



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula marinobufagina  
obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região  
Amazônica**

**KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO**

Teresina – Piauí

2014

**KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO**

**Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula marinobufagina  
obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região  
Amazônica**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro  
Ferreira

Teresina – Piauí

2014

**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde - UFPI**

M149p Machado, Kátia da Conceição.  
Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula marinobufagina obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região amazônica / Kátia da Conceição Machado. -- Teresina, 2014.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.

Bibliografia

1. Anticâncer. 2. Atividade antiproliferativa. 3. Bufadienolídeos. I. Título. II. Teresina – Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.1

**KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO****Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula  
marinobufagina obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo  
guttatus* da região Amazônica**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 07/11/2014

**BANCA EXAMINADORA**

Paulo Michel P. Ferreira

**Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Orientador)**

Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

**Profa. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante (Examinador interno)**

Departamento de Farmácia – UFPI

Arnobio Antonio da Silva Junior

**Prof. Dr. Arnobio Antonio da Silva Junior (Examinador externo)**

Departamento de Farmácia – UFRN

Aldeídia Pereira de Oliveira

**Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira (Examinador externo)**

Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dr<sup>a</sup>. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Dedico essa conquista a **Deus** e a **Nossa Senhora** por sempre estarem comigo, me iluminando e mostrando o caminho certo. Pela força e por permitirem que eu chegasse até aqui. Aos meus **pais**, pelo apoio e incentivo constante.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, minha fonte inesgotável de fé, e a **Nossa Senhora** pelo dom da vida, pela força, apoio e por impulsionar sempre seguir em frente nos momentos de dificuldades e por iluminar meus caminhos com sua proteção divina.

Aos meus pais, *Luiza Maria da Conceição Machado e Luiz Alves Machado*, por sempre estarem ao meu lado, pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional e por ter feito de mim a pessoa que sou. A vocês, minha eterna gratidão e amor.

À minha querida e estimada irmã, *Keylla da Conceição Machado*, pelo amor, compreensão, apoio, amizade e companhia.

Aos tios, primos, madrinhas e padrinho por sempre torcerem pelo meu sucesso e estarem ao meu lado. Aos meus avós (*in memoriam*), pois apesar da ausência física, sei que eles torcem pelo meu sucesso e minha felicidade.

Ao meu orientador, professor *Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira*, por aceitar minha orientação, pelos ensinamentos, compreensão, paciência, apoio científico e confiança.

Ao professor *Dr. Rivelilson Mendes de Freitas*, pela amizade, ensinamentos, conselhos, por nos estimular sempre, por tirar o melhor de nos, pelo exemplo de profissionalismo e pela enorme dedicação ao nosso PPGCF.

À professora *Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante* por me mostrar o caminho da pesquisa, desde a graduação. A ela devo a paixão pela pesquisa e a construção inicial dessa jornada acadêmica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Genética (LAPGENIC), por me acolherem e ajudarem sempre, Marcus Vinícius, Antonio Luiz, Adailson Júnior, Ana Maria e Sthefânia Coelho. Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX), em especial a *Amanda Almeida* pela amizade e cumplicidade durante esta etapa de minha vida, fazendo parte sempre. Quero você para sempre na minha vida. Também ao *Johanssy* e *Rusbene* pelo apoio constante.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará, por me acolher e permitir a realização dos testes, especialmente ao *Bruno Soares* e a profa. Dra. *Claúdia do Ó Pessoa*.

Aos colegas da turma de 2013 pelo apoio e incentivo durante esta jornada, em especial a *Jurandy do Nascimento Silva* pela paciência e calma, e aos funcionários do PPGCF por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Universidade Federal do Piauí por nos proporcionar a oportunidade de usufruir de sua estrutura técnico-científica e por permitir o crescimento profissional e intelectual.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro durante a pesquisa.

Aos membros da banca por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste trabalho.



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*

*(Martin Luther King)*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Biologia e epidemiologia do Câncer.....	20
3.2 Fármacos anticâncer: produtos naturais.....	23
3.3 Produtos naturais de origem animal.....	28
3.3.1 Anfíbios.....	28
3.3.2 Bufadienolídeos e atividades farmacológicas .....	29
Referências.....	31
<b>4 CAPÍTULO I: Ação antitumoral dos bufadienolídeos: Prospecção científica e tecnológica.....</b>	<b>39</b>
Resumo.....	40
Abstract.....	42
4.1 INTRODUÇÃO.....	43
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.4 CONCLUSÃO.....	53
Referências.....	54
<b>5 CAPÍTULO II: Atividade antiproliferativa dos extratos dos venenos de <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> (Bufonidae) da Região Amazônica.....</b>	<b>58</b>
Resumo.....	59
Abstract.....	61
5.1 INTRODUÇÃO.....	62
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.3 RESULTADOS.....	66
5.4 DISCUSSÃO.....	72
5.5 CONCLUSÃO.....	74
Referências.....	74
<b>6 CAPÍTULO III: Atividade citotóxica, alterações morfológicas e antileucêmicas causadas pelo bufadienolídeo Marinobufagina.....</b>	<b>80</b>
Resumo.....	81
Abstract.....	83

6.1 INTRODUÇÃO.....	84
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	85
6.3 RESULTADOS.....	90
6.4 DISCUSSÃO.....	101
6.5 CONCLUSÃO.....	106
Referências.....	106
<b>ANEXOS</b>	<b>112</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>BE/LA</b>	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
<b>HE</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>EPO</b>	<i>European Patent Office</i>
<b>WIPO</b>	<i>World Intellectual Property Organization</i>
<b>USPTO</b>	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória media
<b>PI</b>	Propriedade intelectual
<b>CIP</b>	Classificação Internacional de Patentes
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>RMF</b>	Extrato de <i>Rhinella marina</i> fêmea
<b>RMM</b>	Extrato de <i>Rhinella marina</i> macho
<b>RGF</b>	Extrato de <i>Rhaebo guttatus</i> fêmea
<b>RGM</b>	Extrato de <i>Rhaebo guttatus</i> macho
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-deoxiuridina
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>NCEs</b>	<i>New Chemical Entities</i>

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1</b>	Estágios do processo de carcinogênese.....	21
<b>Figura 2</b>	Estrutura química geral dos bufadienolídeos.....	30

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b>	Estrutura química dos bufadienolídeos.....	44
<b>Figura 2</b>	Artigos no período 2004 a 2014 para o termo bufadienolídeos.....	47
<b>Figura 3</b>	Depósitos de patentes no período 1964 a 2011, considerando as bases WIPO, INPI, ESPACENET e USPTO.....	50
<b>Figura 4</b>	Países que mais depositaram patentes envolvendo bufadienolídeos.....	51
<b>Figura 5</b>	Distribuição por CIP dos depósitos de pedidos de patentes encontrados nas bases consultadas.....	52

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b>	Cromatogramas do HPLC dos extratos de venenos de sapos de <i>R. marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> .....	67
<b>Figura 2</b>	Espectros ESI do íon quasi-molecular [M + H] <sup>+</sup> dos compostos identificados nos extratos de <i>R. marina</i> (macho/fêmea).....	68
<b>Figura 3</b>	Efeitos dos extratos dos venenos de <i>Rhinella marina</i> fêmea/macho (RMF/RMM) na incorporação de BrdU (5-bromo-2'deoxiuridina) em células leucêmicas (HL-60) após 24h de incubação.....	72

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1</b>	Estrutura molecular da marinobufagina.....	85
<b>Figura 2</b>	Inibição do crescimento de raízes de <i>Allium cepa</i> expostas a marinobufagina isolada do veneno de <i>Rhinella marina</i> após 72h de incubação.....	92
<b>Figura 3</b>	Inibição de divisão celular de meristemas de <i>Allium cepa</i> expostos a marinobufagina, isolada do veneno de <i>Rhinella marina</i> .....	93

<b>Figura 4</b>	Fotomicrografias de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas à marinobufagina na concentração de 0,01 µg/mL após 72h de incubação.....	94
<b>Figura 5</b>	Efeito do composto marinobufagina isolado do veneno de <i>Rhinella marina</i> na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinada por exclusão de azul de tripan após 24 h de incubação.....	95
<b>Figura 6</b>	Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica.....	97
<b>Figura 7</b>	Efeitos do composto marinobufagina isolado do veneno de <i>Rhinella marina</i> sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após 24 h de incubação.....	98
<b>Figura 8</b>	Integridade de membrana de células leucêmicas da linhagem HL-60 analisada com iodeto de propídeo através de citometria de fluxo após 24 h de incubação com a marinobufagina isolado do veneno de <i>Rhinella marina</i> .....	99
<b>Figura 9</b>	Externalização de fosfatidilserina analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 com anexina-V e 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD) após 24 h de incubação com a Marinobufagina isolado do veneno de <i>Rhinella marina</i> .....	100
<b>Figura 10</b>	Fragmentação do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 revelada com iodeto de propídeo e triton X-100 através de citometria de fluxo após 24 h de incubação com a marinobufagina isolado do veneno de <i>Rhinella marina</i> .....	101

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Tabela 1</b>	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014.....	22
<b>Tabela 2</b>	Produtos naturais ou fármacos utilizados na terapia do câncer.....	25

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1</b>	Número de artigos científicos por palavras-chave publicados nas bases de dados.....	46
<b>Tabela 2</b>	Total de depósitos de patentes pesquisadas nas bases do INPI, ESPACENET, USPTO e WIPO.....	49

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b>	Potencial citotóxico dos extratos de veneno de <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> em linhagem de células cancerígenas humanas.....	70
<b>Tabela 2</b>	Estudo hemolítico dos extratos de venenos de <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> e atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quantificados por ensaio Alamar Blue.....	71

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b>	Concentração das linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> do MTT.....	86
<b>Tabela 2</b>	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da molécula marinobufagina isolada do veneno de <i>Rhinella marina</i> avaliada pelo método MTT após 72h de incubação.....	91
<b>Tabela 3</b>	Índice mitótico e tamanho das raízes pelo sistema teste <i>Allium cepa</i> expostas a marinobufagina por 72 h.....	91

**Potencial farmacêutico anticâncer de extratos e da molécula marinobufagina obtidos a partir de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região Amazônica. KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO.** Orientador: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Qualificação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, UFPI, 2014.

## RESUMO

O tratamento do câncer sofre diversos desafios pelo fato da maioria dos quimioterápicos possuir efeitos adversos prejudiciais às células normais e as neoplasias apresentarem resistência farmacológica. Vários estudos estão sendo realizados no âmbito de produtos naturais com o intuito de desenvolver alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas. Neste contexto os bufadienólídeos se destacam como compostos isolados de venenos de sapos, que possuem diversas atividades biológicas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo estudar o potencial antitumoral *in vitro* de substâncias extraídas de venenos de sapos da região Amazônica. Foi realizada uma prospecção científica e tecnológica para avaliar os estudos e pedidos de depósitos de patentes relacionadas a ação antitumoral dos bufadienólídeos. Foi observado que apenas 9 artigos relacionavam os termos Bufadienólídeo e câncer e apenas um pedido de depósito de patente, que foi classificado com A61K, mostrando que ainda há pouco interesse tecnológico na atividade antitumoral dos bufadienólídeos. Uma bioprospecção da atividade antiproliferativa de extratos de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* fêmeas/machos da região Amazônica do Brasil, revelaram citotoxicidade contra células tumorais humanas de leucemia (HL-60), ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e cólon (HCT-116), sendo que o extrato de *R. marina* foi potencialmente mais citotóxico que o fármaco padrão doxorrubicina, com valores de  $CI_{50}$  variando de 0,01 (HL-60, SF-295 e HCT-116) a 0,23  $\mu\text{g/mL}$  (OVCAR-8). Por meio do teste de *Alamar blue* foi verificado que os extratos de *Rhinella marina* foram até 80 vezes mais seletivos contra células leucêmicas quando comparado com leucócitos normais. Os extratos obtidos de *R. marina* diminuíram a incorporação de BrdU ao DNA de células HL-60 em ambas concentrações testadas (0,1 e 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Foi avaliada a ação antileucêmica da molécula marinobufagina, o componente majoritário dos extratos de *R. marina*, a qual se mostrou altamente citotóxica contra as linhagens testadas ( $CI_{50}$  de 0,06 a 0,18  $\mu\text{g/mL}$ ), não causou hemólise em eritrócitos de camundongos (até 200  $\mu\text{g/mL}$ ). No teste *Allium cepa* nas maiores concentrações (0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) se mostrou tóxica e citotóxica, e causou alterações morfológicas e bioquímicas indicativas de morte celular por apoptose nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

**Palavras-chave:** Anticâncer. Atividade antiproliferativa. Bufadienólídeos. Marinobufagina. *Rhinella marina*.



**Anticancer pharmaceutical potential of extracts and marinobufagina molecule obtained from poisons *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* in the Amazon region. KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO.** Advisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Master's qualification. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Pharmacy, UFPI, 2014.

### ABSTRACT

Cancer treatment suffers many challenges because most chemotherapy drugs have harmful side effects to normal cells and cancer drug resistance present. Several studies are being conducted in the context of natural products in order to develop more effective and less toxic therapeutic alternatives. In this context bufadienolídeos are the compounds isolated from poison frog, who have various biological activities. Thus, the present study aimed to investigate the *in vitro* antitumor potential of substances extracted from poison frogs of the Amazon region. A scientific and technological exploration was performed to evaluate the studies and applications of patent applications related to antitumor action of bufadienolídeos. It was observed that only 9 articles related terms Bufadienolídeo and cancer and only one filing of patent, which was rated A61K, showing that there is little technological interest in the antitumor activity of bufadienolídeos. A bioprospecting antiproliferative activity of extracts of poisons *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* females / males in the Amazon region of Brazil, showed cytotoxicity against human tumor cell leukemia (HL-60), ovarian (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295 ) and colon (HCT-116), and the extract of *A. marina* was potentially more cytotoxic than doxorubicin standard drug with IC<sub>50</sub> values of 0.1 (HL-60, SF-295 and HCT-116) 0.23 mg / mL (OVCAR-8). By using the Alamar Blue test was found that the extracts were *Rhinella marina* up to 80 times more selective against leukemic cells when compared with normal leukocytes. The extracts obtained from *R. marina* decreased BrdU incorporation to the DNA in HL-60 cells at both concentrations tested (0.1 and 1 µg/mL). The antileukemic action of marinobufagina molecule, the major component in extracts of *R. marina* was evaluated, which was highly cytotoxic against the tested strains (IC<sub>50</sub> between 0.06 and 0.18 µg/mL), did not cause hemolysis in erythrocytes mice (up to 200 µg/mL). *Allium cepa* test at the highest concentrations (0.1 and 0.5 µg/mL) was cytotoxic and showed toxic and caused morphological and biochemical changes indicative of cell death by apoptosis at concentrations of 0.1 and 0.5 µg/mL.

**Keywords:** Anticancer. Antiproliferative activity. Bufadienolide. *Rhinella marina*.

## 1 INTRODUÇÃO

Há evidências de câncer encontrados em antigos restos mortais humanos e na literatura médica desde a antiguidade, que remonta aos tempos dos faraós no antigo Egito e do mundo clássico (NOBILI et al., 2009). Desde o século XX, o câncer tem se revelado como um crescente problema de saúde pública, cuja estimativa de incidência mundial é de cerca de 6 milhões de novos casos por ano, sendo a segunda maior causa de morte no mundo, ultrapassado apenas pelas doenças cardiovasculares (SRIVASTAVA et al., 2005).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o biênio 2014-2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INCA, 2013).

Entre 70% e 95% da população na maioria dos países em desenvolvimento, especialmente na Ásia, África, América Latina e Oriente Médio, usam medicamentos tradicionais para o cuidado com a saúde, inclusive contra o câncer (WALJI; WIKTOROWICZ, 2013). É estimado que pelo menos 40% de todos os medicamentos são derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais. No que se refere aos medicamentos antitumorais e antimicrobianos, esta porcentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011; BRASIL, 2012). Embora a química sintética e a triagem de alta produtividade (*High-throughput Screening*) tenham alcançado seu auge nas últimas décadas do século XX, as plantas e os animais ainda são os recursos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos (HELMSTÄDTER; STAIGER, 2014). Ao longo dos últimos 30 anos, aproximadamente 40% dos medicamentos terapêuticos desenvolvidos e aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) foram produtos naturais, derivados ou mimetizam os compostos sintéticos relacionados (NEWMAN; CRAGG, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Apesar da complexidade de muitos produtos naturais limitar as possibilidades de modificações químicas para otimizar o seu uso terapêutico e a quantidade necessária para os estudos pré-clínicos e clínicos, (CLARDY; WALSH, 2004), os produtos naturais tem se mostrado como a principal fonte de compostos farmacologicamente ativos, inclusive de quimioterápicos contra tumores sólidos e hematológicos (FERREIRA et al., 2010, 2011a, 2011b). Tanto estes compostos naturais como os semissintéticos podem ser utilizados para

bloquear, reverter ou prevenir o desenvolvimento de cânceres invasivos (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

Dentre os produtos naturais, as propriedades de secreção da pele de sapos são encontradas em diversas culturas ao redor do mundo. Este conhecimento tradicional evoluiu para o conceito de que a pele de anfíbios possa ser um tesouro de compostos biologicamente ativos. De fato, secreções nocivas ou tóxicas e a presença de amins biogênicas, peptídeos, bufadienolídeos, tetrodotoxinas e alcaloides lipófilos foram descritas há vários anos. A indústria farmacêutica já leva benefícios de vários compostos terapeuticamente relevantes presentes na pele de anfíbios. Esteróides bufadienolídeos, encontrados em espécies de sapo do gênero *Rhinella* (ex- *Bufo* no Novo Mundo), foram eficientes contra a proliferação *in vitro* de células cancerosas (SCIANI et al., 2012).

A utilização clínica de agentes quimioterápicos em pacientes com câncer é, muitas vezes, acompanhada por efeitos colaterais, devido à natureza tóxica dos fármacos. Estes efeitos colaterais são aceitáveis desde que os benefícios superem os riscos (MEHTA et al., 2010). Apesar destes tratamentos farmacológicos terem melhorado nos últimos anos, muitos pacientes continuam a relatar altos índices de sintomas adversos. Destes, náuseas, depressão, mielossupressão e fadiga são considerados os mais debilitantes e a sua ocorrência é associado com uma qualidade de vida reduzida (CARELLE et al., 2002; COLAGIURI et al., 2013). Diante do impacto socioeconômico, psicológico e fatal do câncer na sociedade, dos grandes investimentos econômicos e de recursos humanos feitos com o intuito de superar a resistência farmacológica de diversos tipos histológicos de câncer e dos efeitos adversos apresentados pela grande maioria dos quimioterápicos utilizados na clínica, este estudo teve como objetivo principal estudar o potencial antitumoral *in vitro* de substâncias e da molécula marinobufagina extraídas de venenos de sapos da região Amazônica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Estudar o potencial antitumoral *in vitro* de extratos e da molécula marinobufagina extraídas de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* da região Amazônica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a ação antitumoral dos bufadienolídeos;

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* contra linhagens de células tumorais e normais (mononucleares de sangue periférico e hemácias de camundongos);

- Quantificar a capacidade de inibição de síntese de DNA dos extratos de *Rhinella marina*;

- Determinar a citotoxicidade do composto isolado marinobufagina através do teste de MTT e no modelo vegetal *Allium cepa*;

- Estudar o mecanismo de ação da marinobufagina, extraída do veneno de *Rhinella marina*, utilizando testes de análise de viabilidade e morfologia de células leucêmicas (exclusão de azul de tripan, coloração com laranja de acridina/brometo de etídio e hematoxilina-eosina e citometria de fluxo).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Biologia e epidemiologia do Câncer

O câncer é caracterizado como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado. Derivadas principalmente por mutações genéticas das células somáticas, as células tumorais podem migrar para tecidos normais (vizinhos ou distantes), acarretando em metástases (tumores secundários) em locais diferentes da origem inicial do tumor primário (MASOUDI-NEJAD et al., 2014).

