

CAROLINE ALMEIDA FARIAS ALEXANDRINO

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DEPSIDONAS DE LIQUENS E EFEITO  
ANTITUMORAL EM MELANOMA EXPERIMENTAL MURINO

CAMPO GRANDE  
2017

CAROLINE ALMEIDA FARIAS ALEXANDRINO

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PSIDONAS DE LIQUENS E EFEITO  
ANTITUMORAL EM MELANOMA EXPERIMENTAL MURINO

Defesa apresentada como requisito para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo programa de Pós-  
graduação em Saúde e Desenvolvimento  
na Região Centro-Oeste da Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Bogo  
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de  
Fatima Cepa Matos

CAMPO GRANDE

2017

CAROLINE ALMEIDA FARIAS ALEXANDRINO

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DEPSIDONAS DE LIQUENS E EFEITO  
ANTITUMORAL EM MELANOMA EXPERIMENTAL MURINO

Defesa apresentada como requisito para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo programa de Pós-  
graduação em Saúde e Desenvolvimento  
na Região Centro-Oeste da Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito  
\_\_\_\_\_.

Campo Grande, 13 de julho de 2017

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

\_\_\_\_\_

Danielle Bogo – FACFAN – UFMS (presidente)

\_\_\_\_\_

Rita de Cássia Avellaneda Guimarães –FACFAN – UFMS

\_\_\_\_\_

Renata Perdomo Trentin – FACFAN – UFMS

\_\_\_\_\_

Karine de Cássia Freitas Gielow (suplente) – FACNFAN - UFMS

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu pai, meu melhor amigo. Ao longo desse período, o Senhor foi o meu porto seguro, minha fonte de força e fé. Como a Tua palavra diz “Estejam sempre alegres, orem sempre e sejam agradecidos a Deus em todas as ocasiões” (1 Tessalonicenses 5:18), eu só posso dizer: OBRIGADA, Pai! Minha vida é Tua, assim como tudo que faço e sou.

Ao meu marido, Vitor Alexandrino, seu amor, apoio, cumplicidade e compreensão foram fundamentais em todos os momentos dessa jornada, a você meu amor mais sincero.

Aos meus pais, Humberto e Lêda Farias pelos valores e princípios repassados, pelo incentivo ao longo da minha vida acadêmica e por torcerem pela minha evolução pessoal e profissional. Mãe, obrigada por todas as orações, elas me fortaleceram.

Aos meus irmãos, o exemplo de vocês me impulsiona e me incentiva a não parar.

À minha orientadora Profa Dra Danielle Bogo, agradeço por ter me aceitado como primeira “orientanda”, pela disponibilidade em partilhar experiências e por todos ensinamentos, por ser tão humana e compreensiva, por estimular meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos, por me acolher no Laboratório de Cultura de Células, sei o quanto a senhora batalhou para construí-lo e o quanto se dedica para fazê-lo produzir. Obrigada por todos os ensinamentos, desejo muito sucesso, sempre.

À Profa. Dra Neli Kika Honda, por ceder os compostos para realização deste trabalho, pelos ensinamentos incríveis, por sua sabedoria e calma durante nossas conversas e por toda ajuda na construção deste trabalho.

À Profa. Mônica Cristina Toffoli Kadri, por nos acolher no Laboratório de Farmacologia e Inflamação e pelos valiosos ensinamentos.

À Profa Dra Luciane Caneloro, pela parceria e ajuda com os estudos histopatológicos.

À Profa Renata Perdomo, pelos ensinamentos e ajuda com os experimentos na biologia molecular.

À minha parceira de experimentos em tempo integral, Magalli Costa Barbosa Lima e Silva, sua cumplicidade e apoio foram fundamentais na realização deste trabalho.

Às companheiras de laboratório, Alexsandra Paola, Indiara Pereira, Lana Herman, Kamyla Barbosa, Camilla Nantes, Claudia Stutz e Melissa Penha e à técnica Rosiane Tsujisaki, nunca esquecerei do auxílio que recebi de vocês, pelos favores prestados e pela convivência agradável que tivemos.

Às técnicas do LAC – Laboratório de Análises Clínicas da UFMS, Regina, Rita, Liliane e Débora, minha gratidão pelo trabalho que vocês desempenharam e por todo o auxílio durante esse período.

À farmacêutica Kelly Filipin por toda ajuda oferecida na realização dos experimentos e pelas palavras incentivadoras que recebi.

Ao aluno de iniciação científica Pedro Rafael Berquó de Souza pela parceria e dedicação durante os experimentos, desejo sucesso na sua vida profissional.

Ao Técnico Valter Silva, do Laboratório de Farmacologia e Inflamação pelo auxílio com os animais e por estar sempre a disposição para me ajudar no que preciso fosse.

À todos os animais, que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da pesquisa, meu respeito e muita gratidão.

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 à CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e todos os professores vinculados a ele.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

Como disse Clarisse Lispector "Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza chega mais longe." Foi com a ajuda e parceira de todos vocês que este trabalho nasceu!

À Deus, por meio dEle e para  
Ele são todas as coisas.

*"Quanto mais eu estudo a natureza, mais fico impressionado com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias."*

Louis Pasteur

## RESUMO

Líquens produzem inúmeras substâncias fenólicas das classes dos depsídeos, depsidonas, xantonas e outras. Essas substâncias têm apresentado inúmeras atividades biológicas entre as quais potencial atividade de inibição do crescimento de células tumorais. O melanoma é o câncer de pele mais agressivo apresentando elevado potencial metastático, responsável por 80% das mortes relacionadas a cânceres cutâneos. Este estudo avaliou a atividade antiproliferativa das depsidonas, ácidos hipostítico e salazínico, em linhagens celulares neoplásicas (B16-F10, PC-03, MCF7, HT-29, HepG2, K562 e 786), e a atividade antitumoral em melanoma experimental murino. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com o corante sulforrodamina B (nas linhagens aderentes) e MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (na linhagem não aderente, K562). O ácido hipostítico apresentou atividade antiproliferativa e seletividade significativas sobre células K562 ( $GI_{50}$  2,20  $\mu$ M, IS 95,95), B16-F10 ( $GI_{50}$  13,78  $\mu$ M, IS 15,44) e 786-0 ( $GI_{50}$  14,24  $\mu$ M e IS 14,85), enquanto que o ácido salazínico foi mais ativo para as células K562 ( $GI_{50}$  64,36  $\mu$ M, IS 15,87), HT-29 ( $GI_{50}$  67,91  $\mu$ M, IS 15,04), B16-F10 (78,64  $\mu$ M, IS 14,59). Também foi demonstrada indução de apoptose pelos compostos na linhagem celular B16-F10, em 24h e 48h (25  $\mu$ g/ml) e ambos os compostos apresentaram resultados significativos ( $p < 0,01$ ) comparados ao controle negativo, o ácido hipostítico induziu a apoptose em 22 e 82% das células e o ácido salazínico em 18 e 35%, em 24h e 48h respectivamente na concentração de 25  $\mu$ g/ml. A quantificação de caspase-3, por citometria de fluxo, revelou que tanto o ácido hipostítico quanto o salazínico não ativaram caspase-3. Na avaliação antitumoral *in vivo em* melanoma B16-F10 com camundongos BALB/c, os compostos inibiram o crescimento tumoral em relação ao peso e volume. O ácido hipostítico (16,7 mg/kg) foi capaz de inibir 72% e o ácido salazínico (33,3 mg/kg) 88% do volume dos tumores ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. No teste de toxicidade oral aguda (Guideline 423, OECD) o ácido hipostítico não promoveu sinais de toxicidade ou alterações comportamentais significativas nas doses de 50, 300 e 2000 mg/kg ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg), o ácido salazínico foi tóxico na dose de 2000 mg/kg (300 mg/kg  $< DL_{50} < 2000$  mg/kg). Os resultados indicam que, tanto no modelo *in vitro* quanto no *in vivo* de melanoma murino, os compostos avaliados apresentam atividade antiproliferativa e antitumoral.

**Palavras-chave:** atividade antiproliferativa, atividade antitumoral, depsidonas, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

Lichens produce numerous phenolic substances from the classes of depsids, depsidones, xanthenes and others. Such information relates to the limitations of biological activities including the activity of inhibiting the growth of tumor cells. Melanoma is the most aggressive skin cancer and presents high metastatic potential, accounting for 80% of skin cancer-related deaths. This study evaluated the antiproliferative activity of depsidones, hypostictic and salazinic acids in neoplastic cell lines (B16-F10, PC-03, MCF7, HT-29, HepG2, K562 and 786) and an antitumor activity in murine experimental melanoma. The cytotoxicity assay was performed with the dye sulforhodamine B (in the adherent strains) and MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (in the non-adherent strain K562). Hypostictic acid showed significant antiproliferative activity and selectivity on K562 (GI 50 2.20  $\mu$ M, SI 95.95), B16-F10 (GI 50 13.78  $\mu$ M, SI 15.44) and 786-0 (GI 50 14.24  $\mu$ M And SI 14.85), whereas salazinic acid was more active for K562 cells (GI 50 64.36  $\mu$ M, SI 15.87), HT-29 (GI 50 67.91  $\mu$ M, SI 15.04), B16-F10 (78.64  $\mu$ M, SI 14.59). Induction of apoptosis by the compounds in the B16-F10 cell line in 24h and 48h (25  $\mu$ g / ml) was shown to be significant ( $p < 0.01$ ) compared to the negative control, hypostictic acid induced apoptosis in 22 and 82% of the cells and the salazinic acid in 18 and 35%, respectively, to the incubation periods. The quantification of caspase-3 by flow cytometry revealed that the compounds did not lead to an increase in the expression of activated caspase-3. In the *in vivo* antitumor evaluation in B16-F10 melanoma with BALB/c mice, the compounds inhibited tumor growth in relation to weight and volume. Hypostictic acid (16.7 mg / kg) was able to inhibit 72% and salazinic acid (33.3 mg / kg) 88% of tumor volume ( $p < 0.05$ ). In the acute oral toxicity test hypostictic acid did not promote signs of toxicity or significant behavioral changes at doses of 50, 300 and 2000 mg / kg (LD<sub>50</sub> > 2000 mg / kg), salazinic acid was toxic at the dose of 2000 mg / kg (300 mg / kg < LD<sub>50</sub> < 2000 mg / kg). The results indicate that both, the *in vitro* and the *in vivo* murine melanoma models, the compounds of high antiproliferative and antitumor activity.

**Key words:** Antiproliferative activity, antitumor activity, depsidones, phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios da morfologia celular e tecidual antecedentes ao câncer.....	18
Figura 2 - Características do câncer de pele melanoma.....	20
Figura 3 - Estágios 0, I e II do melanoma.....	21
Figura 4 - Estágios III e IV do melanoma.....	22
Figura 5 - Representação das estruturas dos ácidos hipostítico e salazínico.....	30
Figura 6 - Representação da placa de 96 poços após adição das amostras-teste e Doxorrubicina (controle positivo).....	33
Figura 7 - Atividade antiproliferativa do ácido salazínico frente à linhagens de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/ml), durante 48h.....	43
Figura 8- Atividade antiproliferativa do ácido hipostítico frente às linhagens de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/ml), durante 48h.....	43
Figura 9 - Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico e doxorrubicina (0,025; 0,25; 2,5; 25 µg/ml) na morfologia de células B16-F10 após 24h e 48h de incubação.....	44
Figura 10 - Análise por citometria de fluxo da presença de caspase-3 ativa em células B16-F10 submetidas ou não a tratamento com os compostos testes.....	45
Figura 11 – Peso dos órgãos após teste de toxicidade oral dos ácidos hipostítico e salazínico.....	47
Figura 12 – Ácidos hipostítico e salazínico suprimem o crescimento tumoral de melanoma murino em camundongos BALB/c.....	48
Figura 13 - Efeito antitumoral do tratamento com ácido hipostítico e salazínico em modelo experimental murino.....	49
Figura 14 - Análise histológica dos rins dos grupos tratados, corados com hematoxilina-eosina.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.....	25
Tabela 2 - Atividades biológicas descritas para os ácidos salazínico e hipostítico.....	28
Tabela 3 - Valores de inibição de crescimento ( $GI_{50}$ )* e índice de seletividade (IS) dos ácidos hipostítico e salazínico e doxorrubicina em linhagens HT-29 (carcinoma de cólon), 786-0 (carcinoma de rim), MCF7 (carcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), PC-03 (carcinoma de próstata), B16-F10 (melanoma murino), K562 (leucemia mieloide crônica) e NIH/3T3 (fibroblasto murino).....	42
Tabela 4 – Evolução da massa corpórea e ganho ponderal, em camundongos machos, nos grupos controle e grupos tratados com as doses únicas de 50, 300 mg/kg de ácido salazínico e 50, 300 e 2000mg/kg de ácido hipostítico, na toxicidade oral aguda.....	47
Tabela 5 - Média do peso inicial e final dos animais dos grupos experimentais. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão.....	50
Tabela 6 - Resultados das análises em escore das avaliações histopatológicas do fígado e rim nos diferentes tratamentos.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Micrograma por mililitro
AHIP	Ácido hipostítico
ASAL	Ácido salazínico
CN	Controle Negativo
CPM	Câncer de Pele Melanoma
CPNM	Câncer de Pele Não Melanoma
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
FDA	Administração de Comidas e Remédios (Food and Drug Administration)
GI <sub>50</sub>	Inibição do crescimento de 50% das células (Growth inhibition of 50%)
HE	Hematoxilina-eosina
INCA	Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva
IS	Índice de seletividade
L-NAME	nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
mg/kg	Miligrama por quilograma
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}
NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (National Cancer Institute)
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato (phosphate buffered saline)
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio criado pelo Instituto Memorial Roswell Park ( <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> )
SFB	Soro Fetal Bovino

SRB	Sulforrodamina B
T0	Tempo zero
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Concentração que inibe 100% do crescimento celular (Total Growth Inhibition)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UV	Ultra violeta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Câncer .....	17
2.1.1 Câncer de pele .....	19
2.2 Apoptose .....	23
2.2.1 Caspase .....	24
2.3 Produtos naturais .....	24
2.3.1 Líquens .....	26
3 OBJETIVOS .....	29
3.1. Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Material botânico .....	30
4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> .....	30
4.2.1 Preparo das amostras-teste .....	31
4.2.2 Testes de citotoxicidade .....	31
4.2.2.1 Sulforrodamina B (SRB) .....	31
4.2.2.2 Sal de Tetrazólio (MTT) .....	33
4.2.3 Índice de Seletividade .....	34
4.3 Avaliação morfológica .....	35
4.4 Caspase-3 .....	35
4.5 Toxicidade oral aguda .....	36
4.6 Avaliação da atividade anticâncer .....	37
4.6.1 Critérios éticos .....	37
4.6.2 Protocolo experimental .....	37
4.6.2.1 Doses pré-estabelecidas .....	37
4.6.3.2 Desenvolvimento do melanoma experimental murino .....	38
4.6.4 Avaliação histológica .....	39
4.7 Análise dos dados .....	40
5. RESULTADOS .....	41
5.1 Efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> .....	41
5.2 Efeito dos ácidos hipostítico e salaziníco sobre a morfologia das células .....	44

<b>5.3 Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico na ativação de caspase-3.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5 Teste de Toxicidade Aguda dos ácidos hipostítico e salazínico .....</b>	<b>46</b>
<b>5.4 Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico antitumoral in vivo.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4.1 Efeito do tratamento com os ácidos hipostítico e salazínico sobre o peso do animais.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4.3 Efeitos do tratamento com os ácidos hipostítico e salazínico sobre a análise histopatológica do fígado e rins .....</b>	<b>50</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte em todo o mundo. A estimativa para as próximas duas décadas é de 22 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, dos quais 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (NCI, 2015). O tema tem despertado o interesse no desenvolvimento de novos fármacos e a busca por agentes anticâncer tem aumentado nos últimos anos (NEWMAN; CRAGG, 2012)

O câncer de pele é considerado um eminente problema de saúde pública global, é a neoplasia maligna mais comum a nível mundial e sua incidência é crescente em todas as etnias, regiões geográficas e faixas etárias (GORDON, 2013). No Brasil, 25% de todos os tumores malignos registrados são de câncer de pele (INCA, 2015). O melanoma representa 4% do total dos cânceres cutâneos, sendo menos frequente que os carcinomas basocelular e epidermóide. Embora apresente baixa incidência, o melanoma é responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele (EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014; INCA, 2015).

