B.; PAJEVA, I.K.; WEIGT, M.; BÖNISCH, H.; MÜLLER, C.E.; WIESE, M. Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.2090-2102, 2011.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.L.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry and Biology**, v.17, p.421-433, 2010.

PRYER, K.M.; SCHNEIDER, H.; SMITH, A.R.; CRANFILL, R.; WOLF, P.G.; HUNT, J.S.; SIPES, S.D. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature**, v.409, p.618-622, 2001.

SANTOS, M.G.; CARVALHO, C.E.M.; KELECOM, A.; RIBEIRO, M.L.R.C.; FREITAS, C.V.C.; COSTA, L.M.; FERNANDES, L.V.G. Cianogênese em esporófitos de pteridófitas avaliada pelo teste do ácido pícrico. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p.783-788, 2005.

SETYAWAN, A.D. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). **Biodiversitas** v.3, p.44-58, 2011a.

SETYAWAN, A.D. Review: Recent status of *Selaginella* (Selaginellaceae) research in Nusantara. **Biodiversitas**, v.12, p.112-124, 2011b.

SILVA, G.L.; CHAI, H.; GUPTA, M.P.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; BEECHER, C.W.W.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic Biflavonoids From *Selaginella Willdenowii*. **Phytochemistry**, v.40, p.129-134, 1995.

SIWAK, J.; LEWINSKA, A.; WNUK, M.; BARTOSZ, G. Protection of flavonoids against hypochlorite-induced protein modifications. **Food Chemistry**, v.141, p.1227- 1241, 2013.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1107-11120, 1990.

STAFFORD, P.J. Selaginellaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.69, p.1-22, 1991.

STEWART, L.; REDINBO, M.R.; QIU, X.; HOL, W.G.J.; CHAMPOUX, J.J. A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. **Science**, v.279, p.1534-1541, 1998.

STRICKER, T.P.; KUMAR, V. Neoplasia. In:ROBBINS, S. et al. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8.ed. Rio de Janeiro, ELSEVIER, p.259-330, 2010.

SUFFNESS, S.M.; PEZZUTO, J.M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. Cap.4. In: **Methods of Plant Biochemistry**, v.9 (K. Hostettmann ed.). Academic Press, London, p.71-133, 1991.

SUN, C.M.; SYU, W.J.; HUANG, Y.T.; CHEN, C.C.; OU, J.C. Selective Cytotoxicity of Ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*. **Journal of Natural Products**, v.60, p.382-384, 1997.

TAN, D.S.W.; GERLINGER, M.; TEH, B.T.; SWANTON, C. Anti-cancer drug resistance: Understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. **European Journal of Cancer**, v.46, p.2166–2177, 2010.

TRASK, D.K.; DIDONATO, J.A.; MULLER, M.T. Rapid detection and isolation of covalent DNA/protein complexes: application to topoisomerase I and II. *EMBO Journal*, v.3, p.671-6, 1984.

TRYON, R.M.; TRYON, A.F. Ferns and Allied Plants with Special Reference to Tropical America. New York: Springer Verlag, 1982.

WANG, J.C. Interaction between DNA and *Escherichia coli* Protein  $\omega$ . **Journal of Molecular Biology**, v.55, p.523-533, 1971.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Cancer**. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

YANG, S.F.; CHU, S.C.; LIU, S.J.; CHEN, Y.C.; CHANG, Y.Z.; HSIEH, Y.S. Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.483–489, 2007.

ZHENG, X.K.; LI, Y.J; FENG, W.S.; ZHANG, X . Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.531–537, 2011.