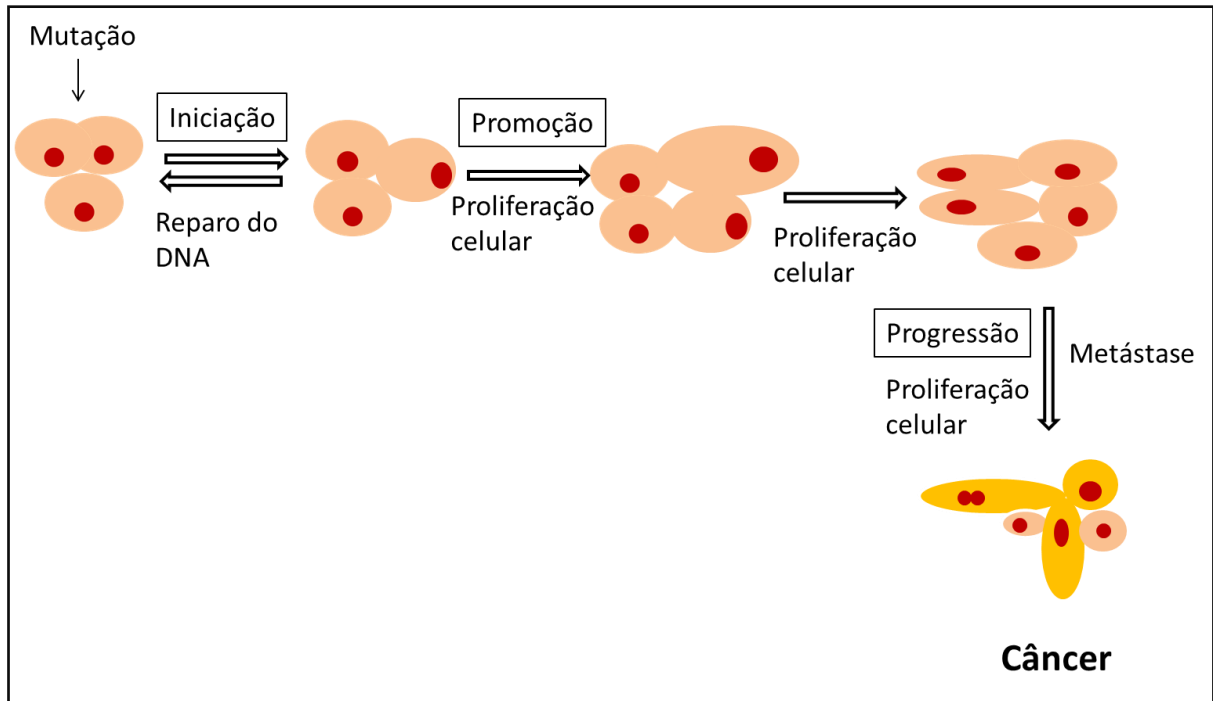
A palavra câncer tem origem latina (*cancer*) e significa “caranguejo”, cuja terminologia foi aplicada por sua semelhança com o modo de crescimento infiltrante, comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e impedir sua remoção (ALMEIDA et al., 2005). A grande complexidade dos cânceres gera consideráveis desafios para a descrição de sua biologia, e inspira o estudo do câncer no contexto de sistemas moleculares, celulares e fisiológicos (MASOUDI-NEJAD; ASGARI, 2014).

Seis propriedades são as condições necessárias para que uma célula se torne maligna, são elas: auto-suficiência em sinais de crescimento, desconsideração de sinais inibidores do crescimento, fuga da apoptose, imortalização, promoção da angiogênese e formação de metástases. A angiogênese, o processo de geração de novos vasos sanguíneos, que se infiltram no tumor, é essencial para o seu crescimento para além do tamanho crítico de 0,2 mm. A metástase é o nome empregado para a invasão e colonização de órgãos pelas células cancerosas, isto é, a formação de tumores secundários. Como resultado, os tecidos invadidos sofrem desorganização histológica, disfunção fisiológica, privação de nutrientes e, porventura, morte celular (KROLL; FERRANTINI; DOMANY, 2010).

O processo de carcinogênese é conduzido através de mutações e modificações epigenéticas em genes que regulam a replicação e a manutenção da integridade do genoma. É um processo lento e multifatorial e é dividido basicamente em três estágios: iniciação, promoção e progressão (**Figura 1**). A iniciação ocorre através da exposição de células normais a carcinógenos, que podem ser agentes químicos, vírus, radiação ou luz solar. Esta transformação leva anos para se manifestar. No segundo estágio, a célula iniciada sofre um longo período de contato com o agente transformador, quando pelo menos dois mecanismos independentes estão envolvidos: a mitose e a ativação gênica. A progressão é caracterizada

por alterações metabólicas e morfológicas identificadas como perda de diferenciação, proliferação descontrolada e alta agressividade das células malignas, evoluindo para manifestações clínicas e metástases (ESSERS; VERMEULEN; HOUTSMULLER, 2006; STATES; OUYANG; HELM, 2014).

**Figura 1** – Estágios do processo de carcinogênese.



Ainda que o câncer indique heterogeneidades genóticas e fenotípicas, todos os tumores malignos adquirem atributos de crescer além dos limites conferido às células normais. O aumento clonal de uma célula alterada depende da crescente incapacidade de morrer por apoptose e do descontrolo da sua capacidade proliferativa. Consequentemente, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências comprovam que a resistência a apoptose é uma das características mais acentuadas da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004). De fato, o diagnóstico do processo de tumorigênese mostra que a disposição de resistir à morte pode ser adquirida por diversos mecanismos e ocorre em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Dentre estes, a resistência à morte por apoptose em células que resistiram ao controle do crescimento e da diferenciação normais realizados por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular inclusive aquela induzida por hipóxia, por lesões no DNA ou por espécies reativas do oxigênio (ZORNIG et al., 2001).

A cada ano, cerca de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer em todo o mundo, sete milhões de pacientes morrem de câncer e 25 milhões de pessoas vivem

atualmente com o diagnóstico de câncer (POPAT et al., 2013; TRAEBERT et al., 2013). São esperados para o ano de 2014 um total de 204 mil casos novos para o sexo masculino e 190 mil para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (**Tabela 1**) (INCA, 2014).

**Tabela 1** - Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, exceto pele não melanoma, na população brasileira (por 100 mil habitantes).

HOMENS		MULHERES	
LOCALIZAÇÃO PRIMARIA	CASOS NOVOS	LOCALIZAÇÃO PRIMARIA	CASOS NOVOS
Próstata	70,42	Mama feminina	56,09
Traqueia, brônquios e pulmão	16,79	Colo do útero	15,33
Cólon e reto	15,44	Cólon do reto	17,24
Estomago	13,19	Glândula tireoide	7,91
Cavidade oral	11,54	Traqueia, brônquio e pulmão	10,75
Esófago	8,18	Estomago	7,41
Bexiga	6,89	Ovário	5,58
Laringe	7,03	Corpo do útero	5,79
Linfoma não Hodgkin	5,04	Linfoma não Hodgkin	4,77
Sistema nervoso central	5,07	Sistema nervoso central	4,05

**Fonte:** Instituto Nacional do Câncer (2014).

Com relação aos homens, o câncer de próstata lidera o ranking dos mais incidentes em todas as regiões do Brasil, com 70,42 casos novos a cada 100 mil habitantes, seguidos de traqueia, brônquios e pulmão com 16,49 novos casos. Em relação às mulheres, destaca-se o câncer de mama com 56,09 casos novos a cada 100 mil habitantes, seguido de colo do útero (15,33 casos). A idade é o principal fator de risco e, o número de casos aumenta de forma acelerada após os 50 anos. Sua ocorrência está relacionada ao processo de urbanização da

sociedade, evidenciando maior risco de adoecimento nas mulheres com elevado nível socioeconômico (INCA, 2014).

### 3.2 Fármacos anticâncer: produtos naturais

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais ao interferir na síntese ou transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou diretamente na produção de proteínas, atuando, na maioria das vezes, em células em divisão (FERRARI; HERZBERG, 1998; FERREIRA et al., 2011a). É desejável usar na quimioterapia doses mais altas, capazes de atingir o maior nível de morte celular possível. Considerando-se um tumor de 1 g (cerca de  $10^9$  células), cada ciclo de terapia mata cerca de 99% das células. Porém, é imprescindível repetir o tratamento em múltiplos ciclos para matar todas as células tumorais (KATZUNG, 2003).

O câncer é uma das doenças não transmissíveis mais importantes e caras enfrentada pelos sistemas de cuidados de saúde a nível mundial. No entanto, em países de alta renda, os principais ganhos em alguns tipos de câncer (por exemplo, de mama e de intestino) são compensados por resultados cada vez mais divergentes entre populações ricas e carentes. Evidências mostram que o custo do câncer está se tornando, ou já se tornou, inacessíveis em muitos países, por conta da quantidade e do valor de cada medicamento (CHALKIDOU et al., 2014). mostrando, assim que os custos de tratamento com o câncer têm aumentado rapidamente e que todos os sistemas de saúde têm de enfrentar a questão do acesso à inovação terapêutica do câncer bem como o financiamento de fármacos extremamente caros (BONASTRE et al., 2014).

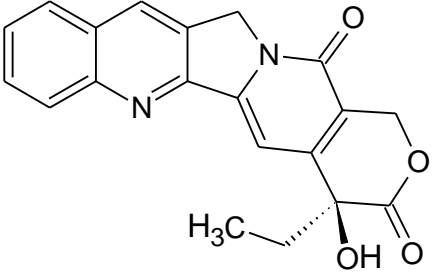
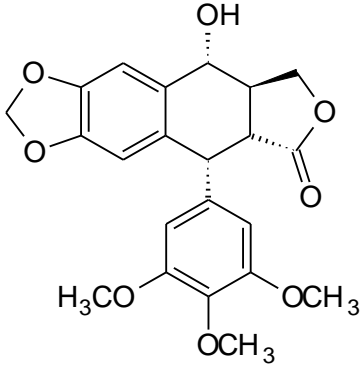
Segundo Dewick (1996), através da bioprospecção de 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de plantas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute of United States*, NCI-US) identificou importantes compostos antitumorais tais como paclitaxel, docetaxel, vimblastina, vincristina, vindesina, camptotecina, irinotecano, etoposídeo e tenoposídeo (SRIVASTAVA et al., 2005). De fato, cerca de 64% das drogas utilizadas atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais (**Tabela 1**) (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Devido à grande importância que as substâncias naturais representam na prática clínica, inúmeros análogos foram sintetizados na tentativa de se obter fármacos mais potentes. Assim foi com o diterpeno Paclitaxel (Taxol®) que, inicialmente, mostrou resultados

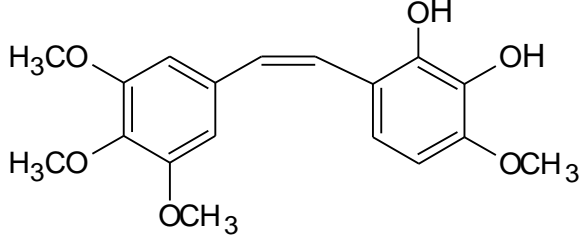
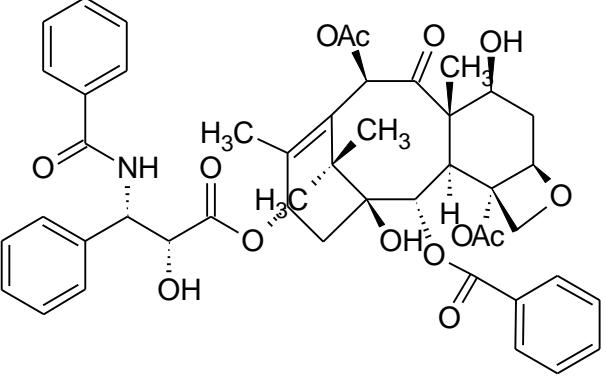


promissores nas fases I e II em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e foi aprovado pelo FDA para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER; VERMORKEN, 1998). Apesar de ter sido a droga mais vendida no ano de 2000, o paclitaxel apresenta baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água (SCHIFF et al., 1979; HAYASHI et al., 2003) e causa fortes náuseas, formigamento nos pés e mãos, leucopenia e trombocitopenia. Alguns anos depois surgiu o Docetaxel (Taxotere®), um análogo estrutural com propriedades farmacológicas melhores que o taxol (atividade antitumoral e solubilidade aquosa), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão, embora cause supressão da medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos e alopecia (RINGEL; HORWITZ, 1991). Com solubilidade 1.800 vezes maior que o paclitaxel, a pró-droga Isotaxel surgiu como uma molécula inativa, mas após 12 min em pH fisiológico ocorre a conversão do isotaxel a taxol (HAYASHI et al., 2003). Já o Nab-paclitaxel (ABI-007; Abraxane®) é uma nova formulação do paclitaxel que dispensou o uso do cremofor como solvente, diminuiu os efeitos colaterais (neuropatia periférica e neutropenia, principalmente) e aumentou a eficácia do tratamento quando comparada ao paclitaxel e docetaxel (ISMAEL et al., 2008).

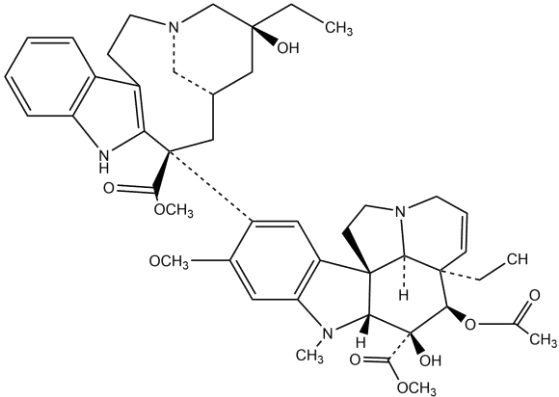
**Tabela 2** – Produtos naturais ou fármacos utilizados na terapia do câncer.

Estrutura	Classe / Origem	Mecanismo de Ação Original / Derivados	Atividade citotóxica e antitumoral	Referência
 <p>Camptotecina A-1</p>	Alcalóide <i>Camptotheca acuminata</i>	Inibição da topoisomerase I Topotecan (Hycamptin®) Irinotecan (Camptosar®) Rubitecan (Orathecin®) Lurtotecan (NX211) Mesilato de Exatecan (DX-8951f)	Mama, cólon, reto e pâncreas	WALL et al. (1966); REDINBO et al. (1998); STAKER et al. (2002); ROYCE et al. (2004); SRIVASTAVA et al. (2005)
 <p>Podofilotoxina</p>	Lignano <i>Podophyllum peltatum</i>	Parada do ciclo celular na metáfase devido ao bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II Etoposídeo (Vepesid®) Tenoposídeo Vumon®	Tumores de Wilms, de pulmão, linfomas, leucemia aguda, pulmão, cérebro e contra vários cânceres genito-urinários (ovário, bexiga e teratomas)	UTSUGI et al. (1996); SCHACTER (1996); SUBRAHMANYAM et al. (1998); GORDALIZA et al. (2004)

**Tabela 2** - Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer (continuação).

Estrutura	Classe / Origem	Mecanismo de Ação Original / Derivados	Atividade citotóxica e antitumoral	Referência
 <p data-bbox="443 726 667 758">Combretastatina A-1</p>	<p data-bbox="952 470 1176 542">Estilbeno <i>Cobretum caffrum</i></p>	<p data-bbox="1220 470 1512 726">Despolimerização e supressão da dinâmica dos microtúbulos  Combretastatina A-4 Combretastatina A-4 fosfato</p>	<p data-bbox="1556 470 1780 542">Cólon, pulmão e leucemias</p>	<p data-bbox="1803 470 2049 582">OHSUMI et al. (1998); SRIVASTAVA et al. (2005)</p>
 <p data-bbox="504 1236 616 1268">Paclitaxel</p>	<p data-bbox="952 782 1176 853">Diterpenóide <i>Taxus brevifolia</i></p>	<p data-bbox="1220 782 1512 1037">Estabilização dos microtúbulos  Docetaxel (Taxotere®) Isotaxel Nab-paclitaxel (Abraxane®)</p>	<p data-bbox="1556 782 1780 949">Pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço</p>	<p data-bbox="1803 782 2049 1037">SCHIFF et al. (1979); EISENHAEUER e VERMORKEN, (1998); HAYASHI et al. (2003); ISMAEL et al. (2008)</p>

**Tabela 2** - Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer (continuação).

Estrutura	Classe / Origem	Mecanismo de Ação Original / Derivados	Atividade citotóxica e antitumoral	Referência
	Alcalóide <i>Vinca rosea</i>	Despolimerização dos microtúbulos do fuso mitótico e do citoesqueleto Vinblastina (Velbe®) Vincristina (Oncovin®) Vindesina (Eldisine®) Vinorelbina (Navelbine®)	Rins, testículos cabeça e pescoço, coriocarcinomas leucemia linfocítica aguda, pulmão e mama	SRIVASTAVA et al. (2005)
Vinblastina				

### 3.3 Produtos naturais de origem animal

#### 3.3.1 Anfíbios

Novos nichos e interações ecológicas ganharam importância nas últimas décadas, como alvos alternativos para a pesquisa de produtos bioativos. Deste modo, após bilhões de anos de evolução, a natureza contempla uma enorme diversidade de organismos terrestres e marinhos. No que diz respeito ao nosso planeta, é estimado que existam cerca de 30 milhões de insetos, 1,5 milhão de algas, 1,5 milhão de fungos, 1 milhão de animais, além da existência de mais de 400 mil espécies de plantas (BOEUF, 2011). Além disso, o conhecimento de novos alvos terapêuticos amplia a possibilidade da descoberta de novas moléculas com potencial anticâncer.

O nome ‘anfíbios’ provém do grego *amphibios* (*amphi*= dual, *bios*= vida) que significa vida dupla e corresponde às duas fases da vida desta classe de animais, uma na água e outra na terra. Os anfíbios surgiram no final do período Devoniano com mudança do ambiente de aquático para terrestre em função da conquista progressiva de um conjunto de adaptações morfofuncionais e comportamentais, sobrevivendo tanto em ambiente aquático como terrestre devido à evolução e a outras adaptações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, com desenvolvimento de pernas em lugar de nadadeiras, alterações no metabolismo e na excreção para formar menos produtos nitrogenados tóxicos e, além disso, aquisição de órgãos dos sentidos, que funcionam tanto no ar como na água (TOLEDO; JARED, 1995). Os anfíbios são membros do Reino *Animalia*, Filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, Classe *Amphibia* e se subdividem nas seguintes ordens: *Anura* ou *Salientia* (sapos, rãs e pererecas); *Urodela* ou *Caudata* (Salamandras e tritões); *Ápoda* ou *Gymnophiona* (cobras cegas ou cecília) (DUELLMAN, 1992; CLARKE, 1996).