Os produtos naturais e seus análogos constituem uma parte significativa na busca por agentes anticâncer, pois a maioria dos fármacos utilizados no arsenal terapêutico contra o câncer é proveniente de fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2012; MONDAL et al., 2012; BISHAYEE; SETHI, 2016).

Os líquens são fontes potenciais de compostos biologicamente ativos, com mais de 1.000 compostos do metabolismo secundário já identificados (CHAPMAN, 2009; MITROVIĆ et al., 2011; SHRESTHA; CLAIR, 2013).

A fim de contribuir para o conhecimento de novos modelos estruturais como potenciais fármacos com ação antitumoral, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de avaliar a ação antiproliferativa das depsídonas ácido hipostítico (AHIP) e ácido salazínico (ASAL) nas linhagens neoplásicas B16-F10, PC-03, MCF7, HT-29, HepG2, K562 e 786, a indução de apoptose e ativação de caspase-3, assim como o efeito antitumoral sobre o melanoma experimental murino em camundongos BALB/c.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer

Câncer é a denominação para um conjunto de doenças que possuem como característica comum o crescimento rápido e desordenado de células e resistência à morte celular, com capacidade de invadir tecidos adjacentes, originando tumores malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Atualmente, é uma das doenças mais estudadas por ser considerado um problema de saúde pública e apresentar relevância pelo perfil epidemiológico, especialmente nos países em desenvolvimento, com isso, o tema tem despertado o interesse urgente no desenvolvimento de novos fármacos com ação anticancerígena (INCA, 2015).

Em 2012 ocorreram aproximadamente 8,2 milhões de mortes de um total de 14 milhões de novos casos de câncer no mundo, estima-se que em 2030, o número de novos casos seja na ordem de 21 milhões, dos quais 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015; NCI, 2015). No Brasil, as estimativas para o biênio 2016/2017 preveem a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2015).

O câncer surge de uma série de mudanças genéticas e epigenéticas geralmente associadas ao DNA que influenciam a expressão gênica. As células cancerígenas apresentam perda de função, proliferação incontrolada, elevada capacidade de invasão dos tecidos adjacentes e metástases (NCI, 2015). Como ilustrado na figura 1, antes que as células neoplásicas se formem nos tecidos corporais, elas passam por alterações anormais chamadas hiperplasia e displasia. A divisão celular acelerada e o acúmulo de células extras sem alterações morfológicas caracteriza a hiperplasia. A displasia é o estágio posterior, no qual as células extras apresentam alterações morfológicas influenciando na organização tecidual. Em geral, quanto mais anormais as células e os tecidos se apresentem, maior a probabilidade da formação do câncer (NCI, 2015).

Os fatores que desencadeiam o câncer são variados, podem ser de origem endógena ou exógena ao organismo, e em alguns casos esses fatores se inter-relacionam. As causas endógenas são aquelas geneticamente pré-determinadas, relacionada à capacidade que o organismo tem de se defender das agressões

externas. Já as causas exógenas são relacionadas ao ambiente social e cultural, meio ambiente e aos hábitos que variam de pessoa para pessoa. Com a interação desses fatores, há maior probabilidade de células normais se tornarem malignas, devido a isso o câncer se enquadra como uma enfermidade multicausal (SONDAK et al., 2004).

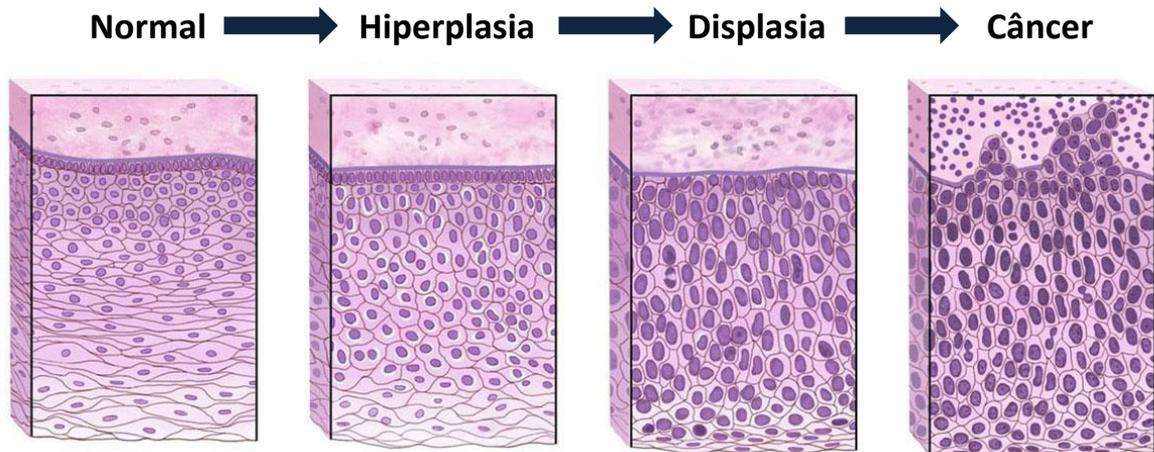


Figura 1 - Estágios da morfologia celular e tecidual antecedentes ao câncer. Fonte: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>

O tratamento do câncer baseia-se na remoção cirúrgica dos tumores e protocolos de quimioterapia e/ou tratamento radioterápico. Ainda existem diversos tipos de câncer sem tratamento específico além de uma estreita janela terapêutica devido aos efeitos adversos, resistência farmacológica e baixa seletividade dos fármacos às células neoplásicas, o que eleva o risco de toxicidade advinda do tratamento. Em estágios avançados da doença, é comum a interrupção do tratamento, pois os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios e o aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (KAMB, 2005; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Assim, há a necessidade por métodos alternativos, terapêuticas mais eficientes e seletivas às células neoplásicas que atuem em diferentes alvos a fim de compor melhores protocolos terapêuticos voltados ao tratamento do câncer (DEMAIN; VAISHNAV, 2010).

### **2.1.1 Câncer de pele**

O câncer de pele é o tipo mais frequente de neoplasia em todo o mundo (DIEPGEN et al., 2012), é mais incidente na população branca, com mais de um milhão de casos detectados a cada ano (SIMÕES; SOUZA; PAIS, 2015). A incidência de câncer de pele aumenta significativamente com a idade, refletindo, possivelmente, a longa latência entre a exposição ao carcinógeno e o estabelecimento de câncer (D'ORAZIO et al., 2013). A estimativa para o ano de 2016 no Brasil é de aproximadamente 175 mil casos de câncer de pele não melanoma e 5.670 mil casos de câncer de pele melanoma (INCA, 2015). Nos EUA estima-se aproximadamente 87 mil novos casos de melanoma e 9.730 mortes por esse tipo de câncer no ano de 2017 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Este tipo de câncer se apresenta basicamente sob duas formas: câncer de pele melanoma (CPM) e câncer de pele não melanoma (CPNM). O CPNM é o tipo mais incidente, enquanto o CPM apresenta baixa incidência, porém elevada letalidade (INCA, 2015). O CPM é uma neoplasia maligna oriunda da proliferação descontrolada dos melanócitos, que são células dendríticas localizadas na camada basal da epiderme. Teorias de progressão tumoral mostram que o melanoma se origina de melanócitos que sofreram hiperplasia e posteriormente displasia, evoluindo para neoplasia (BRECHTBÜHL, 2014). O CPM apresenta características específicas da lesão (figura 2): assimetria, bordas irregulares, variação de cor e diâmetro aumentado (NCI, 2016).

O CPM é o mais agressivo tipo de câncer de pele e apresenta prognóstico ruim na fase metastática. Quando diagnosticado no estágio inicial, o tratamento do CPM é por remoção cirurgica do tumor, sem a necessidade de tratamento com quimioterápicos (SIMÕES; SOUZA; PAIS, 2015). No entanto, o CPM tem alto potencial metastático e em fases avançadas os tratamentos quimioterápicos disponíveis, muitas vezes, não são eficazes e a imunoterapia, embora seja promissora, está na fase inicial de desenvolvimento, portanto novos agentes eficazes no tratamento do melanoma são altamente necessário (DE AZEVEDO et al., 2015)



Figura 2. Características do câncer de pele melanoma. Fonte: <[https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq#cit/section\\_1.1](https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq#cit/section_1.1)>

A radiação ultravioleta (UV) A e B contribui para o desenvolvimento de qualquer tipo de câncer de pele, dentre eles o melanoma; Cerca de 80% dos casos de melanoma estão associados a essa exposição, principalmente em caucasianos e/ou pele com múltiplas sardas (CEBALLOS et al., 2014; INCA, 2015). Exposições a poluentes, produtos químicos, tabagismo, exposição a radiações UV artificiais (como bronzeamento artificial), cor da pele e envelhecimento também são fatores de risco atribuíveis (SIMÕES; SOUZA; PAIS, 2015). Além disso, histórico familiar de melanoma ou melanoma prévio também se relaciona com o aumento no risco de desenvolver esse tipo de câncer (INCA, 2015).

O câncer de pele é detectado através de um exame na pele, realizado por um profissional habilitado, onde manchas anormais são avaliadas quanto às características (cor, tamanho, forma ou textura) e se necessário são encaminhadas para biopsia parte ou toda a lesão de aspecto anormal é retirada e analisada por um patologista (NCI, 2016).

Após o diagnóstico, são realizados exames a fim de determinar o estágio da doença (0 – IV), são avaliados sinais da doença, hábitos de vida do paciente, doenças progressas e tratamentos realizados. Além disso, é realizado o mapeamento de linfonodos e biópsia de linfonodo sentinela além de um exame de imagem como tomografia computadorizada da região do tronco, tomografia de emissão de pósitrons (*PET scan*) ou ressonância magnética nuclear. Os resultados

destes exames são vistos em conjunto com os resultados da biópsia de tumor para descobrir o estágio do melanoma (NCI, 2017).

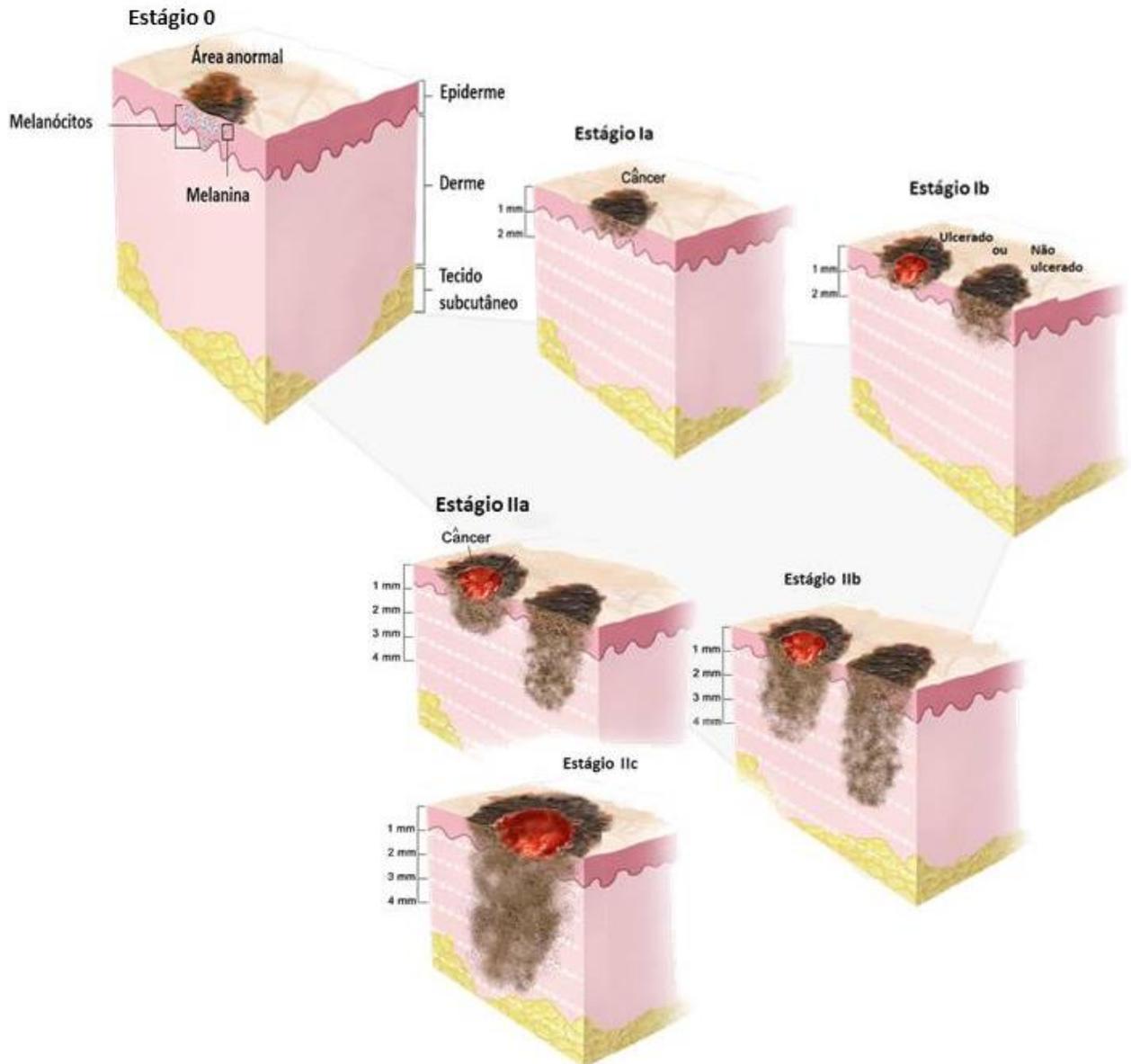


Figura 3. Estágios 0, I e II do melanoma. Adaptado de: [https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#section/\\_96](https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#section/_96)

O estágio 0 (zero) é classificado como melanoma *in situ*, onde são encontrados melanócitos anormais na epiderme, podendo evoluir para um câncer e se espalhar para o tecido normal próximo. Os estágios I e II são subdivididos e classificados de acordo com o tamanho e/ou presença de ulceração (figura 3). No estágio III, o tumor pode ter qualquer espessura, com ou sem ulceração e atingir um ou mais gânglios linfáticos, enquanto que no estágio IV o câncer já atingiu outras

partes do corpo, como o cérebro, pulmão, fígado, linfonodos, intestino delgado e osso (Figura 4) (NCI, 2017).

Para tratamento do câncer de pele, o padrão-ouro é a excisão cirúrgica (NCI, 2016), nos EUA o protocolo utilizado é a excisão com margens de 5 mm da lesão. A radioterapia é pouco utilizada, classificada como uma terapêutica de segunda linha se a cirurgia não for indicada (ERICKSON; MILLER, 2010). O tratamento com interferon alfa pode ser indicado para pacientes com melanoma em estágio II e III como terapia adjuvante, apesar de estar associado à elevada toxicidade. Na ausência de opções cirúrgicas, o tratamento sistêmico é indicado, para alguns pacientes metastáticos, a quimioterapia sistêmica (dacarbazina, temozolomida ou carboplatina / paclitaxel) continua a desempenhar um papel importante (SIMÕES et al., 2015).

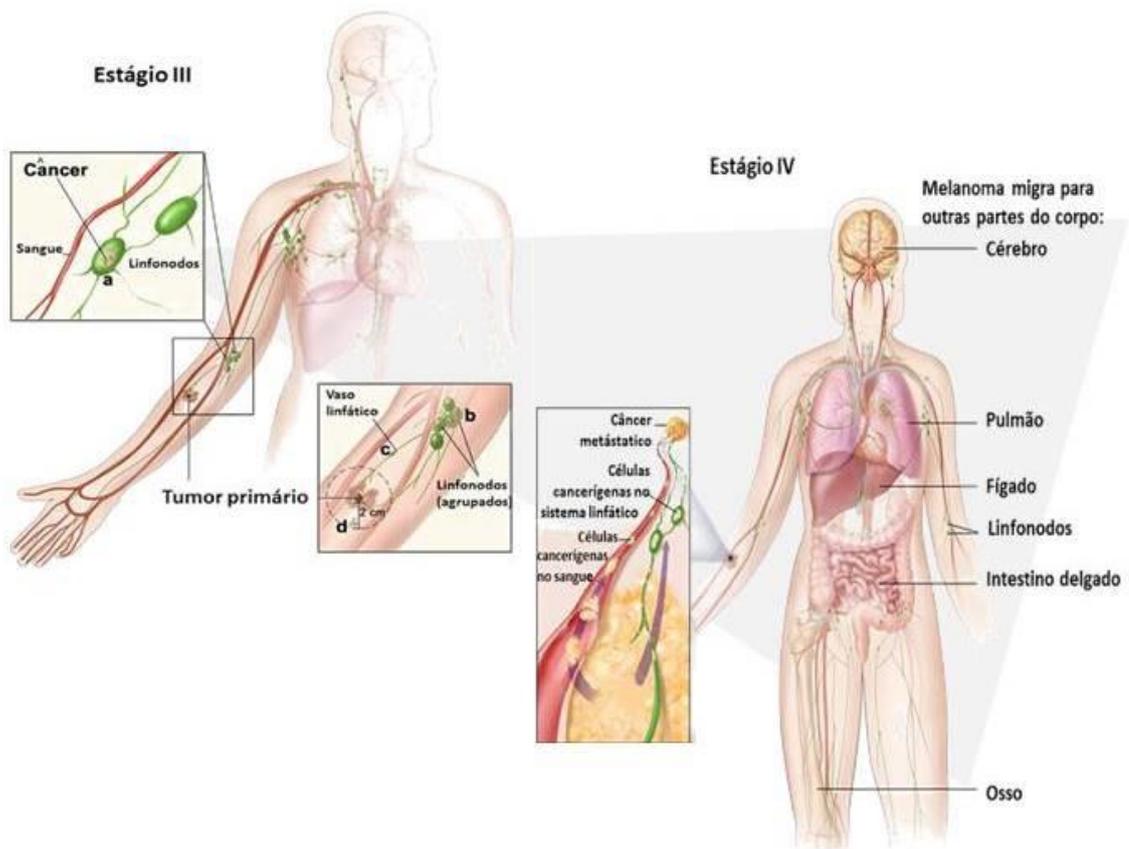


Figura 4 - Estágios III e IV do melanoma. Adaptado de: [https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#section/\\_96](https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq#section/_96)

## 2.2 Apoptose

O processo de morte celular é vital para a manutenção de desenvolvimento dos seres vivos. Apoptose foi um termo introduzido em 1972 para identificar um modelo de morte celular envolvido na regulação do desenvolvimento embrionário e da função imunológica, na supressão tumoral e na manutenção da homeostase (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WALSH, 2014, LARSEN; SORENSEN, 2016).

As vias de morte celular mais conhecidas e estudadas são: autofagia, apoptose e necrose (GALLUZZI et. al., 2012). Alterações na coordenação dessas vias resultam em doenças, assim como a imortalização das células e na tumorigênese (BLANK; SHILOH, 2007).

A apoptose pode ocorrer por meio da ligação de receptor de morte (via do receptor) na membrana plasmática ou na mitocôndria (via mitocondrial). A externalização de fosfatidilserina da membrana plasmática permite a caracterização da apoptose, além de ser um processo de morte celular que requer a ativação e a execução de uma série de moléculas reguladoras (HENRY, HOLLVILLE ; MARTIN, 2013). As células apoptóticas apresentam condensação do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; WYLLIE, 1997).

A apoptose está intimamente relacionada aos tumores malignos, pois estes exibem um perfil de resistência à morte celular. Essa resistência pode estar relacionada ação dos Inibidores da Apoptose (IAP), genes que podem estar superexpressos em linhagens de células cancerígenas e tumores primários (SCHIMMER, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

No câncer, a proliferação celular é desregulada e a inibição do processo apoptótico é alterada, resultando no desenvolvimento tumoral. Portanto, descobertas sobre a apoptose são de extrema importância na pesquisa para o tratamento dos tumores. A possibilidade de ativar a morte celular programada em células com divisão anormal para que elas se autodestruam pode se tornar um tratamento efetivo nos diversos tipos de câncer (BÁNFALVI, 2009).

A indução de morte por apoptose por meio de um sinal externo é um dos focos na busca por novas terapias contra o câncer (BROKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; FADEEL; ORRENIUS, 2005).

### **2.2.1 Caspase**

A denominação caspase refere-se a proteases aspartato-específicas essenciais para a execução do processo apoptótico (FERRARO-PEYRET et. al., 2002). Essas enzimas são sintetizadas como precursores inativos e encontram-se no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

Os processos mediados por caspases geram moléculas de sinalização que participam dos mecanismos de apoptose e inflamação (MCILWAIN; BERGER, MAK, 2013). As caspases sinalizam a apoptose ao clivar substratos que contenham resíduos de aspartato, causando a condensação, fragmentação nuclear e a externalização de fosfolípídios de membrana que irão sinalizar para que as células sejam fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

As caspases são classificadas por seus papéis desempenhados na apoptose (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10) e na inflamação (Caspase-1, -4, -5, -12). No processo de apoptose as caspases são divididas em caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) envolvidas na inicialização da morte celular, e em caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) envolvidas na execução da morte celular (MCILWAIN; BERGER, MAK, 2013).

As vias de sinalização da apoptose podem ser iniciadas por meio da ligação de receptor de morte (via do receptor) na membrana plasmática ou na mitocôndria (via mitocondrial). O estímulo aos receptores de morte celular na superfície das células transmitem sinais ao interior destas e ativa as caspases iniciadoras; YUAN, 2008). A via mitocondrial é induzida por danos celulares como dano ao DNA e liberação de moléculas apoptóticas mitocondriais que levam à ativação da caspase-9 e regulação das executoras (SAELENS et al., 2004).

### **2.3 Produtos naturais**

Nas últimas décadas, os produtos naturais têm desempenhado um papel de liderança no desenvolvimento de novos fármacos (GULLO et al., 2006; AMIRKIA; HEINRICH, 2015). Nesse contexto, moléculas bioativas extraídas de diversas fontes naturais, isto é, plantas e microrganismos, são relevantes no tratamento e prevenção de doenças humanas (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

Na busca por produtos de fontes naturais, extratos, frações e moléculas têm sido avaliados quanto à atividade biológica, e de fato novos princípios ativos estão sendo descobertos (ALVES et al., 2014). O desenvolvimento da biologia molecular e dos métodos analíticos permitem avaliações estruturais mais detalhadas e criam oportunidades valiosas para os estudos de produtos naturais (OLIVEIRA et al., 2013). Pesquisas envolvendo expressão gênica, vias de sinalização e alvos moleculares de fitoquímicos visam identificar moléculas promissoras no tratamento oncológico (BISHAYEE ; SETHI, 2016).

No século XX houve um avanço na pesquisa com produtos naturais, em especial plantas e microrganismos (PINTO et al., 2002). Entre os anos de 1981 e 2010, do total de 1.073 novos medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para diferentes tratamentos, 64% foram moléculas naturais, derivadas ou sintetizadas com base em compostos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Na área da oncologia, diversas substâncias foram descobertas e novos fármacos foram introduzidos nos protocolos terapêuticos (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

<b>Fármacos</b>	<b>Fonte</b>	<b>Alvo Molecular</b>	<b>Indicação terapêutica</b>
Vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel e docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina Etoposídeoeteniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda
Camptotecina Irinotecano Topotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon

Fonte: COSTA-LOTUFO et al., 2010

A revisão publicada por Newman e Cragg em 2016, afirma que no tratamento do câncer, até 2014, das 136 moléculas descobertas, aproximadamente 83% foram provenientes de produtos naturais ou baseadas nestes. Os autores defendem que os produtos naturais possuem um papel dominante no desenvolvimento de fármacos e que ainda há um "tesouro de pequenas moléculas" na natureza para explorar, particularmente nos ambientes marinhos e microbianos.

Estudos recentes avaliaram compostos de origem natural quanto à capacidade quimiopreventiva e quimioterápica, os autores destacaram importância de compostos naturais tanto na prevenção e terapia do câncer (KALLIFATIDIS et al., 2016; SYED et al., 2016). Algas, fungos, líquens e plantas representam fontes promissoras para pesquisas de novas moléculas bioativas (CRAGG; NEWMAN, 2005; SHRESTHA; CLAIR, 2013).

### **2.3.1 Líquens**

Os líquens são constituídos por uma associação simbiótica de um fungo (micobionte) com um parceiro fotossintético (fitobionte), geralmente alga ou cianobactéria. Estima-se que há aproximadamente 25.000 espécies de líquens (SRI-INDRASUTDHI, 2005; CHAPMAN, 2009) e 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 e são capazes de sobreviver em situações de estresse ecológico por meio de dessecação e interrupção da fotossíntese (KOSUGI et al., 2009; SHUKLA et al., 2010).

Estes se desenvolvem sobre os mais variados substratos, sendo que muitos não apresentam especificidade: existem espécies que somente se desenvolvem sobre córtex de árvores, outras sobre folhas e outras sobre rochas alcalinas ou ácidas, necessitando ou não das características físicas como rugosidade, porosidade, dureza, exposição à luz. Há outras, ainda, mais exigentes quanto ao pH do substrato, presença de partículas no ar, umidade, ventos e temperatura. Portanto, a presença de líquens nos mais variados habitats depende da disponibilidade de fatores físicos e climáticos que proporcionem as condições necessárias para que estes se desenvolvam. Dessa forma, cada região pode apresentar uma comunidade

liquênica com componentes específicos próprios em resposta às condições ambientais (BRODO; AHMADJIAN; HALE, 1973).

A maior parte das substâncias isoladas de líquens são compostos fenólicos das classes do orcinol e B-orcinol; dibenzofuranos; depsídeos; depsídonas; quinonas e derivados do ácido pulvínico (SHUKLA et al., 2010).

Os líquens são considerados fonte potencial de novos compostos biologicamente ativos (CHAPMAN, 2009; STOJANOVIC et al., 2012; ZAMBARE; CHRISTOPHER, 2012) e já foram estudados quanto à atividade antibiótica, antimicótica, antiviral, antitumoral, antioxidante, entre outras (MITROVIĆ et al., 2011).

Os estudos com líquens realizados na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul vêm contribuindo para a descoberta de substâncias quanto a sua estrutura e diferentes atividades biológicas: antioxidante (HONDA et al., 2015), antimicobacteriana (HONDA et al., 2010, MICHELETTI et al., 2013), antimicrobiana (GOMES et al., 2003, MICHELETTI et al., 2009; 2011) atividade sobre a enzima tirosinase e artemia salina (Honda et al., 2016), antigenotóxica (GUTERRES et al., 2017), citototóxica (GOMES et al., 2006; MICHELETTI et al., 2009; 2011; BRANDÃO et al., 2013)

Para os ácidos hipostítico e salazínico também já foram atribuídas algumas atividades biológicas (tabela 2)

Tabela 2. Atividades biológicas descritas para os ácidos salazínico e hipostítico.

<b>Substância</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referências</b>
<b>Ácido salazínico</b>	Antimicrobiana	INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998; TÜRK et al., 2003; MICHELETTI et al., 2009; HONDA et al, 2010; SWATHI et al., 2010
	Antioxidante	MANOJLOVIĆ et al., 2012; VERMA; BEHERA; JOSHI, 2012; DE PAZ et al., 2013 HONDA et al. 2015
	Antiproliferativa	CORRECHE et al., 2002; BURLANDO et al, 2009 MICHELETTI et al., 2009
	Inibição da integrase do HIV-1	NEAMATI et al., 1997
<b>Ácido hipostítico</b>	Antigenotóxica	GUTERRES et al. 2017
	Antimicobacteriana	HONDA et al., 2010
	Antioxidante	HONDA et al. 2015

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiproliferativa dos ácidos hipotístico e salazínico e efeito antitumoral em melanoma experimental murino.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos ácidos hipotístico e salazínico nas linhagens celulares: B16-F10, MCF7, 786-0, PC-03, HT-29, HepG2, K562 e atividade citotóxica em NIH/3T3;

Determinar a seletividade do ácido hipotístico e salazínico;

Avaliar a indução de apoptose em células B16-F10 por meio de alterações morfológicas nas células após tratamento com ácidos salazínico e hipotístico;

Investigar a participação dos compostos na via das caspases por meio da quantificação de células com caspase-3 ativada;

Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* dos ácidos hipotístico e salazínico sobre o melanoma B16-F10 em camundongos BALB/c;

Avaliar a toxicidade aguda dos ácidos hipotístico e salazínico em camundongos Swiss.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material botânico

As depsídonas, ácidos hipostítico e salazínico (Figura 5), foram cedidas pela Profa. Dra. Neli K. Honda do Laboratório de Pesquisa LP2 do Instituto de Química (INQUI) da UFMS.