A pele dos anfíbios é um órgão complexo morfológica, fisiológica e bioquimicamente que atende a uma ampla gama de funções para a sobrevivência de anfíbios, como a defesa antimicrobiana, anti-predador, a respiração, a regulação da água, controle de temperatura, e reprodução. Ao longo das últimas décadas, vários estudos têm centrado sobre os componentes bioativos em pele de anfíbios. São um tesouro de peptídeos bioativos e proteínas que possuem atividades terapêuticas potentes contra várias condições fisiopatológicas, como câncer, doenças cardiovasculares entre outros (ZHANG et al., 2010; BHATTACHARJEE; GIRI; GOMES, 2011).

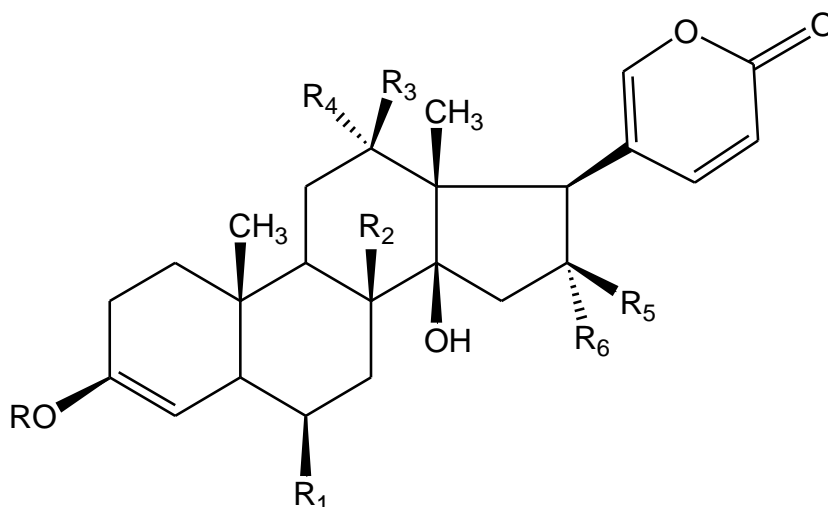
A família *Bufo*, contém cerca de 50 gêneros e 550 espécies originalmente difundidas por quase todo o globo terrestre, exceto Austrália, regiões oceânicas, Madagascar, Ártico e Antártico (PRAMUK, 2006). Esta família foi recentemente revisada por vários autores devido as suas relações filogenéticas. Estas revisões mudaram a nomenclatura de vários táxons, entre eles, o gênero *Bufo* (FROST et al., 2006; PRAMUK, 2006; CHAPARRO et al., 2007). Chaparro e colaboradores (2007), baseados em dados moleculares, sugeriram que a maior parte das espécies de *Bufo* da América do Sul fossem colocadas no gênero *Rhinella*.

No Brasil, a família *Bufo* é representada por sete gêneros, sendo *Rhinella* o mais representativo, com 40 espécies. São conhecidos vulgarmente pelo nome genérico de "sapo-cururu" (do tupi *kuru'ru* - sapo grande) e inclui distintos habitats. Uma das espécies mais analisadas na região amazônica é a *Rhinella marina*, antigo *Bufo marinus* (EASTEAL, 1963).

### 3.3.2 Bufadienólídeos e atividades farmacológicas

Bufadienólídeos são esteróides cardioativos poli-hidroxiados com 24 carbonos que se apresentam na forma livre ou conjugada na posição C-3 com sulfatos, ésteres dicarboxílicos e aminoácidos, sendo caracterizados por conter um anel de lactona insaturada (NOGAWA et al., 2001; BICK et al., 2002; FERREIRA et al., 2013) (**Figura 2**). Mais de 250 bufadienólídeos já foram identificados tanto de vegetais (famílias *Crassulaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae*, *Melanthaceae*, *Ranunculaceae* e *Santalaceae*) quanto de animais. São moléculas encontradas nos tecidos e fluidos corporais de sapos em cerca de 10 espécies do gênero *Rhinella* (anteriormente *Bufo*) (KRENN; KOPP, 1998), uma cobra (*Rhabdophis tigrinus*) (HUTCHINSON et al., 2007) e um artrópode (*Photinus*) (EISNER et al., 1978). A grande variedade de compostos conhecidos é principalmente devido ao número e a posição dos substituintes (MENG et al., 2001; LENAERTS et al., 2013).

**Figura 2** – Estrutura química geral dos bufadienolídeos.



Os egípcios são considerados a primeira civilização a utilizar cila (*Scilla maritima*), uma planta que contém o composto cilareno A, o primeiro bufadienolídeo encontrado, cuja estrutura foi elucidada em 1933 e usada no tratamento de doenças do coração. Culturas asiáticas (os chineses foram os primeiros) usavam diferentes venenos da pele de sapo para a preparação de remédios (KRENN; KOPP, 1998). *Chan'Su* é o veneno seco do sapo *Bufo bufo gargarizans* e/ou *Bufo melanostictus*, é usado em algumas regiões da China e alguns outros países asiáticos devido às suas propriedades anestésicas, anti-inflamatórias, cardiotônicas, diuréticas e hemostáticas (YE et al., 2004; XU et al., 2007; QI et al., 2011). Os bufadienolídeos são a principal classe de compostos biologicamente ativos presentes nesta preparação galênica. Estudos revelaram que estes compostos têm a capacidade de regular o metabolismo de crescimento e diferenciação celular, apoptose e glicose (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; DONG et al., 2011). Alguns bufadienolídeos possuem atividade antitumoral, como descrito para bufalina, esquilareina, bufotalina, gamabufotalina, cinobufotalina e cinobufagina (XU et al., 2007).

Bufalina e cinobufagina são dois importantes bufadienolídeos componentes do *Chan'Su*. Foram relatados por aumentar a vasoconstrição e têm sido muito utilizados no tratamento para a insuficiência cardíaca através da medicina chinesa nos países asiáticos (YU et al., 2008). A bufalina foi relatada por induzir a diferenciação potente em linhagens celulares de leucemia mielóide humana (LEE et al., 1997). Outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a cinobufagina e os seus compostos ativos (por exemplo, bufalina e cinobufagina) exibem significativa atividade antitumoral, incluindo a inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular e da apoptose, a interrupção do ciclo celular, inibição

da angiogênese, reversão da resistência a multidrogas e ainda interfere na regulação da resposta imune (ZHU; LIU, 2006). A indução de apoptose por bufadienolídeos foi associada com ativação da via mitocondrial. Além disso, a eficácia *in vivo* de bufalina, o bufadienolídeo mais bem estudado, foi estabelecido no modelo de xenoenxerto de câncer humano das células em camundongos nus atímicos (DONG et al., 2011).

Dados clínicos mostram que cinobufacina, um bufadienolídeo, utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos (por exemplo, gencitabina e oxaliplatina) possui uma atividade anticancerígena significativa contra cânceres humanos, tais como o carcinoma hepatocelular, o câncer de pulmão de não pequenas células, o câncer do pâncreas, vesícula biliar e carcinoma. Estes indicaram que cinobufacina podem ter atividade anticâncer eficaz e com baixa toxicidade e poucos efeitos secundários (MENG et al., 2009).

Peptídeos de anfíbios representam um capítulo importante na área vastamente investigada de substâncias antimicrobianas, pois eles têm demonstrado inibição do crescimento de numerosas espécies de bactérias, fungos, protozoários e também alguns tipos de células tumorais sem mostrar significância hemolítica (BATISTA et al., 2001). A marinobufagina exibiu atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CUNHA-FILHO et al., 2005)

Atividades contra parasitas têm sido descritas para alguns bufadienolídeos, como a helebrigenina e telocinobufagenina, extraídos do veneno de *Rhinela jimi*, que mostraram efeitos contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi*, sem apresentar citotoxicidade contra macrófagos de camundongos (TEMPONE et al., 2008). Além de possuir ação contra a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, agindo sobre a sub unidade  $\alpha$  desta bomba, provocando um efeito vasoconstritor (FEDOROVA; BAGROV, 1997).

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; PAZ, M.T.L.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

BAGROV, A.Y.; SHAPIRO, J.I.; FEDOROVA, O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacology Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.



BATISTA, C.V.F.; SCALONI, A.; RIGDEN, D.J.; SILVA, L.R.; ROMERO, A.R.; DUKOR, R.; SEBBEN, A.; TALAMO, F.; BLOCH, C. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS Letters**, v. 494, p. 85-89, 2001.

BHATTACHARJEE, P.; GIRI, B.; GOMES, A. Apoptogenic activity and toxicity studies of a cytotoxic protein (BMP1) from the aqueous extract of common Indian toad (*Bufo melanostictus* Schneider) skin. **Toxicon**, v. 57, p. 225-236, 2011.

BICK, R.J.; POINDEXTER, B.J.; SWENEY, R.R.; DASGUPTA, A. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than NaC, KC-ATPase blocking. **Life Science**, v. 72, p. 699-709, 2002.

BOEUF, G. Marine biodiversity characteristics. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 435-440, 2011.

BONASTRE, J.; CHEVALIER, J.; LAAN, C.V.; DELIBES, M.; POUVOURVILLE, G. Access to innovation: Is there a difference in the use of expensive anticancer drugs between French hospitals? **Health Policy**, v. 116, p. 162-169, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p.

CARELLE, N.; PIOTTO, E.; BELLANGER, A.; GERMANAUD, J.; THUILLIER, A.; KHAYAT, D. Changing Patient Perceptions of the Side Effects of Cancer chemotherapy. **CANCER**, v. 95, p. 155-163, 2002.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions: Their normal functioning and potencial medical applications. **Biological Reviews**, v. 72, p. 365-379, 1997.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

CHALKIDOU, K.; MARQUEZ, P.; DHILLON, P.K.; TEERAWATTANANON, Y.; ANOTHASINTAWEE, T.; GADELHA, C.A.G.; SULLIVAN, R. Evidence-informed frameworks for cost-effective cancer care and prevention in low, middle, and high-income countries. **The Lancet Oncology**, v. 15, p. 119-131, 2014.

CHAPARRO, J.C.; PRAMUK, J.; GLUESENKAMP, A.G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from the cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, p. 203-212, 2007.

COLAGIURI, B.; DHILLON, H.; BUTOW, P.N.; JANSEN, J.; COX, K.; CERT, O.; JACQUET, J. Does Assessing Patients' Expectancies About Chemotherapy Side Effects Influence Their Occurrence? **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 46, p. 275-281, 2013.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CUNHA-FILHO, G.A.; SCHWARTZ, C.A.; RESCK, I.S.; MURTA, M.M.; LEMOS, S.S.; CASTRO, M.S.; KYAW, C.; PIRES JÚNIOR, O.R.; LEITE, J.R.S.; BLOCH JÚNIOR, C.; SCHWARTZ, E.F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777-782, 2005.

DEWICK, P.M. **Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. Trease and Evans' pharmacognosy**. Londres: Saunders, 1996. p. 409-425.

DONG, Y.; TIN, S.; LI, J.; JIANG, C.; YE, M.; HU, H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis**, v. 16, p. 394-403, 2011.

DUELLMAN, W.E. Reproductive strategies of frogs. **Scientific American**, v.267, p. 80-87, 1992.

EASTEAL, S. "*Bufo marinus*" Catalogue of American Amphibians and Reptiles. **American Society Ichthyology Herpetology**, v. 395, p. 1-395, 1963.

EISENHAUER, E.A.; VERMORKEN, J.B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, v.55, p. 5-30, 1998.

EISNER, T.; WIEMER, D.F.; HAYNES, L.W.; MEINWALD, J. Lucibufagins: Defensive steroids from the fireflies *Photinusignitus* and *P. marginellus* (Coleoptera: Lampyridae). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, p. 905-908, 1978.

ESSERS, J.; VERMEULEN, W.; HOUTSMULLER, A.B. DNA damage repair: anytime, anywhere? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 240-246, 2006.

FEDOROVA, O.V.; BAGROV, A.Y. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K Pump Inhibitors, Ouabain and Marinobufagenin Evidence of Interaction With Different a-Subunit Isoforms. **American Journal of Hypertension**, v. 10, p. 929-935, 1997.

FERRARI, C.; HERZBERG, V. **Tenho câncer e agora? Enfrentado o câncer sem medos ou fantasias**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, 1998.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497–504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373–1384, 2011a.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011b.

FERREIRA, P.M.P.; LIMA, D.J.B.; DEBIASE, B.W.; SOARES, B.M.; MACHADO, K.C.; NOROMHA, J.C.; RODRIGUES, D.J.; SHINHORIN, A.P.; PESSOA, C.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo gutatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v.72, p.43-51, 2013.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum Natural History**, v. 297, p. 1–370, 2006.

GORDALIZA, M.; GARCIA, P.A.; DEL CORRAL, J.M.; CASTRO, M.A.; GOMEZ-ZURITA, M.A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**, v. 44, p. 441-459, 2004.

HAYASHI, Y., SKWARCZYNSKI, M., HAMADA, Y., SOHMA, Y., KIMURA, T., KISO, Y.A. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3782-3784, 2003.

HELMSTÄDER, A.; STAIGER, C. Traditional use of medicinal agents: a valid source of evidence. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 4-7, 2014.

HUTCHINSON, D.A.; MORI, A.; SAVITZKY, A.H.; BURGHARDT, G.M.; WU, X.; MEINWALD, J.; SCHOROEDER, F.C. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 2265-70, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014.

ISMAEL, G.F.V.; ROSA, D.D.; MANO, M.S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 81-91, 2008.

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**. USA: McGraw-Hill Medical, p.1088, 2003.

KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1-29, 1998.

KROLL, K.M.; FERRANTINI, A.; DOMANY, E. Introduction to biology and chromosomal instabilities in câncer. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 389, p. 4374-4388, 2010.

LEE, D.Y.; YASUDA, M.; YAMAMOTO, T.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. **Life Sciences**, v. 60, p. 127-134, 1997.

LENAERTS, C.; DEMEVER, M.; GERBAUX, P.; BLANKERT, B. Analytical aspects of marinobufagenin. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 193-201, 2013.

MASOUDI-NEJAD, A.; BIDKHORI, G.; ASHTIANI, S.H.; NAJAFI, A.; BOZORGMEHR, J.H.; WANG, E. Cancer systems biology and modeling: Microscopic scale and multiscale approaches. *Seminars in Cancer Biology*, **Seminars in Cancer Biology**, *In press*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.03.003>

MASOUDI-NEJAD, A.; ASGARI, Y. Metabolic Cancer Biology: Structural-based analysis of cancer as a metabolic disease, new sights and opportunities for disease treatment. **Seminars in Cancer Biology**, *In press*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.01.007>

MEHTA, S.R.; TANGUAY, J.F.; EIKELBOOM, J.W.; JOLLY, S.S.; JOYNER, C.D.; GRANGER, C.B.; FAXON, D.P.; RUPPRECHT, H.J.; BUDAJ, A.; AVEZUM, A.; WIDIMSKY, P.; STEG, P.G.; BASSAND, J.J.; MONTALESCOT, G.; MACAYA, C.; PASQUALE, G.D.; NIEMELA, K.; AJANI, A.E.; WHITE, H.D.; CHROLAVICIUS, S.; GAO, P.; FOX, K.A.A.; YUSUF, S. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. **Lancet**, v. 376, p. 1233-1243, 2010.

MENG, Y.; WHITING, P.; SIK, V.; REES, H.H.; DINAN, L. Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborustorquatus* (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v. 57, p. 201-407, 2001.

MENG, Z., YANG, P., SHEN, Y., BEI, W., ZHANG, Y., GE, Y., NEWMAN, R.A., COHEN, L., LIU, L., THORNTON, B., CHANG, D.Z., LIAO, Z., KURZROCK, R. Pilot study of fhuachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, v. 115, p. 5309–5318, 2009.

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, p. 311-335, 2012.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365–378, 2009.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G.R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148–1152, 2001.

OHSUMI, K.; NAKAGAWA, R.; FUKUDA, Y.; HATANAKA, T.; MORINAGA, Y.; NIHEI, Y.; OHISHI, K.; SUGA, Y.; AKIYAMA, Y.; TSUJI, T. Novel combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 3022-3032, 1998.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Natural Reviews Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

POPAT, K.; MCQUEEN, K.; FEELEY, T.W. The global burden of cancer. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 27, p. 399-408, 2013.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of south American toad *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined analyses. **Zoological Journal of Linnean Society**, v. 146, p. 407-452, 2006.

QI, F.; LI, A.; INAGAKI, Y.; KOKUDO, N.; TAMURA, S.; NAKATA, M.; TANG, W. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 342–349, 2011.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

REDINBO, M.R.; STEWART, L.; KUHN, P.; CHAMPOUX, J.J.; HOL, W.G.J. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. **Science**, v. 279, p. 1504-1513, 1998.

RINGEL, I.; HORWITZ, S.B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 288-291, 1991.

ROYCE, M.E.; ROWINSKY, E.K.; HOFF, P.M.; COYLE, J.; DE JAGER, R.; PAZDUR, R.; SALTZ, L.B. A phase II study of intravenous exatecan mesylate (DX-8951f) administered daily for five days every three weeks to patients with metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. **Investigational New Drugs**, v. 22, p. 53-61, 2004.

SCHACTER, L. Etoposide phosphate: what, why, where, and how? **Seminars Oncology**, 23: 1-7, 1996.

SCHIFF, P.B.; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Nature**, v. 277, p. 665-667, 1979.

SCIANI, J.M.; AS-JÚNIOR, P.L.; FERREIRA, A.K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; PIMENTA, D.C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 10-18, 2012.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K.; GUPTA, M.M.; KHANUJA, P.S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5892-5908, 2005.

STAKER, B.L.; HJERRILD, K.; FEESE, M.D.; BEHNKE, C.A.; BURGIN, A.B.; STEWART, L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 15387-15392, 2002.

STATES, J.C.; OUYANG, M.; HELM, C.W. Systems approach to identify environmental exposures contributing to organ-specific carcinogenesis. **Cancer Epidemiology**, v. 38, p. 321-327, 2014.

SUBRAHMANYAM, D., RENUKA, B., RAO, C. B., SAGAR, P. S., DEEVI, D. S., BABU, J. M., VYAS, K. Novel D-Ring Analogues of Podophyllo-.233 toxin as Potent Anti-Cancer Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 1391-1396, 1998.

TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; DE ANDRADE JÚNIOR, H.F.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13-21, 2008.

TOLEDO, R.C.; JARED, C. Estudo histológico das macroglândulas lombares de *Pleurodema thaul* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, p. 421-428, 1989.

TRAEBERT, J.; SCHNEIDER, I.J.C.; COLUSSI, C.F.; LACERDA, J.T. Burden of disease due to cancer in a Southern Brazilian state. **Cancer Epidemiology**, v. 37, p. 788-792, 2013.

UTSUGI, T.; SHIBATA, J.; SUGIMOTO, Y.; AOYAGI, K.; WIERZBA, K.; KOBUNAI, T.; TERADA, T.; OH-HARA, T.; TSURUO, T.; YAMADA, Y. Antitumor activity of a novel podophyllotoxin derivative (TOP-53) against lung cancer and lung metastatic cancer. **Cancer Research**, v. 56, p. 2809-2814, 1996.

WALJI, R.; WIKTOROWICZ, M. Governance of natural health products regulation: An iterative process. **Health Policy**, v. 111, p. 86–94, 2013.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H.; McPHAIL, A.T.; SIM, G. A. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, p. 3888-3890, 1966.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p.