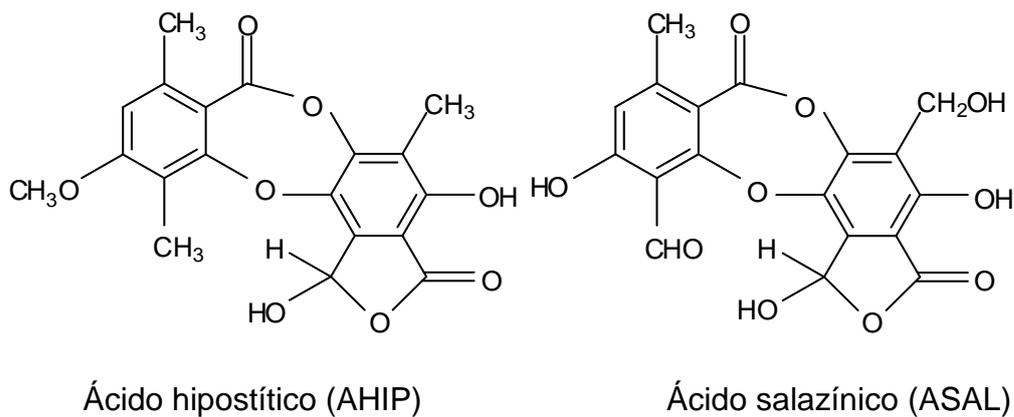


Figura 5 - Representação das estruturas dos ácidos hipostítico e salazínico

### 4.2 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células neoplásicas: B16-F10 (ATCC - CRL-6475, melanoma murino), MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama), 786-0 (ATCC - CRL-1932, carcinoma de rim), PC-03 (ATCC - CRL 1435, carcinoma de próstata), HT-29 (ATCC HTB-38 carcinoma de cólon), HepG2 (ATCC HB-8065, carcinoma hepatocelular) e K562 (ATCC CCL-243, leucemia mieloide crônica) doadas pelo Professor Dr. João Ernesto de Carvalho Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) UNICAMP. Também foi utilizada uma linhagem de células normais, NIH/3T3 (ATCC–CRL 1658, fibroblasto murino) adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro para a determinação do Índice de Seletividade (BÉZIVIN et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

As células, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C), foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para um tubo cônico de 15ml, contendo 9 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ou

RPMI (Roswell Park Memorial Institute), ambos contendo os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (1%) e Soro Fetal Bovino (SFB) (10%). Este tubo foi centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm. Após, aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 5 mL de meio. A suspensão celular foi então, transferida para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e incubados a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> até formação da monocamada com aproximadamente 80% de confluência.

Para a obtenção da quantidade necessária de células para o experimento foram realizados os repiques. Aspirou-se o meio de cultura, restando somente as células aderidas no fundo do frasco. As células foram desprendidas com a adição de 0,5 ml de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. O frasco ficou em repouso na incubadora entre 1 a 4 minutos até o total desprendimento das células. A suspensão de células foi transferida para outro tubo cônico de 15ml contendo meio completo (meio, antibióticos e SFB a 10%), em um volume 3 vezes maior do que aquele usado de tripsina a fim de neutralizar a mesma. O passo seguinte foi a centrifugação por 4 minutos a 1000 rpm. No momento seguinte, aspirou-se o sobrenadante, restando somente o pellet, que foi ressuscitado em meio completo, sendo a suspensão usada no processo de contagem celular. Para a linhagem não aderente (K562), foi realizado o mesmo procedimento, sem a etapa de adição da tripsina.

#### **4.2.1 Preparo das amostras-teste**

Os compostos isolados foram, primeiramente, diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/ml. Para adicioná-los nas células, foi realizada diluição seriada em meio de cultura, sendo utilizadas as concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/ml em triplicata (FIGUEIREDO et al., 2011). A maior concentração de DMSO utilizada foi de 0,25%, o que não altera a viabilidade celular.

#### **4.2.2 Testes de citotoxicidade**

##### **4.2.2.1 Sulforrodamina B (SRB)**

O método colorimétrico utilizado em células aderentes de tumores sólidos foi o da sulforrodamina B (SRB) descrito por Skehan e colaboradores (1990).

Após a obtenção da densidade celular adequada, elas foram despreendidas dos frascos de manutenção (garrafas) por ação da tripsina-EDTA (procedimento inicial realizado da mesma forma descrita anteriormente para a manutenção celular) e transferidas para um tubo cônico com meio completo (em um volume três vezes maior do volume da tripsina) e centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm.

Ao *pellet* foram adicionados 2 (dois) ml de meio de cultura e desta suspensão retirou-se a alíquota para diluir em corante supra vital (azul de tripan 1:4) que evidencia as células não viáveis, as quais foram excluídas da contagem. Nesta etapa utilizou-se um contador manual (Câmara de Neubauer) para a obtenção da densidade celular suficiente para realização a inoculação de 7.500 células por cavidade em uma placa teste de 96 poços.

Após a contagem celular, ocorreu o preparo da placa T0 (Tempo Zero) e da placa teste. À placa T0 foi adicionado em triplicata a suspensão celular de cada linhagem e controle do experimento e normalizador de cor por ser método colorimétrico (triplicata do meio de cultura). A T0 foi então incubada e após 24 horas foi realizado o procedimento de coloração (metodologia descrita abaixo) por adição de sulforrodamina B (SRB), um corante que possui afinidade pelas proteínas das células (SKEHAN et al., 1990). A placa T0 é utilizada como parâmetro do ponto inicial do experimento, após a leitura desta é possível mensurar a densidade de células viáveis no momento em que foi adicionado as amostras na placa teste. Na placa Teste também foi adicionada a suspensão celular, após a incubação inicial de 24 horas foram adicionadas as amostras-teste em triplicata, nas concentrações de 0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL, sendo esta placa novamente incubada por 48hs. A placa teste continha ainda, o branco de cada concentração da amostra-teste, o controle negativo (células mais 100 µL de meio) e controle positivo doxorrubicina (0,025 - 0,25 - 2,5 e 25 µg/mL) como ilustrado na figura 6. Após o período de incubação (48h) foi realizado também o procedimento de coloração com SRB.

O procedimento de coloração é realizado da seguinte forma: O sobrenadante das cavidades das placas foi aspirado, permanecendo apenas as células nas cavidades. Adicionaram-se 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade, a fim de desnaturar as proteínas de membrana e assim fixar essas células à placa, e então, as placas mantidas em repouso por 30 minutos a 4 °C ao abrigo da luz. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas em água corrente e depois de secas, foram adicionadas 50µL de SRB (Sigma, USA) 0,1%

diluído em ácido acético 1%. Novamente as placas foram mantidas em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. No momento seguinte, as placas são lavadas 5 vezes com ácido acético 1% para retirar o excesso de corante livre. A seguir adiciona-se à placa seca 100  $\mu\text{L}$  de tampão Trizma Base (10 mM, pH 10,5) (Sigma, USA), para que ocorra a solubilização do corante ligado às proteínas das células fixadas.

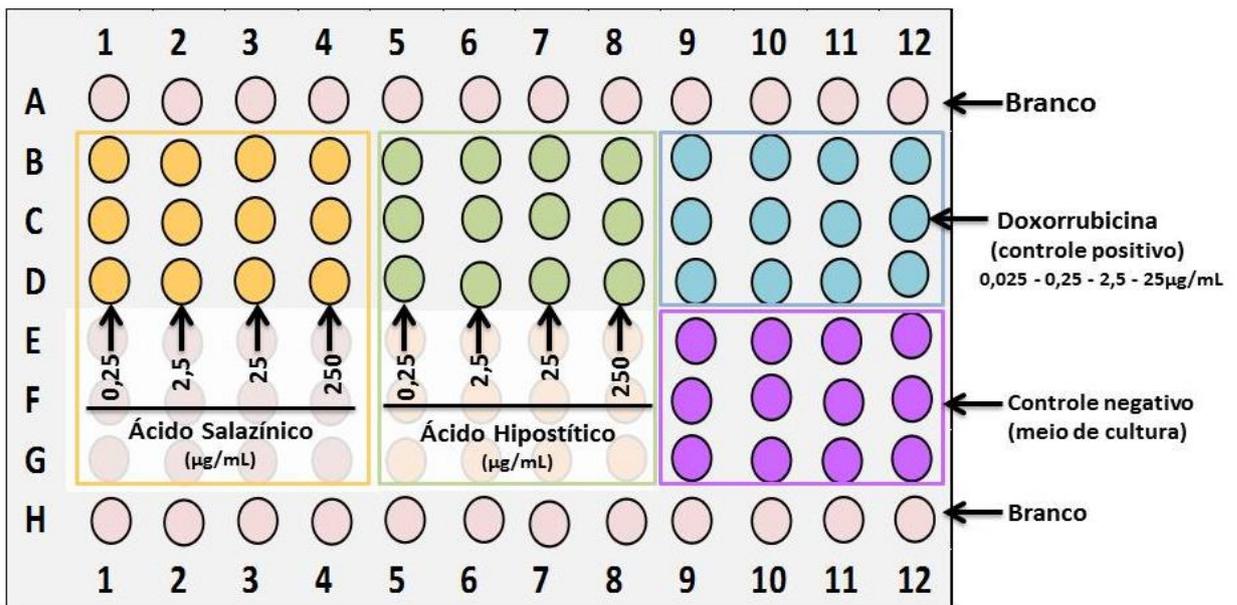


Figura 6. Representação da placa de 96 poços após adição das amostras-teste e Doxorrubicina (controle positivo).

#### 4.2.2.2 Sal de Tetrazólio (MTT)

O método colorimétrico utilizado em células não aderentes (K562) foi o do sal de Tetrazólio (MTT) - {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma), que se baseia na medida do dano que a amostra-teste induz no metabolismo celular de glicídeos por meio da avaliação da atividade de enzimas mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, foi quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade das enzimas (MOSMAN, 1983).

Primeiramente, foi preparada uma solução de MTT a uma concentração de 5mg/ml por meio da diluição do MTT em PBS estéril (pH 7,2). O procedimento

realizado até a adição das amostras-teste na placa de 96 poços foi o mesmo descrito no item 4.2.2.1 e representado na figura 6. Vinte e quatro horas após a inoculação das células na placa de microcultivo, foi realizada leitura da placa T0 onde foram adicionados MTT (0,5 mg/ml) e incubadas por 4 horas, a 37°C. Em seguida, foi aspirado o meio sobrenadante e então, adicionado o DMSO (P.A) para solubilização do MTT para posterior leitura da absorbância.

Após 48 horas de exposição das amostras-teste nas mesmas concentrações de 0,25 a 250 µg/ml foi realizada a leitura das placas testes adicionando-se o MTT. As placas foram incubadas por 4 horas, a 37°C, após esse período foi aspirado o meio sobrenadante e adicionado DMSO para devida solubilização. As placas ficaram 20 minutos sob agitação até o momento da leitura.

Comum entre os dois métodos, como controle positivo utilizou-se a Doxorrubicina (Libbs<sup>®</sup>) em concentrações dez vezes menor (10x) de 0,025, 0,25, 2,5e 25 µg/ml. A leitura das absorbâncias nos dois métodos foi feita no comprimento de onda de 540nm em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax 190<sup>®</sup>.

Foram obtidas leituras de absorbâncias em triplicata; tempo zero (T0, início da incubação), e após 48 horas tanto para o controle negativo (CN) quanto para a placa contendo as amostras-teste (T) em cada uma das quatro concentrações. A porcentagem de crescimento celular (média e desvio padrão) foi determinada usando a equação  $100 \times [(T - T0) / C - T0]$ . Um efeito citostático foi observado quando  $T \geq T0$ , enquanto um efeito citocida ocorreu quando  $T < T0$  (MONKS *et. al.*1991). A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (GI<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão não linear em programa para gráficos e análises de dados (*Origin* Versão 6.0). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) na linhagem de células B16-F10 para a determinação da média e desvio padrão da GI<sub>50</sub>, nas demais linhagens celulares foi realizado um experimento com concentrações em triplicata.

### **4.2.3 Índice de Seletividade**

O índice de seletividade (IS) corresponde à relação entre o valor da GI<sub>50</sub> de cada amostra-teste na linhagem de células normais NIH/3T3 e o valor da GI<sub>50</sub> da amostra-teste 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 morfológica**

O método de coloração pelo brometo de etídeo/ laranja de acridina permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte celular por apoptose ou necrose. As células viáveis apresentam coloração verde enquanto as apoptóticas adquirem coloração alaranjada e as células necróticas, coram-se de vermelho intenso (COHEN, 1993, MCGAHON et al., 1995).

A metodologia foi realizada como a descrita por McGahon et al. (1995). Foram utilizadas células da linhagem B16-F10 distribuídas em placas de 96 poços na concentração de  $7,5 \times 10^4$  células/ml (100  $\mu$ L/poço) e incubadas por 24h e 48h com as amostras-teste. O teste foi realizado com o ácido salazínico e ácido hipostítico nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu$ g/ml. As suspensões de células obtidas foram transferidas para um microtubo de 1,5 ml e centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25  $\mu$ L de solução tampão PBS. Em seguida foi adicionado 1 $\mu$ l de solução aquosa de laranja de acridina e brometo de etídeo 1:1, ambos na concentração de 100 $\mu$ g/ml. Foram transferidos 20 $\mu$ L da solução final para uma lâmina e cobertos por lamínula. A observação dos eventos celulares foi realizada em um microscópio de fluorescência (Olympus BX41). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. A avaliação morfológica foi realizada em duplicata.

### **4.4 Quantificação de caspase-3 ativa**

O ensaio foi realizado utilizando-se o PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD Pharmingen). Este se liga covalentemente e irreversivelmente ao sítio ativo dessa caspase ativada emitindo sinal de fluorescência detectado pelo canal FL-2.

Inicialmente,  $5 \times 10^5$  células B16F10 foram cultivadas em placas de 12 poços e tratadas com as concentrações de 25 µg/ml de ácido hipostítico e 190µg/ml de ácido salazínico (concentrações capazes de inibir 100% o crescimento celular), por 24 horas. Em seguida as células foram transferidas para microtubos de 2,0ml, centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas uma vez com PBS gelado. Logo, foram ressuspensas em 300 µL de BD Cytotfix/ Cytoperm 1x, incubadas em gelo por 20 minutos. Centrifugou-se e aspirou-se o sobrenadante. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com BD Perm/Wash, transferidas para uma placa de citometria de 96 poços com 40 µL de BD Perm/Wash e foram adicionados 10 µL do anticorpo Rabbit Anti-Active Caspase-3. A placa foi mantida por 30 minutos no gelo e no escuro, lavada duas vezes com BD Perm/Wash e levada para leitura em citômetro Accuri 6. Foram adquiridos 30.000 eventos e o teste realizado em duplicata.

#### **4.5 Toxicidade oral aguda**

O teste de toxicidade aguda do ácido salazínico e hipostítico, após aprovação pelo CEUA – UFMS (protocolo nº 777/2016), foi realizado em camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos, com peso médio de 30 g os quais permaneceram por um período de adaptação de 5 dias, sob condições ambientais controladas, sendo a temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água à vontade.

A toxicidade aguda dos ácidos salazínico e hipostítico foi baseada na OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) – *Guidelines 423* (OECD, 2001). O teste de toxicidade foi realizado em dois momentos, primeiramente foi avaliada a toxicidade do ácido salazínico e depois do ácido hipostítico, sendo mantidas as mesmas condições em ambos os experimentos.