XU, W.; LUO, H.; ZHANG, Y.; SHAN, L.; LI, H.; YANG, M.; LIU, R.; ZHANG, W. Simultaneous determination of five main active bufadienolides of Chan Su in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 859, p. 157–163, 2007.

YE, M.; QU, G.; GUO, H.; GUO, D. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure–activity relationships. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 91, p. 87–98, 2004.

YU, C.H.; KAN, S.F.; PU, H.F.; CHIEN, E.J.; WANG, P.S. Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. **Cancer Science**, v. 99, p. 2467-2476, 2008.

ZHANG, Y.; YU, G.; WANG, Y.; ZHANG, J.; WEI, S.; LEE, W.; ZHANG, Y. A novel annexin A2 protein with platelet aggregation-inhibiting activity from amphibian *Bombina maxima* skin. **Toxicon**, v. 56, p. 458–465, 2010.

ZHU, XY; LIU, L. M. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobufacini injection and its active ingredient. **Tumor Journal of World**, v. 5, p. 272–275, 2006.

ZORNIG, M.; HUEBER, A.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1551, p. 1-37, 2001.

**CAPÍTULO I:**

**4 Ação antitumoral dos bufadienólídeos: Prospecção científica e tecnológica**

**(Artigo a ser submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada)**



## **Ação antitumoral dos bufadienolídeos: prospecção científica e tecnológica**

Kátia da Conceição Machado<sup>1</sup>, Samara Ferreira de Carvalho Oliveira<sup>2</sup>,  
Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, 64607-670, Picos, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

### **RESUMO**

O câncer é uma doença genética que ocorre quando a informação no DNA celular fica danificada, levando a padrões anormais da expressão do gene. Nas pesquisas de levantamento etnofarmacológico, os registros de usos de animais para fins medicinais podem abrir diversas linhas para investigação farmacológica de seus componentes bioativos. Bufadienolídeos são esteróides cardioativos encontrados nos extratos de venenos de sapos e que já tem sido estudado por sua ação antitumoral. Este trabalho teve como objetivo principal realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre os bufadienolídeos analisando sua ação antitumoral. Foram utilizadas bases de periódicos *ScienceDirect*, *PubMed*, *Web of Science* e Periódicos CAPES, esta busca foi realizada compreendendo o período de 2004 a 2013. E as bases tecnológicas *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)*, *United States Patent and Trademark Office (USPTO)* e banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), esta pesquisa foi realizada em janeiro de 2014. Após a pesquisa foi constatado que apenas 9 artigos dos encontrados realmente tratavam da ação antitumoral dos bufadienolídeos e que 1 pedido de depósito de patente estava presente nos bancos de dados analisados que se relacionam com a atividade antitumoral dos bufadienolídeos, se classificando como A61K. Contudo a aplicabilidade clínica dos bufadienolides no tratamento do câncer, ainda necessita de consideráveis investimentos na

obtenção de dados provenientes de estudos que irão proporcionar informações importantes sobre o tratamento desta patologia.

**Palavras-chave:** Bufadienolídeos. Câncer. Prospecção Tecnológica. Patentes.

## ABSTRACT

Cancer is a genetic disease that occurs when the information in the cell DNA is damaged, leading to abnormal patterns of gene expression. In surveys of ethnopharmacological survey, records of uses of animals for medicinal purposes can open several lines to pharmacological investigation of its bioactive components. Bufadienolide are cardioactive steroids found in extracts of poison frogs and has been studied for its antitumor action. This study aimed to conduct a scientific and technological foresight about bufadienolide analyzing its antitumor action. Periodic bases were used ScienceDirect, PubMed, Web of Science e Periodics CAPES this search was performed covering the period 2004-2014. And technological bases European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO) and database of the National Institute of Industrial Property (INPI) this search was conducted in January 2014. After research it was found that only 9 of the articles found really dealt with the antitumor action of bufadienolide 1 and filing of patent was present in the analyzed databases that relates to the antitumor activity of bufadienolide, ranking as A61K. However, the clinical applicability of bufadienolides in cancer treatment, still needs significant investment in obtaining data from studies that will provide important information about the treatment of this pathology.

**Keywords:** Bufadienolides, Cancer, Technological Forecasting, Patents.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública mundial, não somente pelo aumento de sua prevalência, mas também pelos investimentos em ações abrangentes nos diversos níveis de atuação, seja na promoção da saúde até a gestão do Sistema Único de Saúde, que afeta a população de todos os níveis sociais. A incidência mundial de câncer cresceu 20%, sendo esperados 27 milhões de casos novos para o ano de 2030 (RODRIGUES; FERREIRA, 2010).

Do ponto de vista biológico, o câncer é uma doença genética que ocorre após danos celulares que causam expressão gênica anormal. Assim, as células geneticamente modificadas passam a receber instruções erradas para as atividades de síntese protéica, proliferação celular e expressão de receptores. Independentemente da exposição a agentes cancerígenos, as células sofrem processos de mutação espontânea que não alteram seu desenvolvimento normal. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que, a princípio, são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes são transformados em oncogenes, responsáveis pela transformação das células normais em malignas (KUMAR et al., 2004; INCA, 2012).

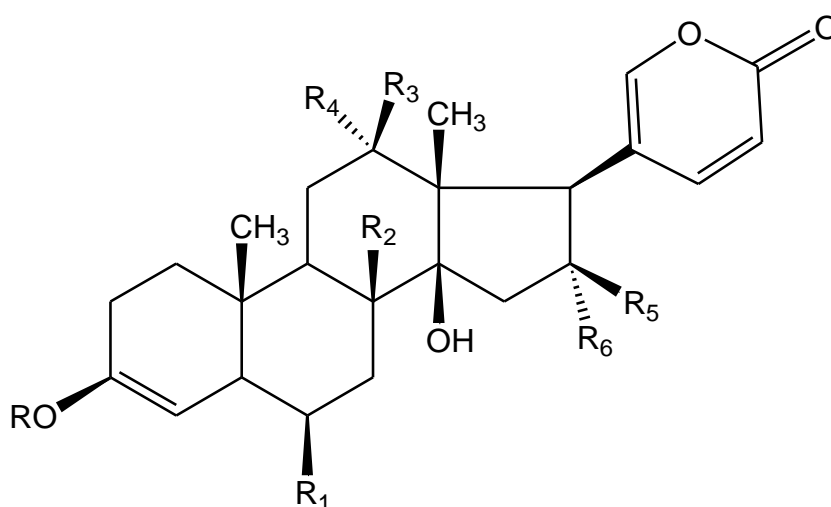
Nos últimos anos o estudo referente a prospecção de tecnologias tem aumentado a fim de examinar as tendências de crescimento numa determinada área de conhecimento ou produto de interesse (TILMAN et al., 2001; LIMA; VELHO; FARIA, 2007; JUROSZEK; TEIDERMANN, 2011; SIMÕES et al., 2012). O exercício de prospecção consiste em tentar antecipar os avanços de modo a influenciar na orientação das trajetórias tecnológicas, ou seja, estar à frente e garantir a competitividade e sobrevivência das instituições de pesquisa e extensão e dos usuários de seus resultados (ZACKIEWICZ; SALLES-FILHO, 2001).

A etnofarmacologia é um ramo relativamente recente da ciência que visa estudar o conhecimento popular sobre o uso de plantas e animais para fins medicinais e seu potencial para descoberta de medicamentos (ELISABETSKY, 2003). De fato, é estimado que cerca de 80% dos medicamentos sejam de origem natural (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009). Nas pesquisas de levantamento etnofarmacológico, os registros de usos de animais para fins medicinais podem abrir diversas linhas para investigação (RODRIGUES, 2006). Sendo assim, o homem tem obtido inovações em diversas áreas, inclusive na produção de fármacos, como por exemplo o analgésico morfina, o antibiótico penicilina e o quimioterápico paclitaxel.

Os avanços nas técnicas de isolamento e caracterização química, os progressos e a sofisticação dos bioensaios, que se mostram cada vez mais específicos e acurados, receberam, ainda, o reforço de mais um importante grupo de profícuos produtores de moléculas interessantes: os anfíbios, que apresentam substâncias farmacologicamente ativas em sua pele com funções principais de protegê-los contra infecções de microorganismos e também como mecanismo de defesa contra predadores (DUELLMAN; TRUEB, 1994; DALY, 1998). Dentre os princípios ativos encontrados nas peles dos anfíbios, moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de uma diversificada gama de esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados guanídínicos, proteínas e peptídeos são encontrados nestes animais (CLARKE, 1997; MONTI; CARDELLO, 1999; PRATES; BLOCH-JUNIOR, 2000).

Bufadienólídeos são esteróides hidroxilados de 24 átomos de carbonos com um anel de lactona di-insaturada possuindo 6 membros na posição do carbono 17 do núcleo esteroide (**Figura 1**).

**Figura 1** – Estrutura química dos bufadienólídeos.



Os egípcios são considerados a primeira civilização a utilizar cila (*Scilla maritima*), uma planta que contém o composto cilareno A, o primeiro bufadienólídeo encontrado, cuja estrutura foi elucidada em 1933, no tratamento de doenças do coração, e também algumas culturas asiáticas (onde os chineses foram os primeiros) ainda utilizavam diferentes venenos da pele de sapo para a preparação de remédios (KRENN; KOPP, 1998). *Chan'Su* é o veneno seco do sapo *Bufo bufo gargarizans* e/ou *Bufo melanostictus*, que é usado em algumas regiões da China e alguns outros países asiáticos devido às suas propriedades anestésicas, anti-

inflamatórias, cardiotônicas, diuréticas e hemostáticas. Bufalina e cinobufagina são dois importantes bufadienolídeos componentes do Chan'Su, e os seus conteúdos na droga bruta pode ser tão elevado quanto 1-5% do peso seco (YE et al., 2004; MENG et al., 2009).

Dentre as diversas vantagens apresentadas pelos bufadienolídeos e considerando que os biomas brasileiros contam com uma diversidade de espécies de sapos, este trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a ação antitumoral dos bufadienolídeos e a participação dos países nos depósitos de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A prospecção foi baseada na pesquisa de artigos científicos e pedidos de registro de patentes que versam sobre bufadienolídeos e sua ação antitumoral e realizada em fontes impressas e eletrônicas. Para tanto, a busca na literatura científica foi realizada utilizando as seguintes palavras-chave: bufadienolídeos, câncer e suas associações nos idiomas Inglês e Português. As bases de periódicos utilizadas foram o *ScienceDirect*, *PubMed* e *Web of Science* e Periódico CAPES. Na etapa subsequente, os artigos científicos foram selecionados a partir do resumo e texto completo que retratassem as atividades farmacológicas propostas no estudo. É relevante destacar que os artigos que apresentavam duplicidade foram excluídos. O recorte temporal de manuscritos científicos publicados foi compreendido entre janeiro de 2004 a dezembro de 2013.

Em relação às bases de dados tecnológicas foram utilizadas a *European Patent Office* (EPO), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. A pesquisa foi realizada em janeiro de 2014 e foram utilizadas como palavras-chave os termos bufadienolídeos ou *bufadienolides*, câncer ou *cancer* e a combinação destes termos em língua portuguesa e inglesa.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores com a quimioterapia e/ou tratamento radioterápico. Nos anos de 1970, estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos,

incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. No entanto, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante primário tanto para as metástases como para os tumores primários (KUMAR et al., 2004; KAMB et al., 2005).

#### 4.3.1 Artigos

O descritor ‘Bufadienólídeos ou *Bufadienolides*’ apresentou 55 resultados associados ao termo no *ScienceDirect*, 99 no *PubMed*, 56 no *Web of Science* e no Periódico CAPES apenas 29 artigos. Porém no que refere a ação antitumoral dos bufadienólídeos foram encontrados 13 artigos na base *ScienceDirect*, 17 no *PubMed*, 3 no *Web of Science* e 1 no Periódico CAPES (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Número de artigos científicos por palavras-chave publicados nas bases de dados *ScienceDirect*, *PubMed*, *Web of Science* e Periódico CAPES.

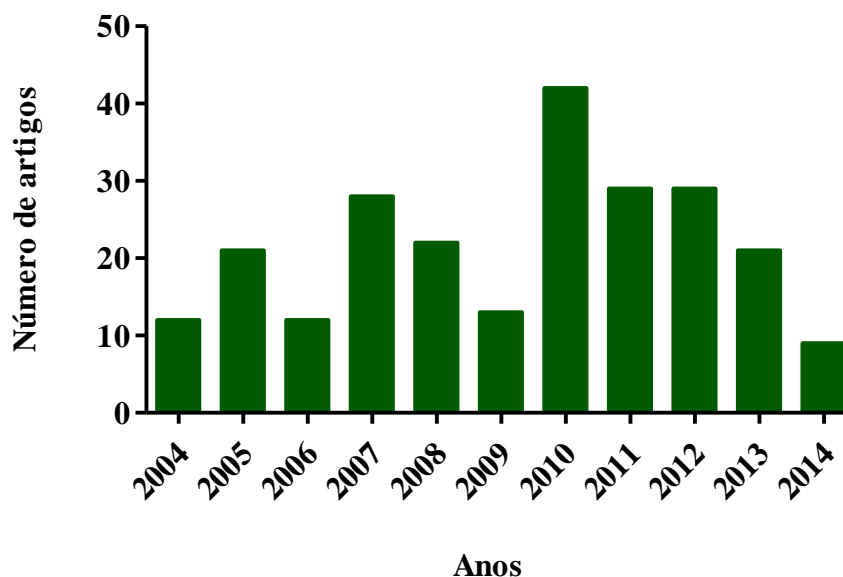
Palavras-chave		<i>Science Direct</i>	<i>PubMed</i>	<i>Web of Science</i>	Periódicos Capes
Bufadienólídeos	ou	55	99	56	29
<i>Bufadienolides</i>					
Bufadienólídeos	e				
câncer	ou	13	17	03	1
<i>Bufadienolides</i>	and				
<i>cancer</i>					

Após a exclusão das duplicatas para fins de seleção todos os títulos e resumos das obras foram lidos para classificar aquelas que de fato forneciam em seu conteúdo informações sobre a ação antitumoral dos bufadienólídeos, diminuindo a quantidade de artigos para nove.

Com relação a evolução temporal dos artigos para a classe dos bufadienólídeos, a maior quantidade de publicações concentrou-se no ano de 2010 com 17,5% do total (**Figura 2**). Mostrando que estes compostos ganharam interesse dos pesquisadores no século XXI, isso

se deve a uma diversa variedade de compostos pertencentes a classe dos bufadienolídeos e a uma gama de ações farmacológicas desempenhadas por cada um.

**Figura 2** – Artigos no período 2004 a 2014 para o termo bufadienolídeos.



Venenos de sapos, chamados de *Chansu* na China, tem sido bastante utilizados para tratar patologias cardíacas, dores e cânceres. Os bufadienolídeos tem sido identificados como a parte biologicamente mais ativa dentre as moléculas isoladas do *Chansu*. Diversos estudos sugerem que estes compostos têm a capacidade de regular o crescimento e diferenciação celular, apoptose e metabolismo da glicose (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; DONG et al., 2011).

Yu e colaboradores (2008) estudaram a atividade antiproliferativa e apoptótica de bufalina e cinobufagina em células de câncer de próstata. Estes bufadienolídeos foram antiproliferativos para a linhagem testada, induziram apoptose em células de câncer de próstata por causarem ativação de caspases e liberação de citocromo *c*. Estes compostos também mostraram atividade citotóxica contra HepG2 (carcinoma hepatocelular), causando apoptose nas células de maneira dose-dependente (QI et al., 2011). Os compostos bufotalina, bufalina, telocinobufagina e cinobufagina, quando testados em linhagens HepG2 e R-HepG2 (carcinoma hepatocelular resistente) diminuíram a viabilidade destas células de uma maneira dose-dependente.

A bufotalina induz a parada do ciclo celular em G<sub>2</sub>/M através de regulação de ciclinas (ZHANG et al., 2012). Bufotalina, telocinobufagina e gamabufotalina também mostraram



atividade inibidora potente contra as linhagens HepG2, MDAMB-231, MCF-10 e MCF-7 (adenocarcinomas de mama humano) (DONG et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Em outro estudo, a avaliação de bufadienolídeos naturais e seus derivados apresentaram atividade citotóxica de moderada a alta contra células tumorais humanas de leucemia (HL-60), glioblastoma (SF-295), mama (MDA-MB-435) e cólon (HCT-8), não revelando ação lítica direta às membranas celulares de eritrócitos de camundongos (CUNHA-FILHO et al., 2010).

No estudo de Hu e colaboradores (2011) foram utilizados lipossomas contendo bufadienolídeos foram estudados sobre sua ação citotóxica *in vitro* (células de câncer colorretal e de câncer pulmonar NCI-H157) e *in vivo* em modelos tumorais de pulmão e fígado implantados em camundongos. Esta preparação de lipossomas com bufadienolídeos mostraram uma liberação sustentada, o que resultou em um aumento da eficácia anti-tumoral no câncer de fígado e de células de câncer pulmonar de Lewis em camundongos portadores.

#### 4.3.2. Patentes

A prospecção tecnológica pode ser definida como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (CARUSO; TIGRE, 2004). Devendo ser desmistificada para se tornar uma ferramenta rotineira, influenciando nos processos de tomada de decisão, podendo facilitar a apropriação com qualidade da Propriedade Intelectual (PI) e melhorar a gestão da inovação, ao aumentar o senso crítico e ampliar a visão dos gargalos tecnológicos e das oportunidades a eles associadas em cada aspecto técnico de energia e de preservação do ambiente, além de outras áreas (QUINTELLA et al., 2011).

As pesquisas científicas e os produtos gerados, a partir dos recursos naturais, merecem maior atenção no que se refere à proteção deste conhecimento, não só pelos recursos financeiros, humanos e tempo investidos, mas também pela exploração econômica realizada para estes produtos e o retorno deste capital para novas pesquisas (MOREIRA; ANTUNES; PEREIRA-JÚNIOR, 2004). Para melhor exploração destes produtos a proteção pela propriedade intelectual é um recurso ainda pouco utilizado pelo meio acadêmico, entre estes recursos a proteção por meio de patentes vem sendo difundida a fim de proteger o detentor de um produto ou processo gerado (PEREIRA et al., 2013).

Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou

jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Em contrapartida, o inventor se obriga a revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente (INPI, 2014). Os produtos naturais movimentam anualmente bilhões de dólares, sem incluir a economia informal da utilização popular de plantas medicinais nos países em desenvolvimento. O crescimento deste setor vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investir nas pesquisas e patenteamento de novos produtos (SIMÕES et al., 2012).

Diante desta importância, foi avaliado o número de patentes cadastradas nas bases de dados usando o termo Bufadienolídeos ou *bufadienolides* e câncer ou *cancer* e também a associação destes dois termos (Bufadienolídeos e câncer ou *Bufadienolides and cancer*). Na base de dados do INPI não foram verificados patentes referentes ao termo bufadienolídeos nos campos de título e resumo. Utilizando o termo câncer foram encontrados 2.107 patentes. Porém, após a associação dos termos nenhuma patente foi encontrada. Na base EPO o termo *bufadienolides* identificou 27 patentes.