Para o teste de toxicidade aguda de cada composto (ácidos salazínico e hipostítico), os animais ficaram em jejum por 6h anteriormente à administração, com acesso livre apenas à água e foram distribuídos em grupos (n=3): o grupo controle que recebeu apenas o veículo (solução salina com 5% DMSO) e os grupos tratados com os ácidos receberam doses de 50 e 300 mg/kg via oral, por via gavagem. A

dose inicial testada foi de 50mg/kg, pelo fato de não possuir na literatura dados sobre a toxicidade dos compostos. Não havendo óbito de animais nas primeiras 24 hora de exposição as doses iniciais, foi testada a dose de 2000 mg/kg. Após o tratamento, os animais foram observados nos primeiros 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 24h, e periodicamente durante 14 dias (OECD, 2001) quanto à função comportamental, motora e sensorial para acessar os potenciais efeitos neurotóxicos a partir do “Screening” Hipocrático (análise comportamental sistemática).

O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração dos compostos e no décimo quarto dia pós-administração, ainda no décimo quarto dia os animais foram submetidos a eutanásia, em câmara de CO<sub>2</sub>. O, fígado e rins, de cada animal dos grupos testes foram retirados e pesados.

## **4.6 Avaliação da atividade anticâncer**

### **4.6.1 Critérios éticos**

Todos os procedimentos realizados com os animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Protocolo nº685/2015). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Inflamação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os animais utilizados para a realização dos experimentos foram provenientes do Biotério Central da UFMS.

### **4.6.2 Protocolo experimental**

#### **4.6.2.1 Doses pré-estabelecidas**

As doses do ácido salazínico foram pré-estabelecidas por meio de um experimento piloto, vinculado a um projeto de iniciação científica (SOUZA, 2017). Foram testadas via intraperitoneal as doses de 66,7, 133,4 e 200,1 mg/kg de ácido salazínico, em camundongos BALB/c (n=5) previamente inoculados com células B16-F10 e com desenvolvimento tumoral já observado. Todos os animais do grupo

tratados com a maior dose (200,1 mg/kg) vieram a óbito em menos de 24 horas após a administração do composto. Dois animais tratados com 133,4 mg/kg, vieram a óbito dois dias após o tratamento. Portanto decidiu-se reduzir as doses pela metade no presente estudo.

Para o ácido hipostítico não foi possível a realização de um experimento piloto e não foi encontrado na literatura nenhum parâmetro de toxicidade do mesmo. Embora os compostos apresentem o mesmo núcleo estrutural, diferem entre si pela diferença de substituintes nas posições 3,4 e 3' o que confere diferenças em relação ao caráter lipofílico. O ácido hipostítico apresenta maior caráter lipofílico ( $\text{LogP} = 2,95 \pm 0,76$ ) com isso maior capacidade de ser absorvido do que o ácido salazínico ( $\text{LogP} = 1,41 \pm 0,86$ ). Ainda, o ácido hipostítico apresentou moderada toxicidade em células normais enquanto o ácido salazínico foi inativo nas mesmas. Desta forma, as doses do ácido hipostítico foram definidas como metade da concentração utilizada para o ácido salazínico.

#### 4.6.3.2 Desenvolvimento do melanoma experimental murino

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 25-30g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40 x 35 x 17 cm), na quantidade de três animais por gaiola, à temperatura de aproximadamente  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL<sup>®</sup> CR1) e água à vontade. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante cinco dias antes de serem utilizados experimentalmente.

Para o desenvolvimento do nódulo hipodérmico, suspensões de células B16-F10 ( $1 \times 10^6$  células/0,2 ml PBS) foram inoculadas subcutaneamente na região interescapular dos camundongos.

O esquema de tratamento utilizado foi de dose única/animal (intraperitoneal), todas as amostras-teste foram solubilizadas em 0,2 ml de PBS com adição de 5% de DMSO. No 10<sup>o</sup> dia após a inoculação das células os animais foram distribuídos em grupos (n=5) e tratados conforme descrito a seguir:

- I) PBS + 5%DMSO – controle negativo
- II) Doxorrubicina (2,0 mg/kg) – controle positivo

- III) Ácido salazínico 33,3mg/kg
- IV) Ácido salazínico 66,7mg/kg
- V) Ácido salazínico 100,0 mg/kg
- VI) Ácido hipostítico 16,7 mg/kg
- VII) Ácido hipostítico 33,3 mg/kg
- VIII) Ácido hipostítico 50,0 mg/kg

No 21º dia após a inoculação das células (11 dias após o tratamento), os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>. Após, os nódulos formados na região dorsal dos camundongos foram retirados e os seguintes parâmetros foram avaliados: peso (g) e volume (mm<sup>3</sup>);.Para a determinação da massa tumoral os nódulos foram pesados em balança analítica (5 casas decimais) RADWAG®. Os diâmetros foram medidos utilizando-se paquímetro digital SAGYMA® e o volume obtido por meio da fórmula de Steel ( $Dxd^2/2$ ), onde D e d são os diâmetros maiores e menores, respectivamente (GOMES 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 21ºdia (eutanásia).

#### 4.6.4 Avaliação histológica

Após a eutanásia rins e fígado foram retirados e fixados em formol tamponado a 10% durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em baterias de álcool e xilol, incluídos em parafina, cortados em micrótomo com espessura de 5µm. Os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE). A avaliação histopatológica foi realizada no Laboratório de Histologia da UFMS.

A análise foi baseada nas alterações morfológicas quanto à diversos parâmetros, como esteatose, degeneração hidrópica, degeneração hialina, infiltrado leucocitário, fibrose, apoptose e necrose. Para cada parâmetro será atribuído escores (0 / ausente /Grau 0), (+ / leve / grau 01), (++ / moderada / grau 02) e (+++ / intensa / grau 03), determinando a intensidade da lesão em cada área analisada. Foram analisadas, ao acaso, 10 secções de cada órgão e foi atribuído em cada área

analisada o grau de lesão encontrada, depois foi realizado uma média aritmética da lesão encontrada.

#### 4.7 Análise dos dados

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo Monks et al. (1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por regressão não linear para obtenção da  $GI_{50}$  em *software* de análise de dados Origin 6.0.

Os resultados de morfologia e caspase-3 (citometria de fluxo) foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via com pós teste de Dunnet para comparação com o controle.

Os resultados obtidos do volume e peso dos tumores no ensaio *in vivo* de atividade anticâncer foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os controles por meio da análise de variância (ANOVA) seguidos pelo pós-teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Para a avaliação das análises histopatológicas em escores, os valores foram expressos em mediana e foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para verificar se há diferença entre os grupos e teste de Mann-Whitney para localizar onde estão as diferenças estatísticas. Foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

Na toxicidade oral aguda, aos dados obtidos aplicaram-se os testes de análise de variância (ANOVA) seguido de teste Tukey e teste T (Graph Pad Prism 5<sup>®</sup>). Considerou-se valores significativos para  $p < 0,05$ , com resultados expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito antiproliferativo *in vitro*

A tabela 2 apresenta os valores de concentrações capazes de inibir 50% do crescimento celular ( $GI_{50}$ ) expressos em  $\mu\text{g/ml}$  e  $\mu\text{M}$  e o índice de seletividade (IS), que indica quantas vezes um composto é mais seletivo em uma célula neoplásica em relação a normal, demonstrando o potencial uso deste composto em testes clínicos. No presente trabalho, consideramos ativos os valores de  $GI_{50} < 250 \mu\text{g/ml}$  e inativos valores de  $GI_{50}$  superiores a  $250 \mu\text{g/ml}$ .

O ácido hipostítico apresentou valores de  $GI_{50}$  variando de 0,82 a 26,96  $\mu\text{g/ml}$  enquanto que o ácido salazínico mostrou valores ativos de  $GI_{50}$  de 24,99 a 88,33  $\mu\text{g/ml}$  (tabela 3). Os compostos avaliados apresentaram índice de seletividade maior que 2 para todas as linhagens, com exceção do ácido salazínico para linhagem de HepG2. As figuras 7 e 8 apresentam as curvas de crescimento celular nas linhagens B16-F10, PC-03, MCF7, HT-29, HepG2, K562, 786, NIH/3T3, nas diferentes concentrações testadas para o ácido salazínico e hipostítico, respectivamente. Nas curvas podem ser observados efeitos citostático e citocida.

Os pontos onde as curvas de crescimento tocam a linha que estima o valor calculado de  $GI_{50}$  indicam o efeito citostático e o efeito citocida equivale aos pontos da curva abaixo do zero. O ácido salazínico apresentou efeito citostático próximo à concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$  nas linhagens K562 (24,99  $\mu\text{g/ml}$ ), HT-29 (26,37  $\mu\text{g/ml}$ ) e B16-F10 (27,18  $\mu\text{g/ml}$ ) e efeito citocida na maior concentração (250  $\mu\text{g/ml}$ ) nas linhagens B16-F10, 786-0, K562 e MCF7. O ácido hipostítico apresentou efeito citostático em todas as concentrações na linhagem HepG2 e efeito citocida na maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ) em todas as outras linhagens.

Tabela 3 – Valores de inibição de crescimento ( $GI_{50}$ )\* e índice de seletividade (IS) dos ácidos hipostítico e salazínico e doxorrubicina em linhagens HT-29 (carcinoma de cólon), 786-0 (carcinoma de rim), MCF7 (carcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), PC-03 (carcinoma de próstata), B16-F10 (melanoma murino), K562 (leucemia mieloide crônica) e NIH/3T3 (fibroblasto murino)

Substâncias		Linhagens celulares							
		HT-29	786-0	MCF7	HepG2	PC-03	B16 -F10	K562	NIH/3T3
Ácido salazínico	$\mu\text{g/ml}$	26,4	88,3	62,1	293,8	38,0	27,2	25,0	396,8
	$\mu\text{M}$	67,9	227,5	160,0	756,7	97,8	78,6	64,4	1021,9
	IS	15,0	4,5	6,4	1,3	10,4	14,6	15,9	
Ácido hipostítico	$\mu\text{g/ml}$	27,0	5,3	26,0	22,8	22,9	5,1	0,8	78,7
	$\mu\text{M}$	72,4	14,2	69,8	61,4	61,5	13,8	2,2	211,4
	IS	2,9	14,8	3,0	3,4	3,4	15,4	95,9	
Doxorrubicina	$\mu\text{g/ml}$	0,2	0,03	0,02	0,2	0,02	0,02	2,3	1,6
	$\mu\text{M}$	0,4	0,05	0,04	0,4	0,04	0,04	9,9	2,9
	IS	6,6	33,6	63,2	6,6	63,2	63,2	0,7	

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

■ significativos para valores maiores o iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

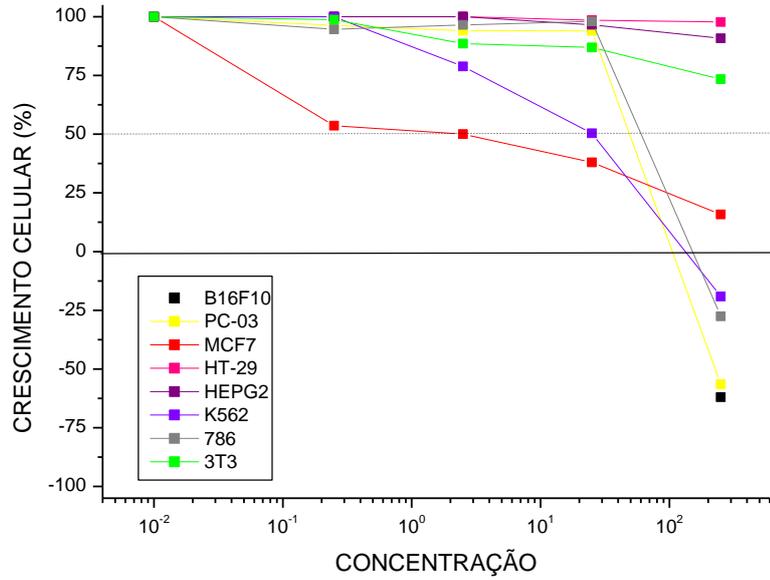


Figura 7. Atividade antiproliferativa do ácido salazínico frente à linhagens de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/ml), durante 48h.

As menores GIs do ácido hipostítico, portanto maior atividade, foram 0,82µg/ml (K562) e 5,3µg/ml (786), cujos valores de IS foram 14,85 e 95,95, indicando alta seletividade para linhagens neoplásicas.

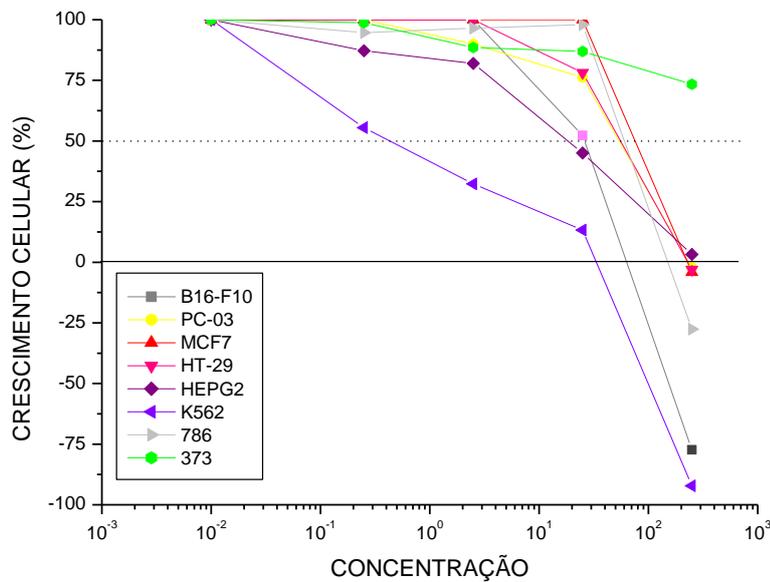


Figura 8. Atividade antiproliferativa do ácido hipostítico frente às linhagens de células neoplásicas expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250µg/ml), durante 48h.

## 5.2 Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico sobre a morfologia das células

Uma vez que os compostos apresentaram efeito inibitório na viabilidade das células B16-F10 e que foi proposto no projeto a realização do modelo experimental de melanoma murino (B16-F10), foi realizada a avaliação da morfologia destas células tratadas com as substâncias em estudo. Os resultados da contagem de células apoptóticas obtidos no ensaio com brometo de etídeo / laranja de acridina estão descritos na figura 9.

Além das doses apresentadas nos gráficos, também foram testadas as doses de 25µg/ml de doxorrubicina e 250µg/ml de ácido salazínico e ácido hipostítico, o resultado não pode ser expresso no gráfico, pois tais concentrações causaram morte celular elevada, portanto foram observadas raríssimas células ou apenas restos celulares no campo, impossibilitando a contagem.

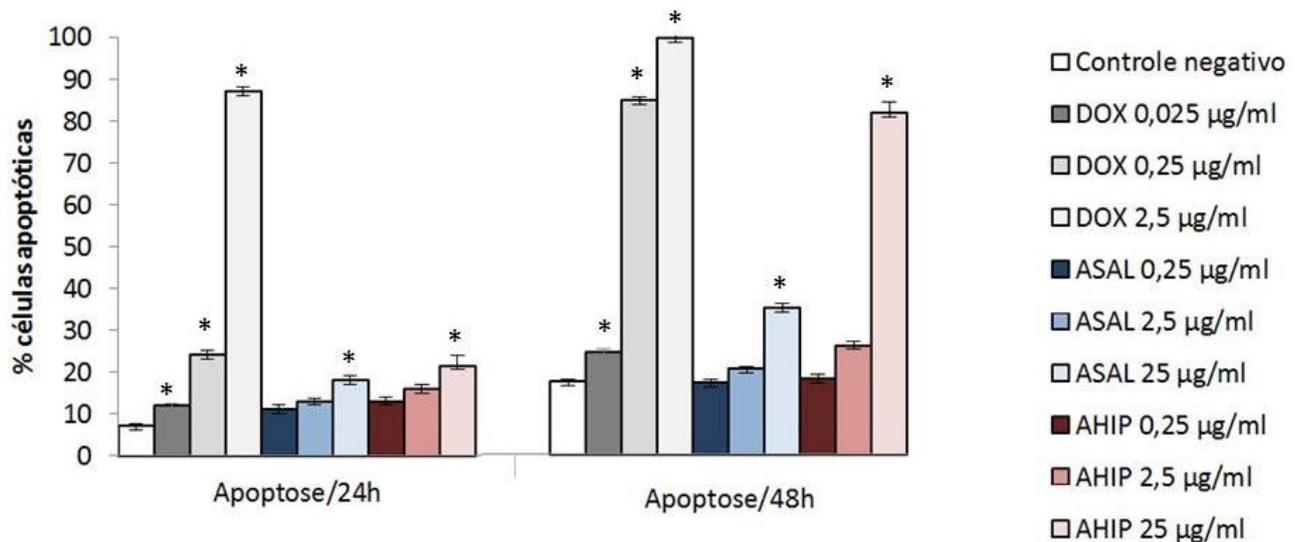


Figura 9. Efeito dos ácidos salazínico e hipostítico e doxorrubicina (0,025; 0,25; 2,5; 25 µg/ml) na morfologia de células B16-F10 após 24h e 48h de incubação. CN: controle negativo, DX: Doxorrubicina nas concentrações 0,025; 0,25; 2,5; 25 µg/ml, ASAL: ácido salazínico e AHIP: ácido hipostítico, ambos nas concentrações 0,25; 2,5; 25 µg/ml. Os valores representam a média ± erro padrão da média. \* $p < 0,01$  (ANOVA, seguido de *post test* Dunnet).

### 5.3 Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico na ativação de caspase-3

Após evidenciada a indução de apoptose pelos compostos, foi avaliado o efeito destes na ativação da caspase-3 (Figura 10). Os ácidos hipostítico e salazínico não promoveram aumento significativo (1,3 e 4,2%, respectivamente) de caspase-3 ativada quando comparado ao controle negativo. As células tratadas com doxorubicina (controle positivo) apresentaram 44% de proteína caspase-3 ativa.

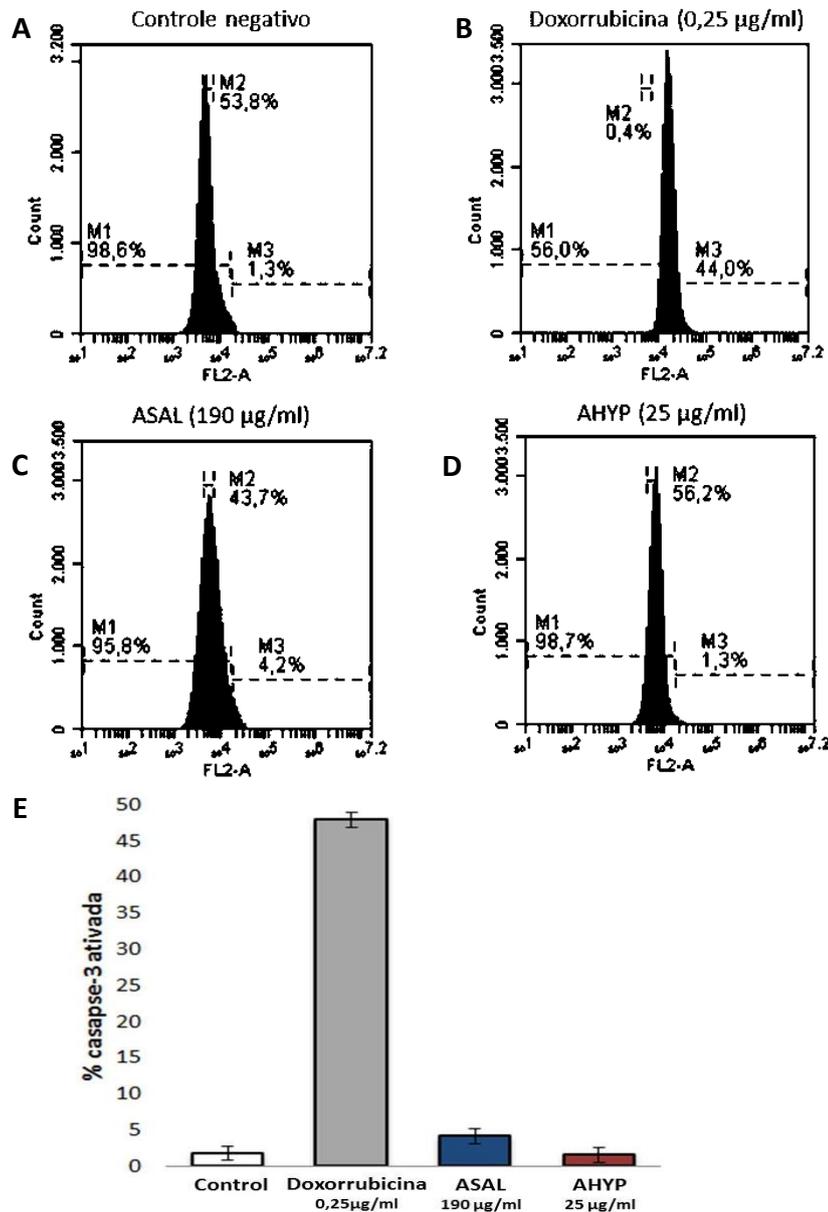


Figura 10 - Análise por citometria de fluxo da presença de caspase-3 ativa em células B16-F10 submetidas ou não a tratamento com os compostos testes. Os histogramas mostram a porcentagem de caspase-3 ativadas em células não tratadas (A) e tratadas com doxorubicina 0,25µg/ml (B), ácido salazínico 190µg/ml (C) e 25 µg/ml (D). (E) Gráfico de barras que compara a atividade da caspase-3 das células tratadas com as substâncias teste à do controle. (ANOVA, seguida de teste de Dunnet).\*

### 5.5 Teste de Toxicidade Aguda dos ácidos hipostítico e salazínico

Os resultados das avaliações toxicológicas agudas evidenciaram não haver sinais de toxicidade sistêmica nos grupos tratados com ácido hipostítico, assim como não houve morte de nenhum animal nas concentrações de 50, 300 e 2000mg/kg. Para a toxicidade aguda do ácido salazínico, a concentração de 2000 mg/kg foi classificada como tóxica, visto que ocorreu morte de dois animais (66,66%) em menos de 24 horas e o animal que sobreviveu foi eutanasiado três dias após a administração do composto, pois apresentou sinais de dor e sofrimento e de acordo com a OECD (2001), nesses casos é indicado a eutanásia.

Foi observado ganho de peso em todos os grupos em relação ao peso final, variando de 11,6 a 19,8% de ganho de peso corporal (Tabela 4). O peso dos órgãos (fígado e rins) dos grupos tratados com ácido hipostítico (50, 300 e 2000mg/kg) e salazínico (50 e 300 mg/kg) não apresentaram diferença significativa entre os grupos (figura 13). Ainda, nenhuma alteração relevante no teste *Screening* Hipocrático foi observada, como alteração motora e/ou sensorial, neurológica.

Segundo os resultado obtidos, o ácido salazínico apresentou maior toxicidade comparado ao ácido hipostítico, sendo classificados de acordo com a OECD como categoria 4 e 5, respectivamente, onde o grau 5 de classificação representa compostos de toxicidade relativamente baixa.

Tabela 4 - Evolução da massa corpórea e ganho ponderal, em camundongos machos, nos grupos controle e grupos tratados com as doses únicas de 50, 300 mg/kg de e ácido salazínico e 50, 300 e 2000mg/kg de ácido hipostítico, na toxicidade oral aguda.

Grupos experimentais (mg/Kg)	Parâmetros			
	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso	%
<b>CONTROLE1</b>	25,66±0,57	30,00±3,00	4,33±2,02	14,4
<b>ASAL 50</b>	27,00±2,00	32,33±1,15	5,33±0,66	16,5
<b>ASAL 300</b>	29,00±2,00	36,00±3,00	7,00±0,57	19,4
<b>CONTROLE 2</b>	29,67±0,58	37,00±2,00	7,33±1,50	19,8
<b>AHIP50</b>	28,00±1,73	31,67±2,52	3,67±1,53	11,6
<b>AHIP300</b>	30,33±0,58	35,67±1,53	4,33±1,15	12,1
<b>AHIP2000</b>	29,67±0,58	34,67±0,58	5,00±1,00	14,4

Valores expressos como Média ± erro padrão (n = 3 animais em cada grupo). Não foram observadas diferenças estatísticas para o ganho de peso. ASAL: ácido salazínico e AHIP: ácido hipostítico

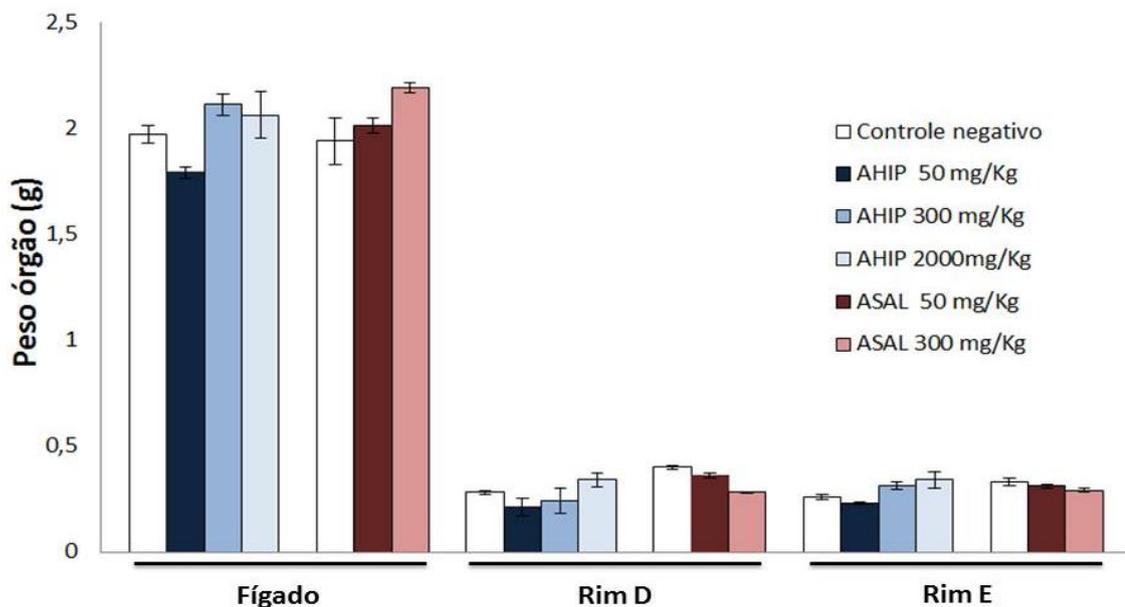


Figura 11. Peso dos órgãos após teste de toxicidade oral dos ácidos hipostítico e salazínico. Os valores representam média ± erro padrão da média. Não foram observadas diferenças estatísticas no peso dos órgãos. ASAL: ácido salazínico e AHIP: ácido hipostítico

p<0,01

#### 5.4 Efeito dos ácidos hipostítico e salazínico antitumoral *in vivo*

Para avaliar a relevância biológica dos resultados *in vitro*, foi realizado o estudo *in vivo* da ação dos ácidos salazínico e hipostítico sobre tumor de melanoma B16-F10 em camundongos BALB/c. Os animais tratados com ácido salazínico 66,7 e 100 mg/kg e ácido hipostítico 50mg/kg apresentaram letargia nos primeiros 30 minutos após receberem o tratamento, permanecendo assim até os 60 minutos. Os animais do grupo controle negativo (PBS) apresentaram comportamento normal. O delineamento experimental e imagens representativas de tumores excisados de cada tratamento são mostradas na figura 12.

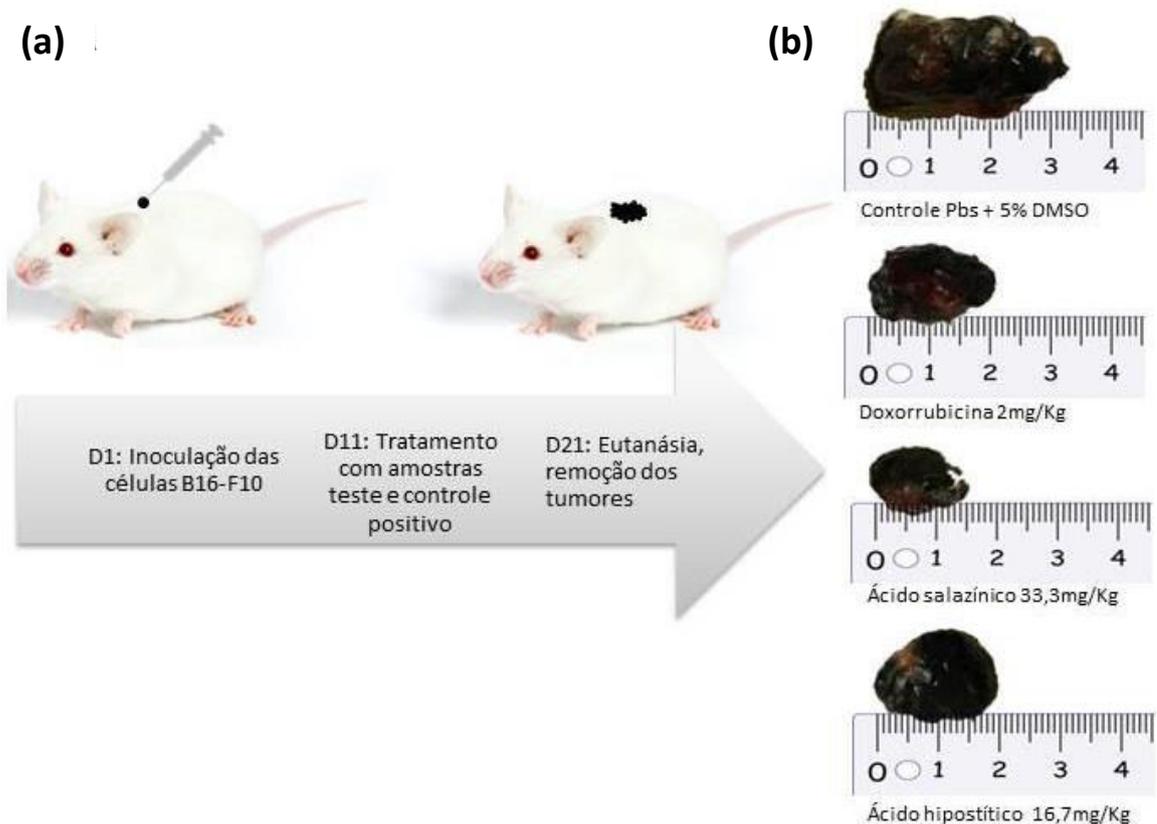


Figura 12 - Ácidos hipostítico e salazínico suprimem o crescimento tumoral de melanoma murino em camundongos BALB/c. (a) Desenho experimental do modelo animal com melanoma B16F10. (b) Imagens representativas de tumores de camundongos de cada grupo.