Aplicando o termo *cancer*, 100.000 patentes foram encontradas. Por outro lado, na busca por estes termos confrontados (*bufadienolides and cancer*) apenas 1 patente foi detectada. Na base de dados USPTO utilizando o termo *bufadienolides* foi encontrada apenas 1 patente; o termo *cancer* detectou 26.309 patentes, porém quando associados ambos os termos nenhuma patente foi encontrada. Na base de dados mundial WIPO 25 patentes relacionadas ao termo *bufadienolides* foram encontradas; com o termo *cancer*, 136.805 patentes; quando confrontados os termos *bufadienolides and cancer* foi encontrada apenas 1 patente (**Tabela 2**).

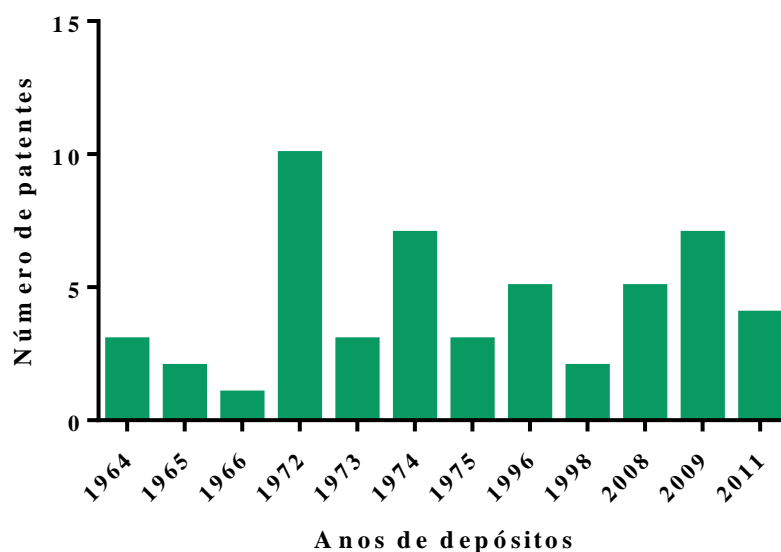
**Tabela 2** – Total de depósitos de patentes pesquisadas nas bases do INPI, ESPACENET, USPTO e WIPO.

Palavra-chave	INPI	ESPACENET	USPTO	WIPO
<b>Bufadienolídeos ou <i>bufadienolides</i></b>	0	27	1	25
<b>Câncer ou <i>cancer</i></b>	2.107	100.000	26.309	136.805
<b>Bufadienolídeos e câncer ou <i>Bufadienolides and cancer</i></b>	0	1	0	1
<b>Total</b>	2.107	100.028	26.310	136.831

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; EPO: *European Property Organization*; USPTO: *United States Patent and Trademark Office*; WIPO: *World Intellectual Property Organization*.

As primeiras patentes com o termo Bufadienólídeos ou *bufadienolides* (3 no total) foram registradas no ano de 1964. A **Figura 2** descreve o acompanhamento do depósito de patentes a partir de 1964, verificando-se que um pico de depósitos na década de 1970 (23 no total). A partir do ano 2000, 16 novos foram depositadas.

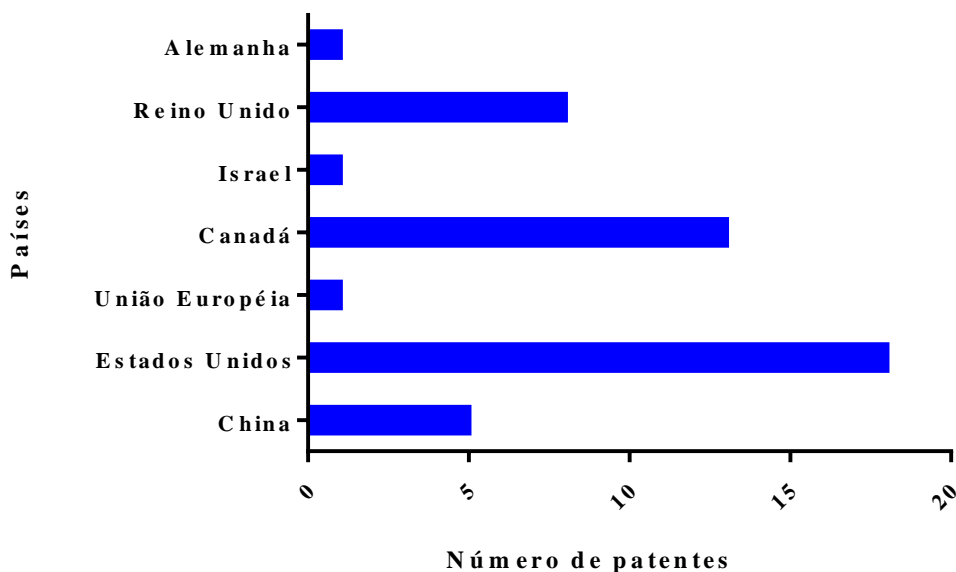
**Figura 3** – Depósitos de patentes no período 1964 a 2011, considerando as bases de dados consultadas.



Na análise das patentes, o país que mais apresentou pedidos de depósitos para o termo Bufadienólídeos ou *bufadienolides* foi os Estados Unidos (18 patentes, 38,3% do total), seguido pelo Canadá (13 patentes, 27,7%) (**Figura 3**). Ironicamente, o Brasil não possui nenhuma proteção tecnológica registrada nas bases de dados pesquisadas. Este achado é contraditório, pois o Brasil tem uma área de 8,5 milhões km<sup>2</sup> e possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no Norte, o semiárido no Nordeste e áreas temperadas no Sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas).

Segundo Kato (2001), o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta, muitas das quais sendo endêmicas. Assim, o Brasil possui baixa concorrência e apresenta pouco esforço em inovar na área de invenções tecnológicas, provavelmente devido à alguma falha do sistema de inovação (articulação competente entre governo, empresas e instituições, capaz de promover um sistema de Produção & Desenvolvimento de Medicamentos - P & D).

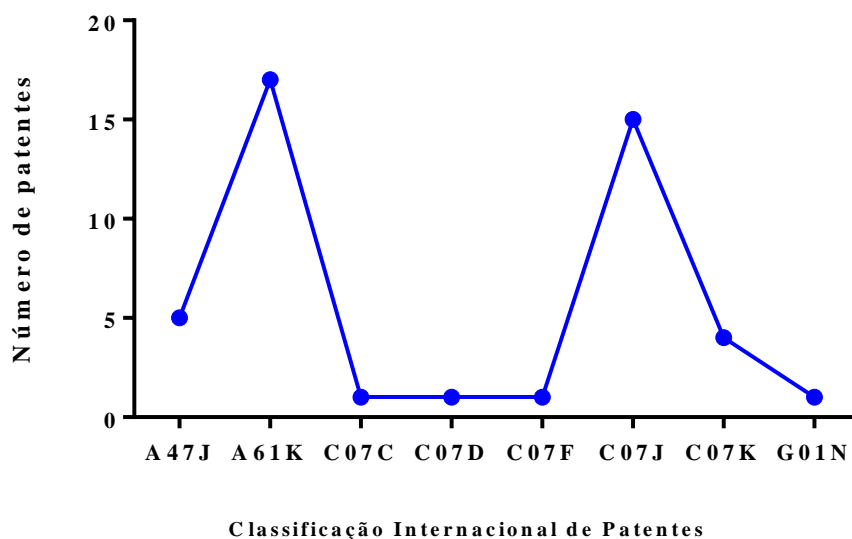
**Figura 4** – Países que mais depositaram patentes envolvendo bufadienolídeos.



O fato do Brasil não possuir nenhuma proteção por meio de patentes que envolvam bufadienolídeos não condiz com a grande produção brasileira de artigos científicos que relatam sobre a identificação, isolamento e avaliação das propriedades farmacológicas e toxicológicas de compostos isolados da secreção glandular dos sapos e como bem relatado durante todo este trabalho, sugerindo que não há incentivo nas pesquisas para o desenvolvimento de invenções envolvendo os bufadienolídeos. Além disso, a produção científica no Brasil caracteriza-se por ser recente (últimos 100 anos), e tem uma grande concentração institucional nas universidades públicas e centros de pesquisa e, com honrosas exceções, em instituições privadas, como consequência das políticas públicas em Ciência e Educação no país (SPEZIALI et al., 2012). Este é, certamente, ainda um dos grandes desafios no sistema nacional de inovação brasileiro para a transferência da tecnologia gerada nas Universidades e nos Centros de Pesquisa para a Indústria, de tal forma que sejam gerados novos processos e produtos, intensivos em conhecimento, oriundos destas instituições.

A Classificação Internacional de Patentes (CIP), na qual as patentes são classificadas de acordo com a aplicação, são divididas em oito (8) seções, 21 subseções, 120 classes, 628 subclasses e 69.000 grupos (SERAFINI et al., 2012). Assim, foram analisados os documentos conforme a CIP (**Figura 5**) e foi observado que a seção A (necessidades humanas) é a mais depositada para o termo, seguida pela seção C (química; metalurgia).

**Figura 5** – Distribuição por Classificação Internacional de Patentes (CIP) dos depósitos de pedidos de patentes encontrados nas bases de dados



Na seção A61K que se refere a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas foram detectadas 17 depósitos de pedidos de patentes em relação ao termo bufadienólídeos, comprovando que os bufadienólídeos vêm sendo estudados com a perspectiva de gerar produtos com potencial terapêutico. Na C07J, que se refere aos esteróides e abrange os compostos contendo um esqueleto de ciclopenta[a]hidrofenantreno ou uma estrutura cíclica derivada do mesmo, foi constatado para o termo bufadienólídeos 15 patentes nesta classe.

Quando associados os termos bufadienólídeos e câncer, apenas uma patente sendo de origem chinesa foi encontrada (*Use of bufadienolides compound and bufadienolides salinization compound in preparing medicine for treating gynecological tumor* – Patente N° 200910025008). Esta patente trata do uso de um composto da classe dos bufadienólídeos e de um sal de bufadienólídeo para o tratamento de tumores ginecológicos. Assim, testes com as linhagens humanas de câncer de ovário (A-2780, SKOV-3), de carcinoma cervical humano (SiHa) e carcinoma de endométrio (Shikawa) realizados *in vitro* com um extrato de bufadienólídeo e compostos monoméricos isolados (cinobufagina, bufalina, bufotalina e gamabufotalina), bem como cloridratos ou sulfatos dos quatro compostos monoméricos, revelaram atividade citotóxica superior ao paclitaxel com efeitos colaterais mais brandos (NANJING UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, 2009). Este pedido de depósito de patente é do ano 2009, mostrando que há pelo menos 4 anos não tem sido

realizadas pesquisas inovadoras relacionadas com o tema. A classificação internacional de patentes é a A61K reafirmando que os bufadienolídeos estão sendo estudados quanto sua ação biológica e a importância das substâncias ativas advindas de animais.

É importante enfatizar que a economia de um país, sendo essencialmente rural, torna-se duplamente favorável à utilização de seus recursos naturais, pois, ao mesmo tempo em que a região é propícia ao seu desenvolvimento (pela praticidade advinda do contato estreito com a terra) também se configura como uma alternativa de tratamento (ALVIM et al., 2006). Desta forma, o mercado atende de diferentes formas o consumidor, uma vez que o Brasil, possuidor de grande quantidade de espécies nativas, é um grande produtor de produtos naturais tanto para o consumo da população (consumo interno) quanto para fins de exportação (consumo externo), além da grande relevância para as pesquisas que incentivem a comprovação da eficácia terapêutica e recuperação da saúde (GALLOTE; RIBEIRO, 2005).

Em 2004 foi promulgada a Lei de Inovação Tecnológica Nº10.973, e regulamentada em 2005 pelo Decreto Nº 5.563.11 Esta lei regula, entre outros assuntos, os estímulos para a participação de Instituições Científicas e Tecnológicas (ICT's) no processo de inovação, para a inovação nas empresas, para o inventor independente e para a criação de fundos de investimentos para a inovação. É a primeira lei brasileira que trata do relacionamento entre Universidades e/ou Instituições de Pesquisa com empresas e da criação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NIT's), trazendo como consequência o amadurecimento institucional dos mesmos com o intuito de fazer gestão estratégica da propriedade intelectual das ICT's brasileiras (BRASIL, 2014).

#### **4.5 CONCLUSÃO**

O potencial biológico dos bufadienolídeos se refletiu em 32 depósitos de patentes desde 1964, embora os bufadienolídeos com atividade atitumoral ainda mostrem baixa expressividade do ponto de vista de desenvolvimento de propriedade intelectual apesar do grande número de artigos disponíveis nas bases científicas. Além disso, o presente estudo de prospecção tecnológica reflete a falta de investimento nacional em pesquisa, inovação e desenvolvimento de tecnologias com maior valor agregado envolvendo esta classe de compostos, tendo em vista que mesmo o Brasil possui uma grande variedade de espécies que contêm bufadienolídeos, tanto de origem animal quanto vegetal. É necessário refletir as políticas brasileiras de investimento em inovação e tecnologia que estão em execução para

melhor interligar a cadeia produtiva e tornar o Brasil um país mais competitivo do ponto de vista mercadológico.

## REFERÊNCIAS

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; ALMEIDA FILHO, A.J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 14, p. 9-17, 2006.

BAGROV, A.Y.; SHAPIRO, J.I.; FEDOROVA, O.V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacology Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.

BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEI Nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/lei/110.973.htm)>. Acesso em 21 fev. 2014.

CARUSO, L.A.; TIGRE, P.B. **Modelo SENAI de Prospecção: Documento Metodológico**. Montevideo. OIT/CINTERFOR.2004.

CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews**, v. 72, p. 365-379, 1997.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

CUNHA-FILHO, G.A.; RESCK, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FERREIRA, J.R.O.; RODRIGUES, F.A.R.; SANTOS, M.L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339-348, 2010.

DALY, J.W. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 162-172, 1998.

DONG, Y.; TIN, S.; LI, J.; JIANG, C.; YE, M.; HU, H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis**, v. 16, p. 394-403, 2011.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw Hill Book Co., New York, USA, 577pp, 1994.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 35-36, 2003.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497–504, 2010.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do horto da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES. **Natureza On Line**, v.3, p.19-24, 2005.

HU, K.; ZHU, L.; LIANG, H.; HU, F.; FENG, J. Improved Antitumor Efficacy and Reduced Toxicity of Liposomes Containing Bufadienolides. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, p. 1487-1494, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2ª Ed., 129 p, 2012.

JUROSZEK, P.; TEIDERMAN, A.V. Potential Strategies and Future Requirements for Plant Disease Management Under a Changing Climate. **Plant Pathology**, v. 60, p. 100-112, 2011.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KATO, M.J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, p. 621-623, 2001.

KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1-29, 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Diseases**. China: WB Saunders, 2004.

LENAERTS, C.; DEMEVER, M.; GERBAUX, P.; BLANKERT, B. Analytical aspects of marinobufagenin. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 193-201, 2013.

LIMA, R.A.; VELHO, L.M.L.S.; FARIA, L.I.L. Delimitação de uma área multidisciplinar para Análise bibliométrica de produção científica: o caso da Bioprospecção. **Trans Informação**, v. 19, p. 153-168, 2007.

MENG, Z., YANG, P., SHEN, Y., BEI, W., ZHANG, Y., GE, Y., NEWMAN, R.A., COHEN, L., LIU, L., THORNTON, B., CHANG, D.Z., LIAO, Z., KURZROCK, R. Pilot



study of huachansu inpatients with hepatocellular carcinoma, non small-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, v. 115, p. 5309–5318, 2009.

MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: Barraviera, B. (Ed.). **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. EPUB, Rio de Janeiro, Brasil, p.225-232, 1999.

MOREIRA, A.C.; ANTUNES, A.M.S.; PEREIRA-JUNIOR, N. Patentes, extratos de plantas e derivados. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 62-71, 2004.

NANJING UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE. Duan Jinao, Ma Hongyue, Tang Yuping, Zhou Jing. Use of bufadienolides compound and bufadienolides salinization compound in preparing medicine for treating gynecological tumor. CN PI n. 200910025008, 16 fev. 2009, 09 jul. 2009.

PEREIRA, S.A.; ALVES, H.P.; SOUSA, C.M.; COSTA, G.L.S. PROSPECÇÃO SOBRE O CONHECIMENTO DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS – inajá (*Maximiliana maripa* Aublt.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Revista GEINTEC**, v. 3, p. 110-122, 2013.

PRATES, M.V.; BLOCH-JÚNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos – Uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p 30-36, 2000.

QI, F.; INAGAKI, Y.; GAO, B.; CUI, X.; XU, H.; KOKUDO, N.; LI, A.; TANG, W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways. **Cancer Science**, v. 102, p. 951-958, 2011.

QUINTELLA, C.M.; MEIRA, M.; GUIMARÃES, A.K.; TANAJURA, A.S.; SILVA, H.R.G. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 406-415, 2011.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 378-391, 2006.

RODRIGUES, J.S.M.; FERREIRA, N.M.L.A.F. Caracterização do Perfil Epidemiológico do Câncer em uma Cidade do Interior Paulista: Conhecer para Intervir. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 431-441, 2010.

SERAFINI, M.R.; QUINTANS, J. DE S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; DOS SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. **Revista GEINTEC**, v. 2, p.427-435, 2012.

SIMÕES, E. R. B; MARQUES, L. G. A; PINHEIRO, B. M; SANTOS, M. R. C; PESSOA, C. Technological Forecasting on Phytotherapics Development in Brazil.

SPEZIALI, M.G; GUIMARÃES, P.P.G; SINISTERRA, R.D. Desmistificando a proteção por patentes nas universidades. **Química Nova**, v. 35, p. 1700-1705, 2012.

**World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 6, p. 1-5, 2012.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. **Science**, v. 292, p. 281-284, 2001.

YE, M.; QU, G.; GUO, H.; GUO, D. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, p. 87-98, 2004.

YU, C.H.; KAN, S.F.; PU, H.F.; CHIEN, E.J.; WANG, P.S. Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and independent human prostate cancer cells. **Cancer Science**, v. 99, p. 2467-2476, 2008.

ZACKIEWICZ, M.; SALLES-FILHO, S. Technological foresight: um instrumento parapolítica científica e tecnológica. **Parcerias Estratégicas**, v. 10, p. 144-161, 2001.

ZHANG, X.; YE, M.; DONG, Y.; HU, H.; TAO, S.; YIN, J.; GUO, D. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucrata*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1779–1785, 2011.

ZHANG, D.; LIU, J.; TANG, M.; YIU, A.; CAO, H.; JIANG, L.; CHAN, J.Y.; TIAN, H.; YE, W. Bufotalin from *Venenum Bufonis* inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v. 692, p. 19–28, 2012.

**CAPÍTULO II:**

**5 Atividade antiproliferativa dos extratos dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* (Bufonidae) da Região Amazônica**

**(Artigo publicado no periódico Toxicon)**

**Atividade antiproliferativa dos extratos dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* (Bufonidae) da Região Amazônica**

Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>a,b</sup>, Daisy Jereissati Barbosa Lima<sup>c</sup>, Bryan Wender Debiase<sup>d</sup>,  
Bruno Marques Soares<sup>c</sup>, Kátia da Conceição Machado<sup>b</sup>, Janaina da Costa Noronha<sup>f</sup>,  
Domingos de Jesus Rodrigues<sup>e,f</sup>, Adilson Paulo Sinhorin<sup>d,e</sup>, Cláudia Pessoa<sup>c</sup>, Gerardo Magela  
Vieira Júnior<sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, 64607-670, Picos, Piauí, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil

<sup>d</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Laboratórios Integrados de Pesquisa em Ciências Químicas (LIPEQui), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil

<sup>f</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Acervo Biológico da Amazônia Meridional (ABAM), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil.

## **RESUMO**

Secreções da pele de anfíbios são uma fonte fascinante de substâncias ativas. Conhecendo sua importância e objetivando explorar a biodiversidade da Amazônia brasileira, foi realizada uma bioprospecção da atividade antiproliferativa de extratos de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* fêmeas/machos que ocorrem na região Amazônica do Mato Grosso, Brasil. A análise por LC-MS dos extratos de veneno de *R. marina* revelaram quatro bufadienolídeos (telocinobufagenina, marinobufagina, bufalina e resinobufogenina). Em primeiro lugar, foi avaliado a citotoxicidade dos extratos de venenos de *R. marina* e *R. guttatus* em linhagens tumorais pelo ensaio de MTT. Todos os extratos revelaram citotoxicidade, mostrando que o

extrato de *R. marina* foi potencialmente citotóxico comparado com doxorubicina (valores de  $CI_{50}$  variando de 0,01 a 0,23  $\mu\text{g/mL}$ ). Apenas os extratos de veneno de *R. guttatus* causaram disrupção na membrana dos eritrócitos humanos. A fim de investigar a seletividade dos extratos, o ensaio Alamar Blue™ foi realizado com células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), após 72 horas de exposição. Foi verificado que os extratos foram até 80 vezes mais seletivos contra células leucêmicas quando comparado com leucócitos. Com o objetivo de confirmar estes efeitos antiproliferativos, a incorporação de BrdU ao DNA foi medida em células HL-60 tratadas com extratos do veneno de *R. marina* após 24h de exposição. Todos os extratos diminuíram a incorporação de BrdU em ambas concentrações testadas. Em resumo, o presente trabalho analisou nove extratos de veneno de *R. marina* e *R. guttatus* que mostraram pronunciados efeitos letal e discriminação em linhagens tumorais, especialmente os de *R. marina*, destacando que as secreções da pele de sapos como uma fonte promissora para novos produtos químicos anticancerígenos.

**Palavras-chave:** Atividade antiproliferativa. Bufadienolídeos. *Rhinella marina*. *Rhaebo guttatus*

## ABSTRACT

The venom of amphibians is a fascinating source of active substances. In view of their medical importance and aiming to explore the amazing Brazilian biodiversity, we conducted bio-prospecting of antiproliferative activity in extracts of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* toads occurring in the Southern Amazon of Mato Grosso, Brazil. LC-MS and HPLC analysis of the venom extracts of *R. marina* revealed four bufadienolides (telocinobufagin – 1, marinobufagin – 2, bufalin – 3 and resibufogenin – 4). *R. guttatus* venom extracts contained only marinobufagin (2). First, *R. marina* and *R. guttatus* venom extracts were evaluated for cytotoxicity against tumor cell lines by the MTT assay. All extracts revealed cytotoxicity, where *R. marina* extracts were comparable to doxorubicin (IC<sub>50</sub> values ranging from 0.01 to 0.23 mg/mL). Only extracts of *R. guttatus* toad venom caused membrane disruption of human erythrocytes. The extracts were investigated for selective activity by determining their effect on stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the Alamar Blue assay. The extracts were up to 80-fold more selective against leukemia cells when compared to dividing leukocytes. Aiming to confirm these antiproliferative effects, BrdU incorporation into DNA was measured in HL-60 treated cells with *R. marina* venom extracts. These extracts decreased BrdU incorporation at both concentrations tested. In summary, nine extracts of *R. marina* and *R. guttatus* venom showed pronounced lethal and discriminating effects on tumor lines, especially those from *R. marina*, highlighting toad parotoid gland secretions as a promising source for novel lead anticancer chemicals.

**Keywords:** Antiproliferative activity. Bufadienolide. *Rhinella marina*. *Rhaebo guttatus*

## 5.1 INTRODUÇÃO

A bioprospecção de metabólitos secundários é um importante elemento para o crescimento econômico em países desenvolvidos. Milhares de compostos podem surgir de programas de prospecção e levar a um novo bioativo e/ou protótipos para a indústria farmacêutica. Neste contexto, animais, plantas, fungos e bactérias são uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, destacando sua diversidade estrutural, novos mecanismos de ação e a possibilidade de obter produtos patenteáveis (ROCHA et al., 2001; CLARDY; WALSH, 2004; CUNHA-FILHO, 2010; FERREIRA et al., 2011a, 2011b; VIEIRA-JÚNIOR et al., 2011; MILITÃO et al., 2012).

Entre os animais que chamaram a atenção estão os sapos, anfíbios que surgiram no final do período Devoniano. A mudança do ambiente de aquático para terrestre surgiu em função da aquisição progressiva de um conjunto de adaptações morfofuncionais e comportamentais. Entre outros órgãos, a pele destes animais apresentou alterações associadas com a nova forma de vida, apresentando glândulas exócrinas multicelulares, derivadas da epiderme, o que deve ter desempenhado um papel importante para evitar a desidratação (TOLEDO; JARED, 1995; RUPPERT et al., 2005). A família Bufonidae, por exemplo, possui 33 gêneros e 471 espécies (PRAMUK, 2006). Possui distribuição cosmopolita, exceto em Madagascar e áreas da Antártica. *Rhinella* (formalmente *Bufo* no Novo Mundo), é o principal gênero da família, consistindo em cerca de 258 espécies. Na América Latina, eles são encontrados em regiões amazônicas do Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru, Suriname, Guiana e Venezuela (FROST et al., 2006).

Secreções da pele de anfíbios são uma fonte fascinante de compostos ativos, tais como peptídeos, alcaloides, bufadienolídeos, aminas biogênicas e proteínas. Estas moléculas possuem um papel crucial em suas funções fisiológicas, especialmente na predação e proteção contra microorganismos. Particularmente em sapos, os compostos ativos chave são representados por aminas biogênicas e agliconas, semelhantes aos digitálicos conhecidos como bufadienolídeos, um importante grupo de esteroides de 24 carbonos poli-hidroxiados formados a partir do colesterol (TOLEDO; JARED, 1995; DMITRIEVA et al., 2000; XU-TAO et al., 2009; YANG et al., 2010; GAO et al., 2011). Estudos da relação estrutural-atividade tem revelado que estes compostos possuem propriedades cardiotônicas (IMAI et al., 1965), antivirais (KAMANO et al., 1988; WANG et al., 2011), citotóxicas (CUNHA-FILHO et al., 2010; GAO et al., 2011; SCIANI et al., 2012), antibacterianas (CUNHA-FILHO et al., 2005), antiparasitárias (TEMPONE et al., 2008) e inseticidas (SUPRATMAN et al., 2000).

Conhecendo a importância médica de secreções da pele de anfíbios e com o objetivo de explorar a incrível biodiversidade brasileira, foi realizada uma bioprospecção dos extratos de sapos de *Rhinella marina* (sinonímia *Bufo marinus*) e *Rhaebo guttatus* fêmeas/machos que ocorrem na região amazônica do Mato Grosso, Brasil, pela busca de veneno com atividade antiproliferativa em células tumorais e normais.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 HPLC qualitativa e análise por LC-ESIMS

A análise por cromatografia líquida de alta performance (*High performance liquid chromatography* – HPLC) foi realizada num sistema de HPLC Varian 325 Pro Star LC além do detector de UV modelo Pro Star 325 com sistema de comprimento de onda duplo. Os espectros de massa com Ionização Eletrospray (ESI) foram adquiridos no modo íon positivo em um instrumento do sistema LC-MS LCQ FLEET (Thermo Scientific) equipado com um analisador de massa de íons-trap. Posteriormente, a análise foi realizada numa coluna de Phenomenex Luna C18 (250.0 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu em MeCN e água. Um programa de gradiente foi utilizado de várias etapas da seguinte forma: 8% de MeCN (0 min), 54% de MeCN (45 min), 54% de MeCN (55min) e 95% de MeCN (70 min). A taxa de fluxo foi de 0,8 mL / min, volume de injeção foi de 20 µL e detecção UV a 296 nm (GAO et al., 2010).

### 5.2.2 Coleta da amostra

O veneno de sapo foi coletado da secreção de *R. marina* e *R. guttatus* no estado de Mato Grosso, Brasil. Os animais foram identificados por um dos autores (D.J.R. – IBAMA, SISBIO: número 30034-1). Modelos das espécies (*R. marina* - ABAM-H 1262 e *R. guttatus* - ABAM-H 1538) foram depositadas no Acervo Biológico da Amazônia Meridional (Sinop, Mato Grosso, Brasil).

### 5.2.3 Extração de amostras de veneno de sapo e padrões

Nove amostras (10,0 mg cada) de veneno de sapo de *R. marina* e *R. guttatus* foram separadas por gênero (macho/fêmea), secos, pulverizados e extraídos três vezes (5mL) com



CHCl<sub>3</sub>/MeOH por ultrasonicação por 10 minutos à temperatura ambiente. Os extratos foram identificados com abreviações seguindo os seguintes códigos: RMF (*R. marina* fêmea), RMM (*R. marina* macho), RGF (*R. guttatus* fêmea) RGM (*R. guttatus* macho). Os padrões de referência utilizados foram dois bufadienolídeos autênticos chamados telocinobufagina e marinobufagina, os quais foram fornecidos pelo Dr. Geraldino Andrade Cunha-Filho (Universidade de Brasília, Brasil).

#### 5.2.4 Cultura de células normais e tumorais

Sangue humano heparinizado (obtido de voluntários sádios, não-fumantes, que não fizeram uso de qualquer droga por pelo menos 15 dias antes da coleta, com idade entre 18-35 anos) foi coletado e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isolados pelo método padrão de centrifugação de gradiente de densidade por Ficoll-Hypaque. Todos os estudos foram realizados em conformidade com as diretrizes de pesquisa brasileiras (Lei 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde) e com a Declaração de Helsinki.

As linhagens humanas tumorais utilizadas foram: leucemia (HL-60), cólon (HCT-116), glioblastoma (SF-295) e ovário (OVCAR-8). Estas e o CMSP foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal, 2mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, foram incubadas em estufa à 37 °C com atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 5.2.5 Ensaios de citotoxicidade

As propriedades citotóxicas dos extratos foram avaliados após 72h de exposição utilizando as linhagens HL-60, SF-295, HCT-116, OVCAR-8 e células mononucleares do sangue periférico. A quantificação da proliferação celular foi determinada espectrofotometricamente empregando leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter). Os grupos controle (negativo e positivo) receberam a mesma quantidade de DMSO (0,1%). Doxorrubicina (Dox, 0,005 – 5,0 µg/mL) foi utilizado como controle positivo.

### 5.2.6 Ensaio MTT

A citotoxicidade contra células tumorais de HL-60, SF-295, HCT-116 e OVCAR-8 foi determinada pelo ensaio de MTT (MOSMANN, 1983), que analisa a habilidade das células vivas em reduzir o corante amarelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto violeta, formazan. Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $0,3-0,7 \times 10^5$  células/poço) e incubadas para permitir a adesão celular. Após vinte e quatro horas, os extratos foram adicionados em cada poço (0,004 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 72h de incubação, o sobrenadante foi aspirado e adicionado meio fresco contendo 10% de MTT e o produto formazan foi dissolvido em DMSO. A absorbância foi medida a 595nm.

### 5.2.7 Ensaio Alamar blue™

A fim de investigar a seletividade dos extratos, o ensaio Alamar Blue™ também foi realizado em CMSP humanas. CMSP foram lavadas e ressuspensas ( $3 \times 10^5$  células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado com fitohemaglutinina (4%). Em seguida, as CMSP foram cultivadas em placas de 96 poços ( $3 \times 10^5$  células/placa em 100 $\mu\text{L}$  do meio). Após 24 h, os extratos foram dissolvidos em DMSO e adicionados em cada poço (0,004 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e as células foram incubadas durante 72 horas. Vinte e quatro horas antes do final da incubação, 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue™ (Resazurin, Sigma Aldrich Co., USA) foi adicionado em cada poço. A absorbância foi medida a 570 nm e 595 nm e o efeito do fármaco foi quantificado como a percentagem do controle (Ferreira et al., 2011b).

### 5.2.8 Ensaio Lise de membrana

Os extratos foram testados para atividade hemolítica de acordo com o método de Santos e colaboradores (2010), com algumas modificações. Os extratos (1,56 - 200  $\mu\text{g/mL}$ ) foram incubados em placas de 96 poços por 60min a temperatura ambiente (25°C) em suspensão de eritrócitos humanos (2%) em NaCl (0,85%) contendo 10mM  $\text{CaCl}_2$ . Após centrifugação, os níveis de hemoglobina nos sobrenadantes foram determinados por espectrofotometria a 540 nm.

### 5.2.9 Inibição da síntese de DNA

O Ensaio BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) é um método confiável *in vitro* não radioativo muito utilizado para quantificar diretamente a proliferação de células. Aqui, células HL-60 foram semeadas em placas de 24 cavidades de cultura de tecidos (1 mL / poço) e foram tratados com os extratos de *R. marina* (RMF-1, RMF-2, RMF-4, RMF-5 e RMM-1) nas concentrações de 0,1 a 1 µg/mL por 24 h. Antes do final da exposição das drogas, 10 µL de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, 10 mM) foram adicionados em cada poço e as células incubadas durante mais 3 h a 37°C. Para determinar a quantidade de BrdU incorporada no DNA, as células foram recolhidas, transferidas para lâminas Cytospin, e foram deixadas para secar durante 2 horas à temperatura ambiente (PÊRA et al., 1977). As células que tinham incorporado BrdU foram marcadas por imunocitoquímica peroxidase direta, usando o cromógeno diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contrastadas com hematoxilina. A determinação de positividade BrdU foi realizada por microscopia de luz (Olympus, Tóquio, Japão). Duzentas células foram contadas por lâmina para determinar a porcentagem de células positivas para BrdU.

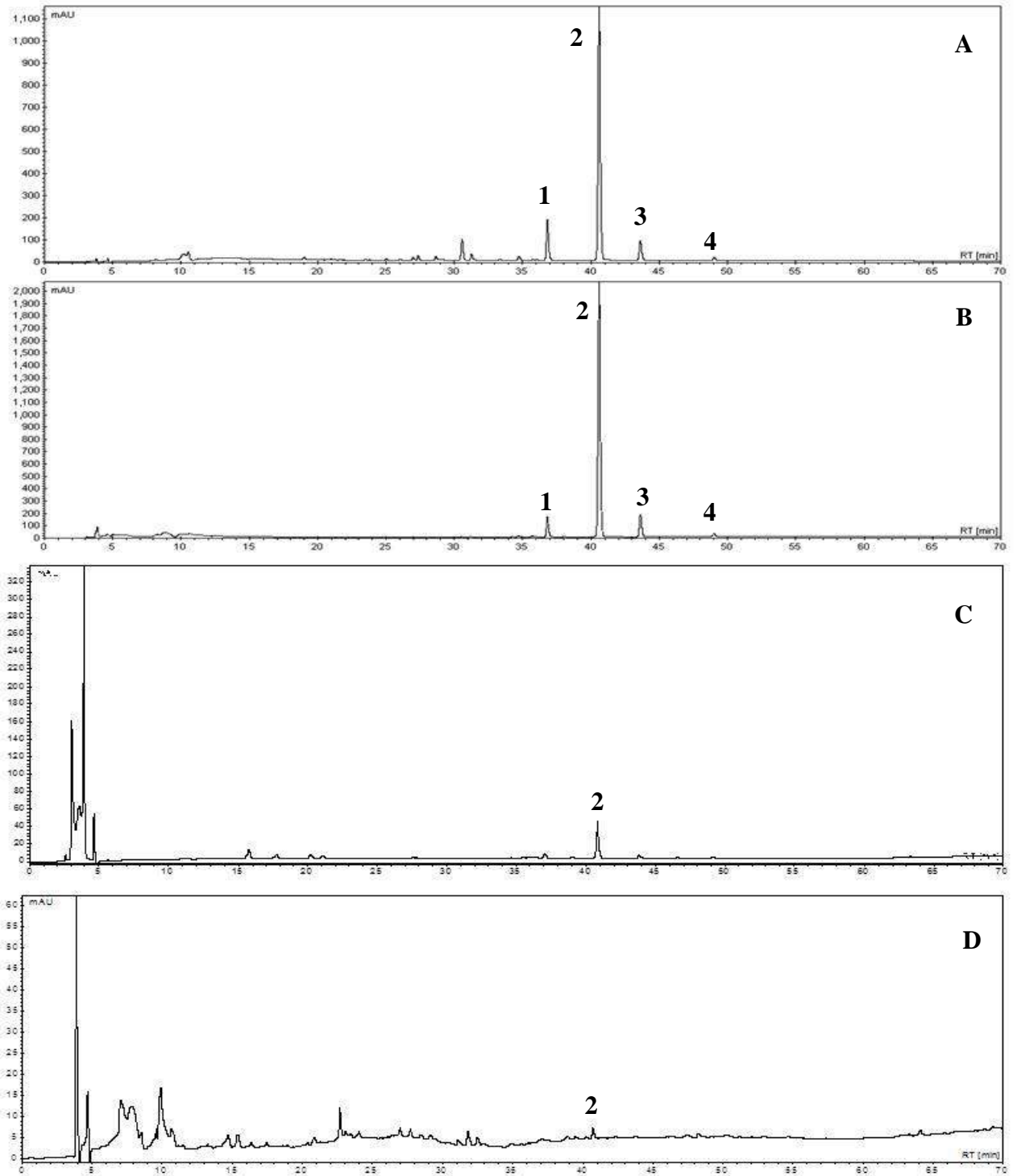
### 5.8.10 Análise estatística

Os valores de  $CI_{50}$  e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão linear. Os resultados apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido por Newman-Keuls utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) considerando  $p < 0,05$ .