Os resultados obtidos evidenciam uma diminuição do peso e volume dos nódulos dos animais tratados com ácido salazínico e hipostítico nas três concentrações testadas comparados ao grupo controle (Figura 12). Observou-se que os grupos tratados com Doxorubicina 2mg/kg (controle positivo), ácido

hipostítico 16,7 mg/kg e ácido salazínico 33,3 mg/kg causaram inibição significativa no crescimento tumoral. No final do experimento, o volume tumoral médio foi reduzido de 8,67 cm<sup>3</sup> no grupo controle negativo para 1,14, 2,77 e 3,95 cm<sup>3</sup> nos grupos tratados com ácido salazínico (33,3 mg/kg), ácido hipostítico (16,7 mg/kg) e doxorrubicina (2mg/kg), respectivamente, representando uma inibição no volume tumoral de 88, 72 e 68%, respectivamente.

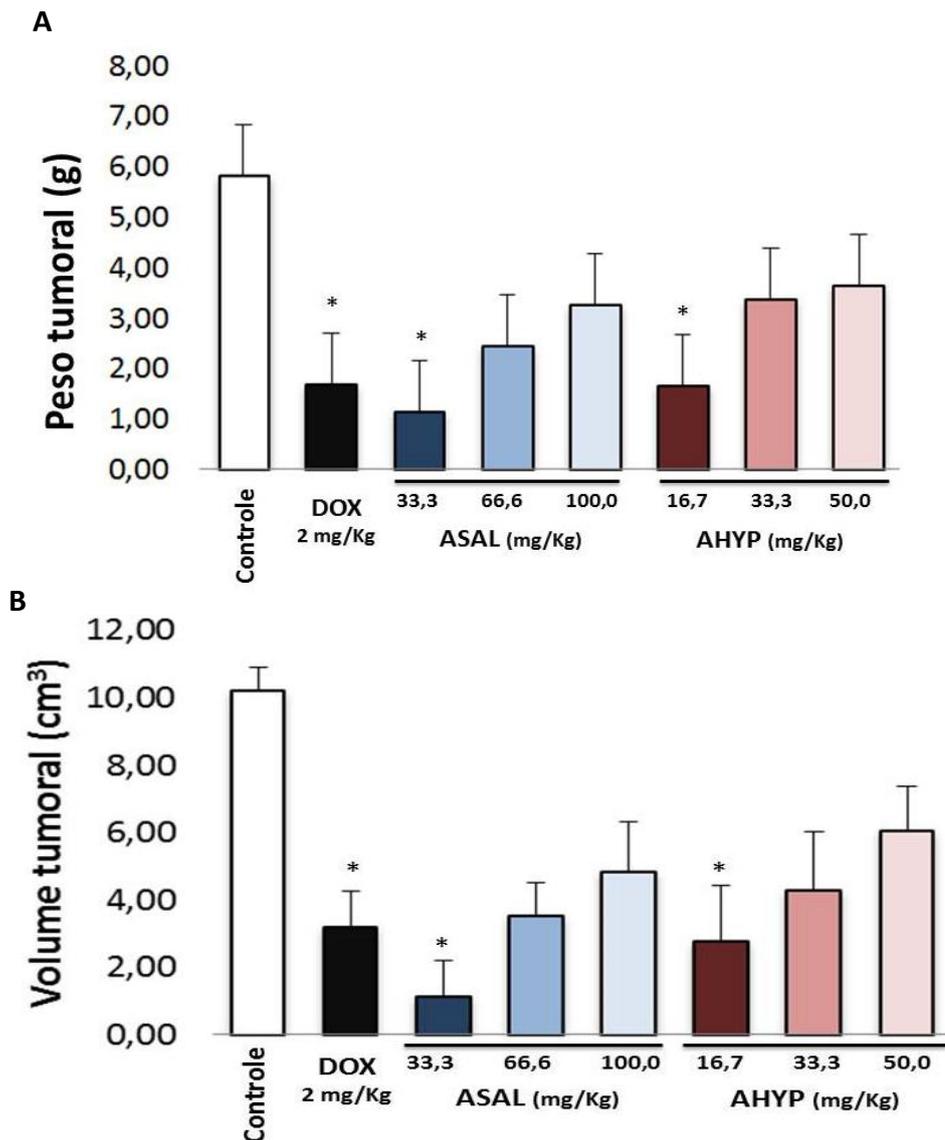


Figura 13. Efeito antitumoral do tratamento com ácido hipostítico e salazínico em modelo experimental murino. Efeito em relação ao peso (a) e volume (b) dos nódulos após o tratamento com doxorrubicina (DOX- 2mg/kg), ácido salazínico (ASAL - 33,3, 66,7 e 100 mg/kg) e ácido hipostítico (AHIP - 16,7, 33,3 e 50 mg/kg). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  (ANOVA, seguida de teste de Tukey).

#### 5.4.1 Efeito do tratamento com os ácidos hipostítico e salazínico sobre o peso do animais

Durante o ensaio *in vivo*, foi realizado avaliação do peso corpóreo dos animais (Tabela 5). Ao comparar o peso inicial ao final, todos os grupos apresentaram ganho de peso ( $p < 0,05$ ), variando de 8,6 a 17,0% de ganho de massa ponderal. O peso final dos animais comparado entre os grupos experimentais não apresentou diferença significativa.

Tabela 5 – Média do peso inicial e final dos animais dos grupos experimentais. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

Grupos	Peso corporal(g)		Ganho de massa ponderal	
	Inicial	Final	Média (g)	Porcentagem (%)
Controle negativo	28,6 $\pm$ 1,5	34,5 $\pm$ 3,00	5,9	17,1
Controle positivo	28,6 $\pm$ 0,9	32,6 $\pm$ 0,89	4,0	12,2
ASAL 33,3mg/kg	30,6 $\pm$ 1,8	33,6 $\pm$ 0,89	3,0	8,9
ASAL 66,7 mg/kg	29,6 $\pm$ 0,5	32,4 $\pm$ 1,14	2,8	8,6
ASAL 100,0 mg/kg	28,8 $\pm$ 1,89	33,2 $\pm$ 2,17	3,7	11,1
AHIP 16,7 mg/kg	27,6 $\pm$ 1,8	31,0 $\pm$ 1,22	4,2	13,5
AHIP 33,3 mg/kg	29,6 $\pm$ 2,9	33,6 $\pm$ 1,82	4,0	11,9
AHIP 50,0 mg/kg	29,2 $\pm$ 2,2	35,2 $\pm$ 0,84	6,0	17,0

Não houve diferença significativa entre os pesos finais dos grupos (ANOVA, seguida de teste de Tukey)

#### 5.4.3 Efeitos do tratamento com os ácidos hipostítico e salazínico sobre a análise histopatológica do fígado e rins

Foi observada degeneração hidrópica (Tabela 6) de grau leve nos grupos tratados com os ácidos hipostítico (16,7; 33,3 e 50 mg/kg) e salazínico (100 mg/kg) apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo controle

negativo. Não foram observadas alterações hepáticas em nenhum grupo experimental. A figura 12 apresenta imagens da morfologia dos rins.

Tabela 6 - Resultados das análises em escore das avaliações histopatológicas do fígado e rim nos diferentes tratamentos.

Órgãos	CN	DOX 2,0 mg/kg	AHIP 16,7 mg/kg	AHIP 33,3 mg/kg	AHIP 50,0 mg/Kg	ASAL 33,3 mg/kg	ASAL 66,7 mg/kg	ASAL 100,0 mg/kg
<b>Rim</b>								
<b>Degeneração Hidrópica</b>	2	2	4*	4*	4*	4	4	4*

Valores representados em medianas. \*  $p < 0,05$  em relação controle negativo.

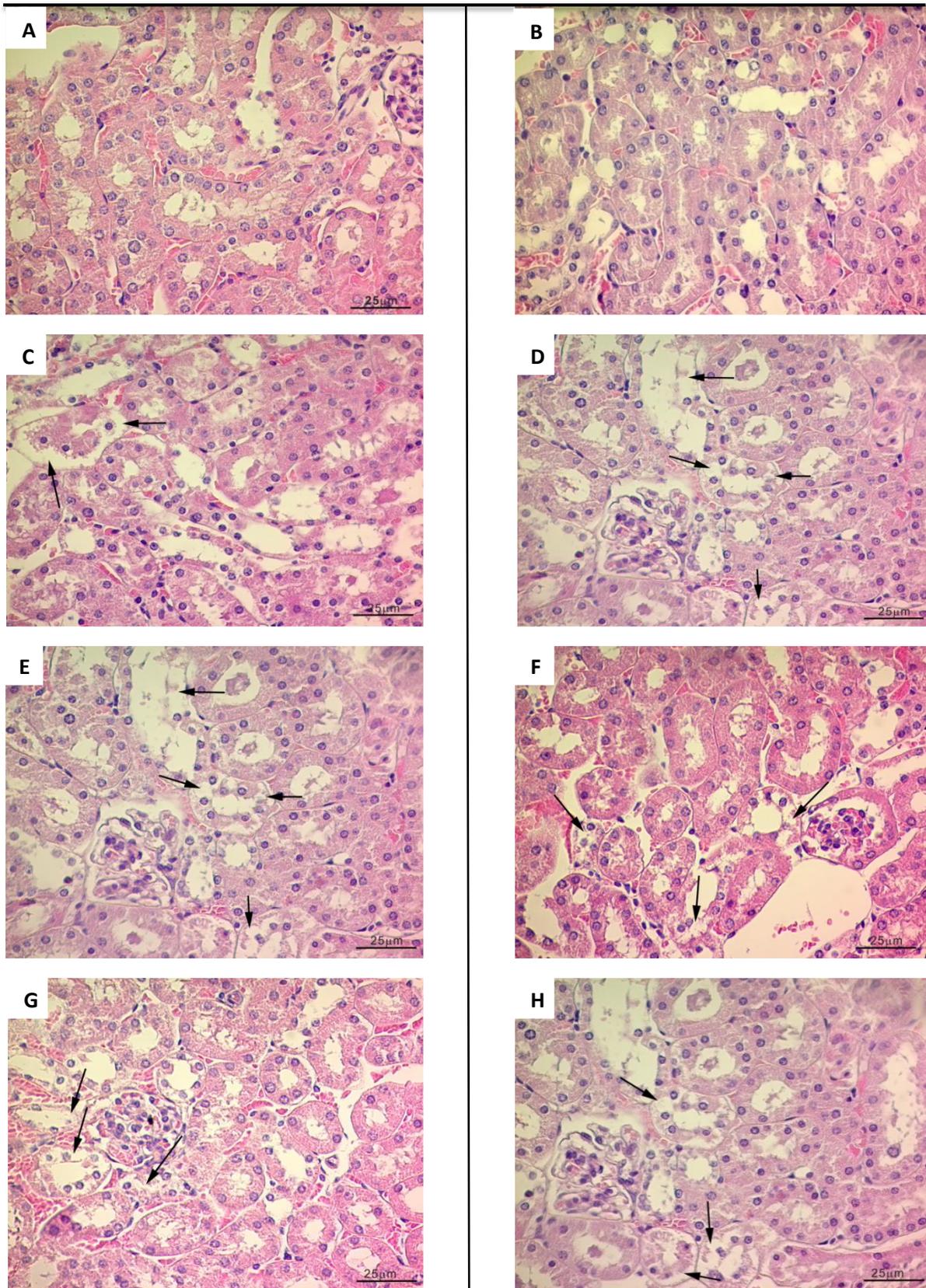


Figura 14 - Análise histológica dos rins dos grupos tratados, corados com hematoxilina-eosina. Aumento de 40x e escala da barra: 25 µm. **(A)** grupo controle; **(B)** grupo doxorrubicina 2mg/kg; **(C)** grupo ácido hipostítico 16,6 mg/kg; **(D)** grupo ácido hipostítico 33,3 mg/kg; **(E)** grupo ácido hipostítico 50,0 mg/kg; **(F)** grupo ácido salazínico 33,3 mg/kg; **(G)** grupo ácido salazínico 66,6 mg/kg; **(H)** grupo ácido salazínico 100,0 mg/kg.

## 6 DISCUSSÃO

A busca de novos agentes anticancerígenos provenientes de fontes naturais tem sido uma alternativa diante da crescente resistência das células tumorais aos tratamentos convencionais. As depsídonas são bem caracterizadas por exibirem várias atividades biológicas, dentre elas ação anticancerígena (CARDILE et al., 2017), porém poucas são as informações na literatura sobre o efeito antiproliferativo em específico da depsidona, ácido salazínico. Nossos resultados mostram o potencial do ácido salazínico na inibição do crescimento celular de K562, HT-29, B16-F10 e PC-03 ( $GI_{50}$  24,99 a 37,96  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente), resultados semelhantes ao encontrado por Manojlović et al. (2012) em células de melanoma humano (FemX) e carcinoma de colón humano (LS174), ( $IC_{50}$  39,02 e 35,67  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Embora a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular não seja tão baixa, a seletividade é considerável (baixo efeito citotóxico sobre células normais), variando de 4,5 a 15,9 nas linhagens em que o composto foi ativo, já que a seletividade é um parâmetro importante a ser avaliado nas pesquisas que visam o desenvolvimento de novos agentes anticâncer. Os tratamentos atuais muitas vezes apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade associadas à baixa especificidade celular, e por isso são citotóxicos para um grande número de células normais, além das neoplásicas (PETERS; BROWN, 2015). Correché et al. (2004) relatou o efeito apoptótico desse ácido em culturas primárias de hepatócito de rato. O ácido salazínico mostrou atividade pouco significativa sobre MM98 (malignant mesothelioma), A431 (vulvar carcinoma), Haca Tkeratinocytes, MDA-MB435 (mama-humano), HCT-8 (cólon-humano) e SF-295 (glioblastoma humano) (BURLANDO et al. 2009, MICHELETTI et al. 2009). Com relação ao ácido hipostítico não foram encontrados estudos científicos sobre o efeito antiproliferativo ou antitumoral desse composto. Assim sendo, este é o primeiro registro da atividade antiproliferativa do ácido hipostítico sobre as células HT-29, 786-0, MCF7, HepG2, PC-03, B16-F10, K562 e citotóxica em NIH/3T3. O ácido hipostítico apresentou atividade de inibição do crescimento celular em todas as células testadas com valores de  $GI_{50}$  de 2,2 a 72,4  $\mu\text{M}$  com destaque para K562, B16-F10 e 786-0 ( $GI_{50}$  2,2, 13,8 e 14,2  $\mu\text{M}$ ); além disso apresentou índice de seletividade superior a 2,0 nas três linhagens citadas (IS 95,95, 15,44 e 14,86, respectivamente).