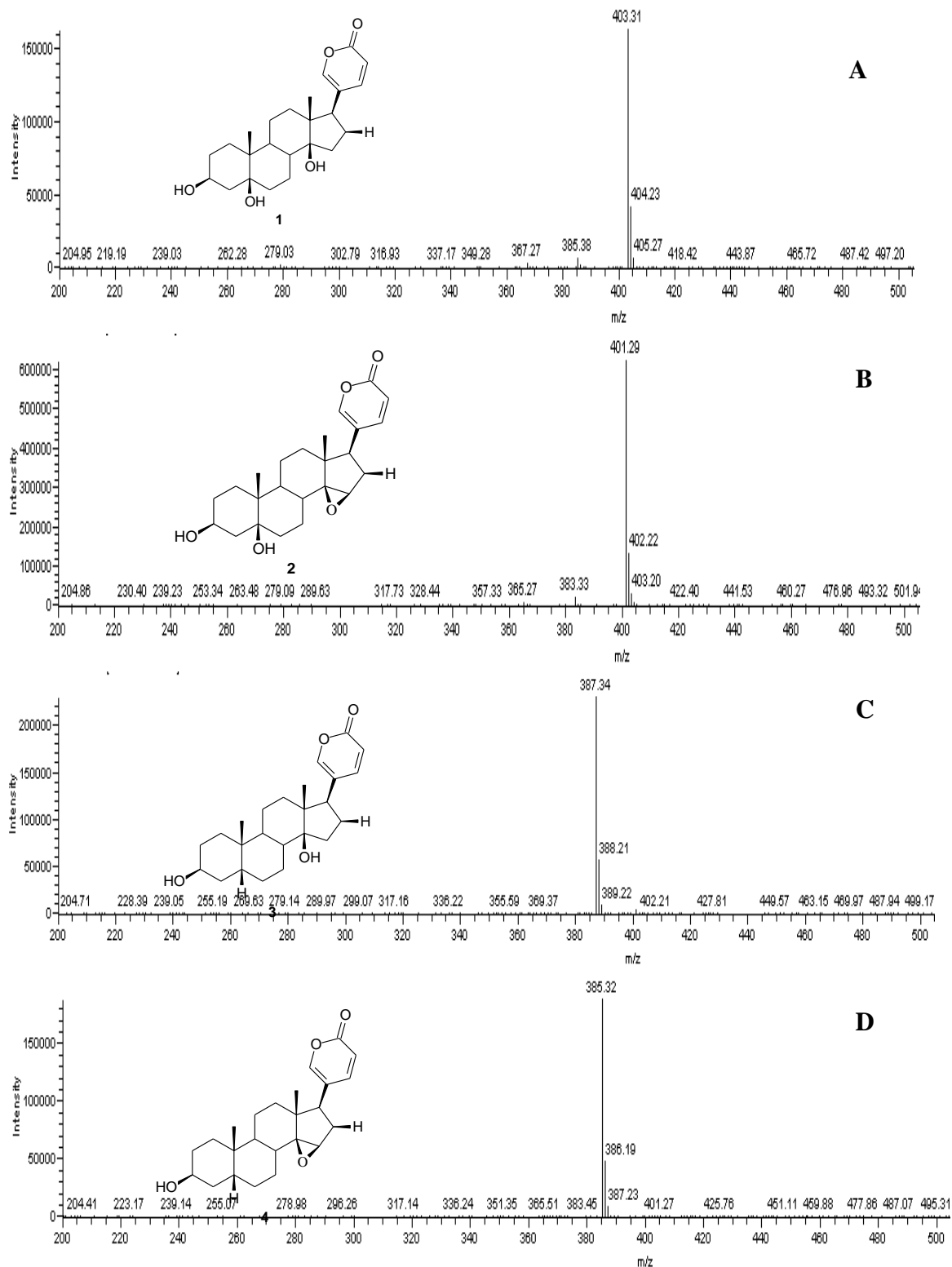
## 5.3 RESULTADOS

Como mostrado na Figura 1, o perfil cromatográfico revela quatro bufadienolídeos nos extratos de *R. marina* (RMF-1 e RMM-5), nomeadamente telocinobufagina (1), marinobufagina (2), bufalina (3) e resinobufogenina (4) (Figuras 1 e 2), ao passo que no veneno de *R. guttatus* (RGF -6 e RGM -9) somente um bufadienolídeo foi identificado (marinobufagina - 2). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões e com base em UV e espectros de massa. Estas descobertas estão concordância com dados anteriores para *B. marinus* (GAO et al., 2010).

**Figura 1.** Cromatogramas do HPLC dos extratos de venenos de sapos de *R. marina* fêmea RMF-1 (A), *R. marina* RMM-5 (B), *R. guttatus* RGF-6 (C) e *R. guttatus* RGM-9 (D). Telocinobufagina (1), marinobufagina (2), bufalina (3) e resinobufogenina (4).



**Figura 2.** Espectros ESI do íon quasi-molecular  $[M + H]^+$  + dos compostos identificados nos extratos de *R. marina* (macho/fêmea). (A) telocinobufagin (1)  $[M + H]^+$  + 403, (B) marinobufagina (2)  $[M + H]^+$  + 401, (C) bufalina (3)  $[M + H]^+$  + 387, (D) resibufogenina (4)  $[M + H]^+$  + 385.



No que diz respeito às avaliações biológicas, em primeiro lugar, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos de veneno de *R. marina* e *R. guttatus* em uma variedade de linhagens de células tumorais após a exposição por 72h utilizando o ensaio MTT. Todos os extratos dos venenos de *R. marina* macho/fêmea revelaram alta atividade citotóxica, com valores de  $CI_{50}$  variando de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  [RMF-1, RMF-4, RMF-5 (HL-60); RMF-4, RMF-5 (SF-295) e RMF-4 (HCT-116)] a 0,23  $\mu\text{g/mL}$  (linhagem de células OVCAR-8) (Tabela 1). Por outro lado, os extratos dos venenos de *R. guttatus* apresentaram ação citotóxica menores quando comparados aos encontrados em *R. marina*, considerando que os seus valores de  $CI_{50}$  foram cerca de 2,9 - 6,6  $\mu\text{g/mL}$ . Em segundo lugar, foi determinada a citotoxicidade contra as células normais, utilizando CMSP humanas para esta finalidade. Aqui, foram encontradas valores de  $CI_{50}$  maiores para os leucócitos em proliferação (0,8; 0,5; 0,4; 0,3; 1,1; 0,8; 16; 13,1 e 13,9  $\mu\text{g/mL}$  para a RMF-1, RMF-2, RMF-4, 5-RMF, RMM -1, RGF-1, RGF-2, RGF-3 e RGM-1, respectivamente) (Tabela 2).

**Tabela 1** – Potencial citotóxico dos extratos de veneno de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* em linhagem de células cancerígenas humanas após 72h de exposição avaliado pelo ensaio MTT.

Extrato	CI <sub>50</sub> (µg/mL)*			
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116
<b>RMF-1</b>	0.03	0.06	0.01	0.02
	0.03 – 0.04	0.05 – 0.09	0.008 – 0.01	0.01 – 0.02
<b>RMF-2</b>	0.08	0.09	0.05	0.06
	0.06 – 0.09	0.07 – 1.0	0.04 – 0.06	0.04 – 0.07
<b>RMF-4</b>	0.01	0.03	0.01	0.01
	0.01 – 0.02	0.02 – 0.03	0.01 – 0.01	0.01 – 0.01
<b>RMF-5</b>	0.01	0.03	0.01	0.02
	0.01 – 0.02	0.02 – 0.03	0.01 – 0.02	0.01 – 0.02
<b>RMM-1</b>	0.09	0.23	0.07	0.06
	0.08 – 0.11	0.18 – 0.28	0.05 – 0.09	0.04 – 0.08
<b>RGF-1</b>	4.0	2.9	3.2	4.0
	3.2 – 5.0	2.1 – 4.0	2.8 – 3.6	2.6 – 5.9
<b>RGF-2</b>	3.2	3.8	4.6	3.1
	2.7 – 3.8	3.1 – 4.9	2.2 – 7.5	2.0 – 4.7
<b>RGF-3</b>	4.8	5.2	3.6	4.9
	4.1 – 5.6	4.4 – 6.2	2.9 – 4.4	4.4 – 5.4
<b>RGM-1</b>	6.6	4.5	4.9	5.9
	5.2 – 8.4	3.2 – 6.5	4.1 – 6.1	3.8 – 9.1
<b>Doxorrubicina</b>	0.2	1.3	0.02	0.01
	0.2 – 0.3	1.0 – 1.9	0.01 – 0.02	0.01 – 0.02

\* Os dados são apresentados como valores de CI<sub>50</sub> e os intervalos de confiança de 95% para a leucemia (HL-60), carcinoma do cólon (HCT-116), carcinoma do ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. *Rhinella marina* fêmea/macho (RMF / RMM); *Rhaebo guttatus* fêmea/macho (RGF / RGM).

**Tabela 2** – Estudo hemolítico dos extratos de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* determinados espectrofotometricamente a 540 nm e atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quantificados pelo ensaio do Alamar Blue.

Extrato	CE <sub>50</sub> (µg/mL)*	CI <sub>50</sub> (µg/mL)**	Seletividade***
	Eritrócitos humanos	CMSP	
<b>RMF-1</b>	> 200	0.8 (0.6 – 0.9)	80
<b>RMF-2</b>	> 200	0.5 (0.3 – 0.7)	10
<b>RMF-4</b>	> 200	0.4 (0.2 – 0.6)	40
<b>RMF-5</b>	> 200	0.3 (0.2 – 0.4)	30
<b>RMM-1</b>	> 200	1.1 (0.5 – 2.4)	15.6
<b>RGF-1</b>	33.7 (28.1 – 40.5)	0.8 (0.6 – 0.9)	0.3
<b>RGF-2</b>	30.8 (27.7 – 34.2)	16.0 (10.6 – 24.3)	3.5
<b>RGF-3</b>	20.8 (15.8 – 27.4)	13.1 (11.1– 15.4)	3.6
<b>RGM-1</b>	27.9 (22.8 – 34.3)	13.9 (11.0 – 17.6)	2.8
<b>Doxorubicina</b>	Nd****	0.9 (0.5 – 1.8)	45

\* Os dados são apresentados como valores de CE<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95% para eritrócitos humanos, após 1 h de incubação. Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo.

\*\* Os dados são apresentados como valores de CI<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95% para as CMSP após 72 h de exposição. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

\*\*\* Coeficiente de seletividade determinada pela CI<sub>50</sub> em CMSP/ CI<sub>50</sub> em células HL-60 (ver Tabela 1). *Rhinella marina* fêmea/macho (RMF / RMM); *Rhaebo guttatus* fêmea/macho (RGF / RGM). As experiências foram realizadas em triplicata.

\*\*\*\* Não determinado.

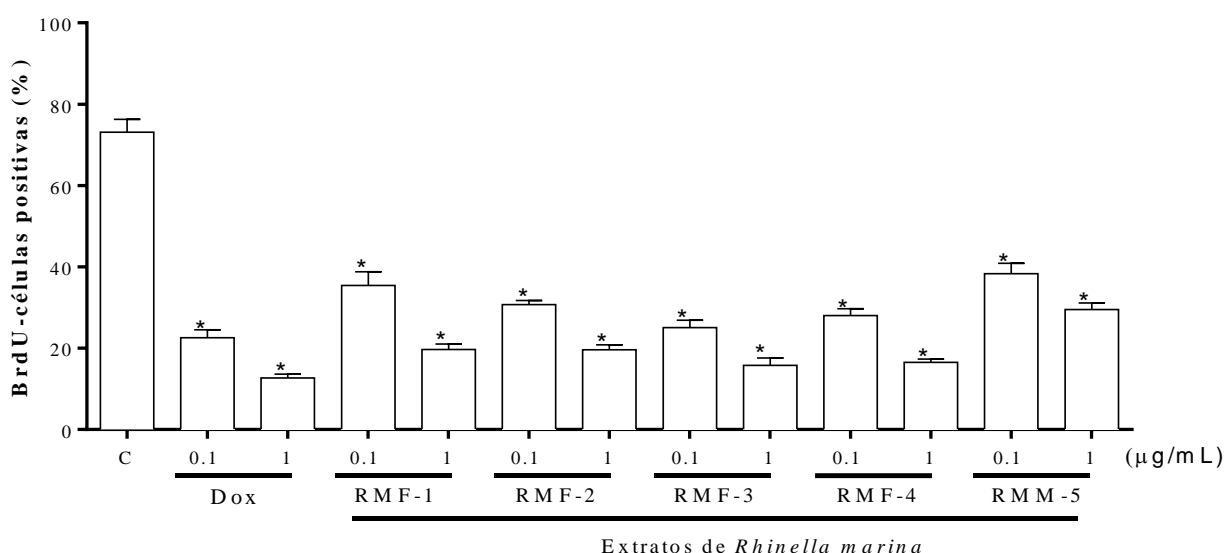
Para entender esta potente atividade citotóxica, análises citolíticas *in vitro* foram realizadas com eritrócitos humanos. Curiosamente, os extratos mais promissores obtidos a partir de *R. marina* (RMF-1, RMF-2, RMF-4, RMF-5 e RMM-1) não foram capazes de causar hemólise, mesmo na maior concentração testada (200 µg/mL) (Tabela 2). Por outro lado, todos os extratos dos venenos de *R. guttatus* levaram a hemólise, com valores de CE<sub>50</sub> variando de 20,8 (RGF-3) a 33,7 µg/mL (RGF-1).

A incorporação de BrdU no DNA foi medida em células HL-60 tratadas com o extrato de veneno de *R. marina* após exposição por 24 h. Como pode ser visto na Figura 3, os extratos (RMF-1, RMF-2, RMF-4, RMF-5 e RMM-1) diminuiu a incorporação de BrdU, mostrando rotulagem de 35,4 ± 3,4; 30,7 ± 1,0; 25,1 ± 1,8; 28,0 ± 1,7 e 38,3 ± 2,6% a 0,1 µg/mL e 19,7 ± 1,3; 19,6 ± 1,2; 15,8 ± 1,8; 16,5 ± 0,8 e 29,5 ± 1,6% a 1 µg/mL, respectivamente, quando



comparadas com as células não tratadas ( $73,0 \pm 3,2\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Dox ( $0,1$  e  $1 \mu\text{g/mL}$ ) conduziu a  $22,6 \pm 1,9$  e  $12,7 \pm 0,9\%$  de incorporação de BrdU ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3** – Efeitos dos extratos dos venenos de *Rhinella marina* fêmea/macho (RMF/RMM) na incorporação de BrdU (5-bromo-2’deoxiuridina) em células leucêmicas (HL-60) após 24h de incubação, nas concentrações  $0,1$  e  $1 \mu\text{g/mL}$ . Controle negativo (C) foi tratado com veículo usado para diluir a substância testada. Doxorrubicina foi usada como controle positivo (D). Resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) de três experimentos independentes.  $*p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman Keuls.



## 5.4 DISCUSSÃO

A descoberta e o desenvolvimento de medicamentos tem estabelecido um arsenal respeitável de agentes quimioterápicos úteis, bem como um número de sucessos importantes no tratamento e gestão do câncer humano. No entanto, os tumores mais comuns são resistentes aos fármacos antineoplásicos disponíveis e a maior parte destes agentes só têm limitado a atividade contra tumores sólidos (HARRIS, 2002; SRIVASTAVA et al., 2005). Assim, pesquisas para compostos antiproliferativos ainda têm demonstrado a grande relevância farmacológica de extratos (CLARDY; WALSH, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2005; FERREIRA et al., 2011b).

Nas últimas décadas, os sapos têm recebido atenção especial, com muitas publicações sobre as atividades biológicas de moléculas e extratos aquosos e orgânicos obtidos a partir de glândulas da pele, expondo bufadienolídeos, compostos que podem atuar como hormônios

esteróides endógenos (SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2005 ) e exibir efeitos antiangiogênico (LEE et al., 1997), anti-hipertensivos (VU et al., 2006), imunossupressores (TERNESS et al., 2001), anti-endometriose (NASU et al., 2005) e inotrópico positivo (CRUZ; MATSUDA, 1993). Aqui, foi investigada a atividade antiproliferativa de extratos dos venenos de *R. marina* e *R. guttatus* em células transformadas e normais.

Extratos dos venenos de *R. marina* e *R. guttatus* macho/fêmea revelaram atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas após 72h de exposição, principalmente os extratos de *R. marina*, a qual os valores de  $CI_{50}$  são comparáveis aos observados em células de câncer tratadas com Dox. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer Americano (NCI), o limite de  $CI_{50}$  para ser considerado um extrato bruto promissor para purificação adicional e análises biológicas é um valor inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$  (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990; FERREIRA et al., 2011b). Anteriormente, estudos antitumorais *in vitro* semelhantes foram realizados com os gêneros *Rhinella* e *Rhaebo*, dos quais secreções da pele e dos seus componentes (tais como epoximarínobufagina, bufalina, marinobufagina, cinofagina, telocinobufagina, helebregenina, 3 $\beta$ -acetoxi-marinobufagina, 3 $\beta$ -acetoxi-bufalina, 3 $\beta$ -acetoxi-telocinobufagina e 20S, 21R-epoxi-marinobufagina) e bufadienólídeos isolados do fármaco tradicional da China, *Ch'an Su*, apresentaram atividade contra células tumorais, tais como o cólon (células 26-L5), leucemia (K562, U937 e ML1) , melanoma (MDA/MB-435), mama (MCF-7, MDA/MB-231), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP) e carcinoma de fígado primário (PLC/PRF/5) (ZHANG et al ., 1992; NOGAWA et al., 2001; OGASAWARA et al, 2001; KAMANO et al, 2002;. YEH et al, 2003; CUNHA-FILHO et al, 2010; SCIANI et al, 2012).

No que diz respeito ao potencial quimioterápico, é importante determinar se a substância antineoplásica mostra propriedades prejudiciais sobre as células normais (ANAZETTI et al., 2003; SANTOS et al., 2010). Assim, foi realizado culturas primárias de CMSP para avaliar esta capacidade prejudicial dos extratos. Surpreendentemente, a maioria deles foi fracamente citotóxico em CMSP, sendo o extrato RMF-1 até 80 vezes mais seletivo contra células leucêmicas, quando comparado com leucócitos em divisão, uma vantagem muito desejada para novas moléculas alvo anti-cancerígenas para efeitos adversos sobrecarregados devido à estreita janela terapêutica, resistência farmacológica múltipla e semelhanças morfológicas e fisiológicas entre células transformadas e normais. Enquanto isso, Dox demonstrou um coeficiente de seletividade determinada pela  $CI_{50}$  em CMSP/ $CI_{50}$  em HL-60 de 45.

Extratos de *R. marina* não levaram a hemólise mesmo na maior concentração testada, sugerindo que o mecanismo de citotoxicidade é provavelmente relacionado com uma via mais específica e não está associada com a membrana de danos diretos. Corroborando estas

descobertas, Cunha-Filho e colaboradores (2010) e Sciani e colaboradores (2012) não encontraram atividade hemolítica em secreções da pele de anfíbios de *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri* e *R. major* na concentração de 50 µg/mL, embora em *R. jimi*, *R. margaritifera* e *Phyllomedusa hipocondrialis* a ruptura da membrana foi demonstrado após 1h de incubação. Resultados divergentes foram vistos com extratos de venenos de *R. guttatus*, ao passo que todos eles exibiram potencialidade hemolítica, um achado contraditório quando comparado com aquele descrito por Sciani e colaboradores (2012), que reportou injúrias à membrana. É provável que esta diferença deve ser correlacionada com a gama de concentrações estudadas.

Objetivando confirmar os efeitos antiproliferativos dos extratos, um análogo da timidina BrdU, que foi incorporado durante a fase S do ciclo celular, foi utilizado para medir a porcentagem de divisões das células leucêmicas HL-60 tratadas com extratos de *R. marina*. Os extratos de *R. marina* causaram inibição da síntese de DNA, que foi evidenciado pela diminuição na incorporação de BrdU, corroborando com os resultados obtidos com os ensaios de MTT e Alamar Blue™. De fato, as investigações demonstraram que algumas secreções da pele de sapos possuem compostos que são capazes de induzir parada do ciclo celular na fase G2/M, diminuir a viabilidade celular, ativar caspases iniciadoras e efetoras e provocar alterações morfológicas (condensação da cromatina, fragmentação nuclear, retração de citoplasma, descolamento celular, bolhas de membrana e corpos apoptóticos) em carcinomas da próstata e da mama (YEH et al., 2003; SCIANI et al., 2012).

## 5.5 CONCLUSÃO

Em resumo, o presente trabalho selecionou nove extratos de venenos de *R. marina* e *R. guttatus*, que mostraram efeitos letais e pronunciados em linhas tumorais, especialmente os de *R. marina*, destacando secreções da pele de sapo como uma fonte promissora de novos produtos químicos líder contra o câncer.