Esses compostos induzem a morte celular por apoptose com resultados significativos em doses superiores a 25 µg/ml tanto em 24h como em 48h de incubação. Foi observado que quanto maior a dose, maior efeito apoptótico, já na dose de 250 µg/ml ambos os compostos apresentaram efeito citocida. Esses resultados corroboram com outros estudos que demonstraram que substâncias derivadas de líquens, da classe dos depsídios e depsidonas, induzem apoptose em células neoplásicas (RUSSO et al. 2008, 2012; BAČKOROVÁ et al. 2011). Os principais componentes do processo de apoptose são os membros da família das caspases (proteases citosólicas aspartato específicas) (PHILCHENKOV, 2004), sendo que a caspase-3 é a que é frequentemente ativada no processo de apoptose via extrínseca e intrínseca caspase-dependente (PORTER; JÄNICKE, 1999). Os ácidos hipostítico e salazínico não ativaram a caspase-3, mas há outras duas caspases executoras que também levam à apoptose, que são as caspases-6 e -7, além disso existe a via de apoptose intrínseca caspase-independente que ocorre por meio de fatores indutores de apoptose (AIF) e endonuclease G (GALLUZZI et al., 2012; DASGUPTA et al., 2016).

Em estudos *in vivo*, há uma ampla variedade de modelos dentre os quais se incluem mutações gênicas, interações proteína-proteína, sensibilidade a compostos farmacológicos, imunoterapia e os processos de invasão de metástases, dentre outros (CULP et al., 2006; TALMADGE et al., 2007). Como a toxicidade oral aguda tem por objetivo a classificação de substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade, os resultados obtidos para os ácidos hipostítico e salazínico são dados relevantes para futuras pesquisas com modelos experimentais *in vivo*, já que os compostos se enquadram em categorias de baixa e moderada toxicidade, respectivamente.

O modelo de melanoma murino apresenta boa similaridade com a neoplasia humana e possibilita avaliar inúmeras vias envolvidas na instalação e progressão tumoral (VAN DYKE; JACKS, 2002). Nesse estudo, os ácidos hipostítico e salazínico foram capazes de inibir a tumorigênese, ambos apresentaram resultados estatisticamente iguais, nas menores doses, ao fármaco padrão (Doxorrubicina).

Ao se analisar resultados de estudos *in vivo* deve-se levar em consideração não apenas interação fármaco-receptor, mas outros fatores como a composição do microambiente tumoral, pois este exerce segundo um papel crucial no

desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O recrutamento de células, como macrófagos, granulócitos e linfócitos, produção de óxido nítrico e a ativação de efetores imunes, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e cininas podem ora estimular uma efetiva resposta antitumoral, ora favorecer o crescimento e a disseminação tumoral pela promoção da angiogênese (WILSON; BALKWILL, 2002; BISACCHI et al. 2003). Segundo Sun et al. (2011) as células de melanoma B16-F10 produzem níveis mais elevados TDSFs (tumor-derived soluble factors), incluindo IL-10 (Interleucina-10), fator transformador do crescimento beta 1 (TGF-b1) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que suprimem o sistema imune.

Portanto, neste estudo, os tratamentos com as maiores doses dos ácidos hipostítico e salazínico administradas podem ter inibido fatores responsáveis pela ação antitumoral e/ou estimulado fatores de promoção da tumorigênese.

Na análise histopatológica apenas foi verificado leve grau de degeneração hidrópica também conhecida como degeneração vacuolar, por ser a primeira manifestação de quase todas as formas de dano celular e uma alteração reversível não-letal (KUMAR, ASTER; ABBAS, 2015), é possível afirmar que os tratamentos com os compostos nas doses testadas não causam dano renal significativo.

Analisados em conjunto, os resultados demonstram que os ácidos hipostítico e salazínico apresentam efeito anticâncer *in vitro* e *in vivo* e podem servir como potenciais agentes anticâncer.

## 7 CONCLUSÕES

Os ácidos hipostítico e salazínico foram ativos em todas as linhagens testadas, com exceção na linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2) para o ácido salazínico. Ambos os compostos não apresentaram citotoxicidade em células normais (NIH/3T3).

Tanto o ácido hipostítico como o salazínico foram seletivos em todas as linhagens, com exceção na linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2) para o ácido salazínico.

Os compostos induziram significativa apoptose em células B16-F10 na concentração de 25 µg/ml e na concentração de 250 µg/ml apresentam efeito citocida.

Ambos os compostos induziram a apoptose das células B16-F10 independente da ativação da caspase-3.

Os ácidos hipostítico e salazínico apresentaram efeito antitumoral em modelo experimental de melanoma murino, com resultados estatisticamente semelhantes ao fármaco padrão Doxorubicina.

O ácido salazínico apresentou moderada toxicidade enquanto o ácido hipostítico baixa toxicidade.

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho indicam que os ácidos hipostítico e salazínico apresentam potencial anticancerígeno, porém outros estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação desses compostos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. D. J. et al. Phenols, flavonoids and antioxidant and cytotoxic activity of leaves, fruits, peel of fruits and seeds of *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae - Mimosoideae). **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 5, p. 466-476, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key statistics for melanoma skin cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 09 jun. 2017.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: A survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 1-8, 2015.

DE AZEVEDO, R. A. et al. Mastoparan induces apoptosis in B16F10-Nex2 melanoma cells via the intrinsic mitochondrial pathway and displays antitumor activity in vivo. **Peptides**, v. 68, p. 113-119, 2015.

BÁNFALVI, G. Apoptotic chromatin changes. In: **Apoptotic Chromatin Changes**. Springer Netherlands, p. 293-364, 2009.

BAČKOROVÁ, M. et al. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 37-44, 2011.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. **Planta medica**, v. 70, n. 09, p. 874-877, 2004.

BISACCHI, D. et al. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer detection and prevention**, v. 27, n. 3, p. 229-238, 2003.

BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: progress and promise. **Semin. Cancer Biol**, v.40, p.1-3, 2016.

BLANK, M.; SHILOH, Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. **CellCycle**, v. 6, n. 6, p. 686-695, 2007.

BOENTE, P. C.; SAMPAIO, C.; DEL GIGLIO, A. Agentes Antineoplásicos. In: SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 8 ed. 2010.

BRANDÃO, L. F. G. et al. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 2, p. 176-183, 2013.

BRECHTBÜHL, E. R. Tratamento do melanoma - doença localizada. **Revista Onco& - Oncologia para Todas as Especialidades**, v.23, p.18-21,2014.

BRODO, I. M.; AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. Substrate Ecology; In *The Lichens*. **Academic Press. New York**. p. 401, 1973.

BROKER, L.E.; KRUYT, F.A.E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BURLANDO, B. et al. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. **Planta medica**, v. 75, n. 06, p. 607-613, 2009.

CARDILE, V. et al. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. **Chemico-biological interactions**, v. 263, p. 36-45, 2017.

CEBALLOS, A. G. C. et al. Exposição Solar Ocupacional e Câncer de Pele Não Melanoma: Estudo de Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 3, p. 251-258, 2014.

CHAPMAN, A. D. Numbers of Living Species in Australia and the World. **Australian Biological Resources Study**, v.2, p.3-5, 2009.

COHEN, J. J. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. **HospPract (Off Ed)**, v. 28, n. 12, p. 35-43, 1993.

CORRECHÉ, E. et al. Cytotoxic screening activity of secondary lichen metabolites. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 273-278, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A. 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**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CULP, T. D. et al. Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo. **Journal of virology**, v. 80, n. 22, p. 11381-11384, 2006.

DASGUPTA, A. et al. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 23, 2016.

DE PAZ, G. A. et al. HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n. 2, p. 165-171, 2010.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687- 699, 2011.

DIEPGEN, T. L. et al. Occupational skin cancer induced by ultraviolet radiation and its prevention. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. s2, p. 76-84, 2012.

D'ORAZIO, J. et al. radiation and the skin. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816-827, 2014.

ERICKSON, C.; MILLER, S. J. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 5, p. 482-491, 2010.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of internal medicine**, v. 258, n. 6, p. 479-517, 2005.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FERRARO-PEYRET, C. et al. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4805-4810, 2002.

FIGUEIREDO, P. O. et al. New Cytotoxic B-Carboline Alkaloid from *Galianthethalictroides*. **Planta Medica**, v. 77, p. 1852-1854, 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types**. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GOMES, A. T. et al. ROESE, F. M.; MUZZI, R. M. Antibacterial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 194-196, 2003.

GOMES, A. T. et al. Cytotoxic activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 9-10, p. 653-657, 2006.

GOMES NETO, A. et al. Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta Cir Bras**, p. 12-22, 2002.

GORDON, R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in oncology nursing**, v. 29, n. 3, p. 160-169, 2013.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GULLO, V. P. et al. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 523-531, 2006.

- GUTERRES, Z. R. et al. Antigenotoxicity of Depsidones Isolated from Brazilian Lichens. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p.50-54, 2017.
- HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, p. 110-125, 1999.
- HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 328-332, 2010.
- HONDA, N. K. et al. Radical-scavenging potential of phenolic compounds from Brazilian lichens. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 99-107, 2015.
- HONDA, N. K. et al. Screening of Lichen Extracts Using Tyrosinase Inhibition and Toxicity Against *Artemiasalina*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, P.181-188, 2016.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.
- INGÓLFSDÓTTIR, K. N. et al. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 141-144, 1998.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Estimativa 2016/2017. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015 Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acesso em: 28 dez. 2016
- KALLIFATIDIS, G.; HOY, J. J.; LOKESHWAR, B. L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40, p.160-169, 2016.
- KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KOSUGI, M. et al. Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. **Plant & Cell Physiology**, v. 50, n. 4, p. 879-888, 2009.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LARSEN, B. D.; SØRENSEN, C. S. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. **The FEBS journal**, v. 284, n. 8, p. 1160-1170, 2016.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 153-85, 1995.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, Tak W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. 1 - 28, 2013.

MANOJLOVIĆ, N. T. et al. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2011.

MICHELETTI, A. C. et al. Chemical constituents of *parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro ; Adler: isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 12-20, 2009.

MICHELETTI, A. C. et al. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity against human tumor cell lines. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1014-1020, 2011.

MICHELETTI, C.A. et al. Increment of antimycobacterial activity on lichexanthone derivatives. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 904-910, 2013.

MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 8, p. 5428-5448, 2011.

MONDAL, S. et al. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 12, n. 1, p. 49-75, 2012.

MONKS, A. et al. 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, n. 11, p. 757-766, 1991.

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

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer statistics**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Whatis cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#related-diseases>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

NCI. Nacional Cancer Institute. **General InformationAbout Melanoma**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

OLIVEIRA, L. G. D.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da Química e da Biologia. **Química Nova**, v. 36, n.10, p.1577-1586, 2013.

OECD, GUIDELINE, DRAFT UPDATED TEST. **Guidelines for the Testing of Chemicals**.2001.

PETERS, C.; BROWN, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Biosci Rep**, v. 35, n. 4, 2015.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J Cell Mol Med**, v. 8, n. 4, p. 432-44, 2004.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell death & differentiation**, v. 6, n. 2, 1999.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

RUSSO, A. et al. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. **Life sciences**, v. 83, n. 13, p. 468-474, 2008.

RUSSO, A. et al. **Chemico-biological interactions**, v. 195, n. 1, p. 1-10, 2012.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861-2874, 2004.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer research**, v. 64, n. 20, p. 7183-7190, 2004.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Molecular cell**, v. 9, n. 3, p. 459-470, 2002.

SHRESTHA, G.; CLAIR, L.L. St. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. **Phytochemistry reviews**, v. 12, n. 1, p. 229-244, 2013.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer letters**, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SHUKLA, V. et al. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in some lichens of Garhwal Himalayas, India. **International Journal of Environment and Waste Management**, v. 5, n. 1-2, p. 104-113, 2009.

SONDAK, V. K. et al. Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. **Annals of Surgical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 247-258, 2004.

SOUZA, P. R. B. **Avaliação da atividade anticâncer e toxicidade aguda do ácido salazínico**. 2017. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

SRI-INDRASUTDHI, V. **Isolation and Optimization of Lichenized Fungi for Bioactive Compounds Screening**. 2005. 90 f. Tese (Doutorado) - MAHIDOL UNIVERSITY, Bangkok, 2005.

STOJANOVIC, G.; STOJANOVIC, I.; SMELCEROVIC, A. Lichen depsidones as potential novel pharmacologically active compounds. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 178-184, 2012.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 71-133, 1991.

SUN, L. X. et al. Ganoderma lucidum polysaccharides antagonize the suppression on lymphocytes induced by culture supernatants of B16F10 melanoma cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 725-735, 2011.

SYED, D. N. et al. Exploring the molecular targets of dietary flavonoid fisetin in cancer. **Seminars in cancer biology**, v.40, p.130-140, 2016.

SWATHI, D. et al. Antimicrobial, anthelmintic and insecticidal activity of a macrolichen *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 2, n. 4, p. 780-789, 2010.

TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TÜRK, A. Ö. et al. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 11-12, p. 850-854, 2003.

VAN DYKE, T.; JACKS, T.. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 135-144, 2002.

VERMA, N.; BEHERA, B. C.; JOSHI, A. Studies on nutritional requirement for the culture of lichen *Ramalina nervulosa* and *Ramalina pacifica* to enhance the production of antioxidant metabolites. **Folia microbiologica**, v. 57, n. 2, p. 107-114, 2012.

VINJAYAKUMAR, C.S. et al. Anti-inflammatory activity of (+) –unisc acid. **Fitoterapia**, v.71, p.564-566, 2000.

VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALSH, C. M. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. necroptosis. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, n.3, p.1- 3, 2014.

WILSON, J.; BALKWILL, F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2002. p. 113-120.

WHO. **World Cancer Report 2014**. Disponível em: <<http://www.thehealthwell.info/node/725845>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 451-465, 1997.

YAMAMOTO, Y. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. **Chemical Regulation of Plants (Japan)**, 2000.

ZHAO, W. et al. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer letters**, v. 162, p. S49-S55, 2001.

ZAMBARE, V. P.; CHRISTOPHER, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 6, p. 778-798, 2012.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito antitumoral de compostos de líquens em linhagens celulares neoplásicas e melanoma experimental murino”, Protocolo nº 685/2015 sob a responsabilidade de **Danielle Bogo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 30 de junho de 2015.

Vigência do Projeto	01/08/2015 a 01/08/2016
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Mus musculus</i> / C57BL/6N (isogênico) <i>Mus musculus</i> / BALB/c (isogênico)
Números de Animais	60 05
Peso/Idade	25 - 35g/Adulto 25 - 35g/ Adulto
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério Central/CCBS/UFMS

Maria Araújo Teixeira  
Coordenadora da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 20 de junho de 2016.

2ª. via emitida em 20/06/2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
<http://www.propp.ufms.br/ceua>  
[ceua.2000@gmail.com](mailto:ceua.2000@gmail.com)  
fone (67) 3345-7186