## REFERÊNCIAS

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261–274, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829–837, 2004.

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

CRUZ, J.S.; MATSUDA, H. Arenobufagin, a compound in toad venom, blocks  $\text{Na}^+$ – $\text{K}^+$  pump current in cardiac myocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 239, p. 223–226, 1993.

CUNHA-FILHO, G.A.; RESCK, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; FERREIRA, J.R.; RODRIGUES, F.A.; DOS SANTOS, M.L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339–348, 2010.

CUNHA-FILHO, G.A.; SCHWARTZ, C.A.; RESCK, I.S.; MURTA, M.M.; LEMOS, S.S.; CASTRO, M.S.; KYAW, C.; PIRES JR., O.P.; LEITE, J.R.S.; BLOCH JR., C.; SCHWARTZ, E.F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777–782, 2005.

DMITRIEVA, R.I.; BAGROV, A.Y.; LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P.; STOCCO, D.M.; DORIS, P.A. Mammalian bufadienolides is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Hypertension**, v. 36, p. 442–448, 2000.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373–1384, 2011a.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SOUZA, T.M.; VASCONCELOS, I.M.; SOARES, B.M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; CARVALHO, A.F.F.U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011b.

FROST, D.R.; GRANT, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R.H.; HAAS, A.; HADDAD, C.F.B.; DE SÁ, R.O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S.C.; RAXWORTHY, C.J.; CAMPBELL, J.A.; BLOTTO, B.L.; MOLER, P.; DREWES, R.C.; NUSSBAUM, R.A.; LYNCH, J.D.; GREEN, D.M.; WHEELER, W.C. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum Natural History**, v. 297, p. 1–370, 2006.

GAO, H.; ZEHL, M.; LEITNER, A.; WU, X.; ZHIMIN, W.; KOPP, B. Comparison of toad venoms from different *Bufo* species by HPLC and LCDAD- MS/MS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 368–376, 2010.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPP, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 953–969, 2011.

HARRIS, A.L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 38–47, 2002.

IMAI, S.; MURASE, H.; KATORI, M.; OKADA, M.; SHIGEI, T. A study on the structure–activity relationship of the cardiotonic steroids. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 62–71, 1965.

KAMANO, Y.; SATOH, N.; NAKAYOSHI, H.; PETTIT, G.R.; SMITH, C.R. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 326–332, 1988.

KAMANO, Y.; KOTAKE, A.; HASHIMA, H.; INOUE, M.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; NANDACHI, N.; SEGAWA, T.; YUKITA, A.; SAITOU, K.; KATSUYAMA, M.; PETTIT, G.R. Structure-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1103–1115, 1998.

KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; NOGAWA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SEGAWA, T.; YUKITA, A.; SAITO, K.; KATSUYAMA, M.; PETTIT, G.R.. QSAR evaluation of the Chan'Su and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5440–5447, 2002.

LEE, D.Y.; YASUDA, M.; YAMAMOTO, T.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis *in vitro*. **Life Science**, v. 60, p. 127–134, 1997.

MILITÃO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; FERREIRA, P.M.P.; ALVES, A.P.N.N.; CHAVES, D.C.; MONTE, F.J.Q.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 1479–1487, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

NASU, K.; NISHIDA, M.; UEDA, T.; TAKAI, N.; BING, S.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Bufalin induces apoptosis and the G0/G1 cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p. 817–823, 2005.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G.R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148–1152, 2001.

OGASAWARA, M.; MATSUBARA, T.; SUZUKI, H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 720–723, 2001.

PERA, F.; MATTIAS, P.; DETZER, K. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 10, p. 255–264, 1977.

PRAMUK, J.B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, p. 407–452, 2006.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364–369, 2001.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Roca, 2005.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 205–215, 2010.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer. **Seminars in Nephrology**, v. 25, p. 343–351, 2005.

SCIANI, J.M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.L.; FERREIRA, A.K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; PIMENTA, D.C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 10–18, 2012.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K.; GUPTA, M.; KHANUJA, S.P.S. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5892–5908, 2005.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Academic Press, London, p. 71–133, 1990.

SUPRATMAN, U.; FUGITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 1310–1312, 2000.

TEMPONE, A.G.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.N.; DE ANDRADE JR. H.F.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13–21, 2008.

TERNESS, P.; NAVOLAN, D.; DUFTER, C.; KOPP, B.; OPELZ, G. The T-cell suppressive effect of bufadienolides: structural requirements for their immunoregulatory activity. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 119–134, 2001.

TOLEDO, R.R.; JARED, R. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 111, p. 1–29, 1995.

VIEIRA JÚNIOR, G.M.; DUTRA, L.A.; FERREIRA, P.M.P.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; TORRES, R.B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Casearia rupestris*. **Journal of Natural Products**, v. 74, 776–781, 2011.

VU, H.; IANOSI-IRIMIE, M.; DANCHUK, S.; RABON, E.; NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; PETTIT, G.R.; WIESE, T.; PUSCHETT, J.B. Resibufogenin corrects hypertension in a rat model of human preeclampsia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 215–220, 2006.

WANG, D.L.; QI, F.H.; TANG, W.; WANG, F.S. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Chemistry & Biodiversity** v. 8, p. 559–567, 2011.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Research**, v. 45, p. 1–8, 1985.

XU-TAO, C.; DONG, W.; NA, W.; ZHENG, C. Water-soluble constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, p. 181–183, 2009.

YANG, J.; ZHANG, Y.H.; MIAO, F.; ZHOU, L.; SUN, W. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch. **Fitoterapia**, v. 81, p. 636–639, 2010.

YEH, J.Y.; HUANG, W.J.; KAN, S.F.; WANG, P.S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p. 112–124, 2003.

ZHANG, L.S.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward

macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Research**, v. 52, p. 463–4641, 1992.



**CAPÍTULO III:**

**6 Atividade citotóxica, alterações morfológicas e antileucêmicas causadas pelo  
bufadienolídeo Marinobufagina**

Trabalho a ser submetido ao periódico Toxicon

**Atividade citotóxica, alterações morfológicas e antileucêmicas causadas pelo  
bufadienolídeo Marinobufagina**

Kátia da Conceição Machado<sup>a</sup>, Bruno Marques Soares<sup>b</sup>, Daisy Jereissati Barbosa Lima<sup>b</sup>,  
Bryan Wender Debiase<sup>c</sup>, Janaina da Costa Noronha<sup>c</sup>, Domingos de Jesus Rodrigues<sup>d,e</sup>,  
Adilson Paulo Senhorin<sup>c,d</sup>, Cláudia Pessoa<sup>b</sup>, Gerardo Magela Vieira Júnior<sup>c,d</sup>, Paulo Michel  
Pinheiro Ferreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Laboratórios Integrados de Pesquisa em Ciências Químicas (LIPEQui), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil

<sup>e</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Acervo Biológico da Amazônia Meridional (ABAM), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267, Sinop, Mato Grosso, Brasil

## **RESUMO**

A maioria dos quimioterápicos tem origem ou são baseados em moléculas provenientes de plantas ou animais. Dentre as variadas fontes naturais, os sapos ganham destaque pela variabilidade de constituintes presentes em suas secreções cutâneas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e analisar o padrão de morte celular do composto marinobufagina isolado do veneno do sapo *Rhinella marina*. Assim, foram realizados ensaios de citotoxicidade por meio do MTT contra quatro linhagens de células tumorais [HL-60 (leucemia), OVCAR-8 (ovário), HCT-116 (cólon) e SF-295 (glioblastoma)]. Os resultados demonstraram que o bufadienolídeo marinobufagina possui ação citotóxica promissora frente as linhagens testadas, com valores de  $CI_{50}$  menores que 0,18  $\mu\text{g/mL}$  após 72h de incubação e análise pelo ensaio de MTT. Teste de toxicidade foi realizado por meio do

teste *Allium cepa*, em que a substância testada apresentou toxicidade nas duas maiores concentrações testadas (0,1 µg/mL:  $0,6 \pm 0,08$  cm; 0,5 µg/mL:  $0,36 \pm 0,03$  cm), e citotoxicidade, inibindo o índice mitótico na maior concentração testada (0,5 µg/mL:  $3,22 \pm 0,25$  %). Na menor concentração (0,01 µg/mL), apresentou aberrações cromossômicas, como pontes, fragmentos e atrasos em anáfases. Em estudos de mecanismo de ação com células leucêmicas HL-60, a marinobufagina reduziu o número de células viáveis analisadas pelo teste de exclusão de azul de tripan ( $61,3 \pm 4,4$  e  $39,7 \pm 7,4$ %) e aumentou o percentual de células apoptóticas nas duas maiores concentrações testadas ( $37,6 \pm 3,2$  e  $68,0 \pm 2,8$ % para 0,1 e 0,5 µg/mL, respectivamente) ( $P < 0,05$ ) na avaliação por microscopia de fluorescência e coloração com brometo de etídio e laranja de acridina após 24h de incubação. As alterações morfológicas sugestivas de apoptose, tais como vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear e picnose observadas nos estudos de microscopia de fluorescência foram confirmadas por microscopia óptica após coloração com hematoxilina/eosina. Em suma, a molécula marinobufagina revelou grande potencial citotóxico contra as linhagens tumorais, indicando morte celular sugestiva de apoptose em células leucêmicas.

**Palavras-chave:** Antileucêmicas. Citotoxicidade. Marinobufagina.

## ABSTRACT

Most chemotherapeutic or stems are based on molecules from plants or animals. Among the various natural sources, the frogs are highlighted by the variability of constituents present in their skin secretions. Therefore, this study aimed to evaluate the cytotoxicity and analyze the pattern of cell death marinobufagin compound isolated from the venom of frog *Rhinella marina*. Thus, cytotoxicity assays were performed using the MTT against four tumor cell lines [HL-60 (leukemia), OVCAR-8 (ovarian) HCT-116 (colon) and SF-295 (glioblastoma)]. The results showed that the marinobufagina bufadienolídeo has promising cytotoxic action on the strains tested, with  $IC_{50}$  values lower than 0.18  $\mu\text{g/mL}$  after 72h incubation and analyzed by MTT assay. Toxicity test was performed by means of *Allium cepa*, wherein the test substance showed toxicity at the two highest concentrations tested (0.1  $\mu\text{g/mL}$ :  $0.6 \pm 0.08$  cm, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ :  $0, 36 \pm 0.03$  cm), and cytotoxicity, inhibiting the mitotic index at the highest concentration tested (0.5  $\mu\text{g/mL}$ :  $3.22 \pm 0.25\%$ ). At the lowest concentration (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ) showed chromosomal aberrations, such as bridges, fragments and delays in anaphases. In studies of the mechanism of action with leukemic HL-60 cells, the marinobufagina reduced the number of viable cells assessed by exclusion of trypan blue test ( $61.3 \pm 4.4$  and  $39.7 \pm 7.4\%$ ) and increased the percentage of apoptotic cells in the two highest concentrations tested ( $37.6 \pm 3.2$  and  $68.0 \pm 2.8\%$  for 0.1 and 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) ( $P < 0.05$ ) the evaluation by fluorescence microscopy and staining with ethidium bromide and acridine orange after 24h of incubation. The morphological changes suggestive of apoptosis, such as cytoplasmic vacuolization, nuclear fragmentation and pyknosis observed in studies of fluorescence microscopy were confirmed by light microscopy after staining with hematoxylin/eosin. In short, marinobufagin molecule revealed great potential cytotoxicity against tumor cell lines, indicating cell death suggestive of apoptosis in leukemic cells.

**Keywords:** Antileukemic. Cytotoxicity. Marinobufagin.

## 6.1 INTRODUÇÃO

Cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas e primárias de saúde (WHO, 2011). Entre 1981 e 2010, das 1.073 novas entidades químicas (*New Chemical Entities* - NCEs) aprovadas como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, apenas 36% foram classificadas como verdadeiramente sintéticas, sendo que 64% são moléculas naturais, derivadas ou sintetizadas com base em compostos naturais. (NEWMAN; CRAGG, 2012; FERREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2013). O Brasil detém uma expressiva biodiversidade faunística e botânica, terrestre ou marinha, grande parte ainda não explorada em diversos aspectos, demonstrando seu potencial para exploração de produtos naturais disponíveis (COSTA-NETO, 2005).

A maioria dos quimioterápicos tem origem ou são baseados em moléculas provenientes de plantas ou animais. Desde 1500 a.C., os produtos naturais têm sido reconhecidos como detentores de potencial anticâncer (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre as fontes naturais, animais produtores de toxinas fazem parte do costume, da medicina tradicional e, até mesmo, da culinária de diversos países ao redor do mundo (COSTA-NETO, 2005). Assim, as secreções animais têm representado uma importante ferramenta para a saúde humana, auxiliando no entendimento de diversos processos fisiológicos ou patológicos e na geração de inovações farmacológicas e de conhecimento sobre a composição química de extratos e substâncias (RAJENDRA et al., 2004).

Animais como os anfíbios apresentam substâncias farmacologicamente ativas em sua pele com funções principais de protegê-los contra infecções de microorganismos e defesa contra predadores (DALY, 1995; DUELLMAN; TRUEB, 1996). Assim, as secreções animais têm representado uma importante ferramenta para a saúde humana, auxiliando no entendimento de diversos processos fisiológicos ou patológicos e na geração de inovações farmacológicas e de conhecimento sobre a composição química de extratos e substâncias (RAJENDRA et al., 2004). Nos bufonídeos em geral, a secreção venenosa contém basicamente esteróides, aminas biogênicas e proteínas (ZELNIK et al., 1965; PERRY, 2000).

Alguns bufadienolídeos possuem atividade antitumoral, como descrito para bufalina, esquilareína, bufotalina, gamabufotalina, cinobufotalina e cinobufagina e (XU et al., 2007). O interesse em desenvolver bufadienolídeos isolados de sapos como agentes anticâncer vem aumentando progressivamente, pois estas substâncias com ação cardiotônica tem revelado atividade antitumoral (IMAI et al., 1965; CUNHA-FILHO et al., 2010; FERREIRA et al.,

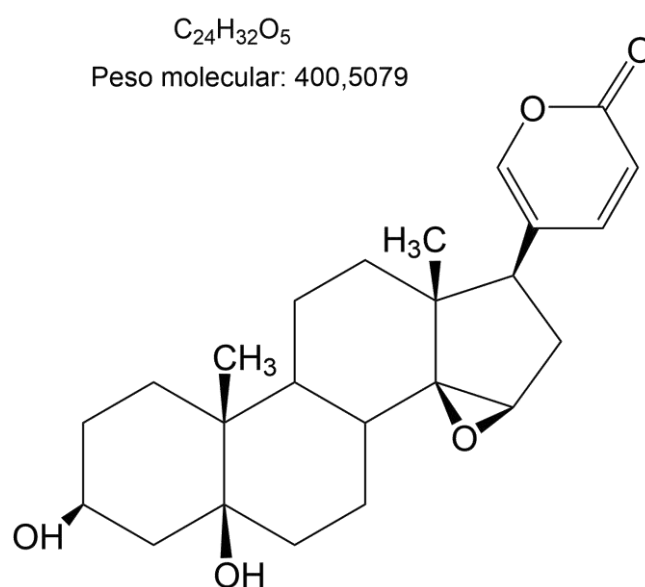
2013). O membro mais amplamente estudado da família dos bufadienolídeos é a marinobufagina, um agente natriurético com atividades vasoconstritoras, que apresenta uma maior afinidade para a subunidade  $\alpha$ -1 da  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase resistente à ouabaína, a principal isoforma da bomba de sódio encontrada nos túbulos renais (LENAERTS et al., 2013). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da marinobufagina, isolado do veneno do sapo *Rhinella marina* contra linhagens de células tumorais e do modelo vegetal *Allium cepa* e analisar o padrão de morte celular causado por este bufadienolídeo.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Coleta, isolamento e identificação do composto

O veneno de sapo foi coletado da secreção de *R. marina* no estado de Mato Grosso, Brasil. Os animais foram identificados pelo professor Dr. Geraldino Andrade Cunha-Filho (D.J.R. – IBAMA, SISBIO: número 30034-1). Modelos das espécies (*R. marina* - ABAM-H 1262) foram depositadas no Acervo Biológico da Amazônia Meridional (Sinop, Mato Grosso, Brasil). A identificação e extração da molécula marinobufagina (**Figura 1**) foram realizadas conforme Cunha-Filho e colaboradores (2005) e Ferreira e colaboradores (2013).

**Figura 1** – Estrutura molecular da marinobufagina.



### 6.2.2 Ensaio de Citotoxicidade em células tumorais humanas

A citotoxicidade contra células tumorais de leucemia promielocítica humana (HL-60), glioblastoma (SF-295), carcinoma de cólon humano (HCT-116) e adenocarcinoma ovariano (OVCAR-8) (Tabela 1) foi determinada pelo ensaio de MTT (MOSMANN, 1983), que analisa a habilidade das células vivas em reduzir o corante amarelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto violeta, formazan. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas para permitir a adesão celular. Após vinte e quatro horas, os extratos foram adicionados em cada poço (0,004 – 50 µg/mL). Após 72h de incubação, o sobrenadante foi aspirado e adicionado meio fresco contendo 10% de MTT e o produto formazan foi dissolvido em DMSO. A absorbância foi medida a 595nm.

**Tabela 1** – Concentração das linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* do MTT.

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>
<b>HL-60</b>	Leucemia promielocítica humana	0,3 x 10 <sup>6</sup>
<b>SF-295</b>	Glioblastoma humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>
<b>HCT-116</b>	Carcinoma de cólon humano	0,7 x 10 <sup>5</sup>
<b>OVCAR-8</b>	Adenocarcinoma de ovário humano	0,1 x 10 <sup>6</sup>

### 6.2.3 Ensaio lise de membrana

Esta metodologia, segundo Costa-Lotuf e colaboradores (2002), permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Utilizando Triton X-100 como controle. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o

sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

#### 6.2.4 *Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal de Allium cepa*

O teste *Allium cepa* tem sido utilizado para avaliar os danos ao DNA, tais como aberrações cromossômicas, micronúcleos e distúrbios no ciclo mitótico. Foi realizado segundo descrição de Fiskesjö (1985). Foram utilizados cinco bulbos para cada concentração da marinobufagina (0,01; 0,1 e 0,5 µg/mL) e para os controles negativo (água desclorificada) e positivo (sulfato de cobre 0,0006 mg/mL). Após o tempo de crescimento, as raízes foram removidas e as mesmas foram fixadas em solução Carnoy (3:1) por 24 horas. As raízes foram transferidas para frascos contendo o reativo de Schiff, por aproximadamente 2 horas. Após isso, as raízes foram lavadas com água destilada, até a total retirada do corante. Foram colocadas sobre uma lâmina e realizada uma incisão para a separação da região meristemática. Aos materiais seccionados, foi adicionada uma gota de carmim acético 2% e as lâminas foram cobertas com lamínulas. Para análise, foi utilizado microscópio óptico em um aumento de 400X, sendo observadas 5.000 células por concentração (1000 células/lâmina), avaliando quanto ao Índice Mitótico (IM), micronúcleos e aberrações cromossômicas.

#### 6.2.5 *Estudo do mecanismo de ação*

Para os estudos de mecanismo de ação, foi utilizada a linhagem HL-60. Assim, células da linhagem HL-60, na concentração de  $0,3 \times 10^6$  céls/mL, foram incubadas por 24 h com a marinobufagina. As concentrações utilizadas (0,01; 0,1 e 0,5 µg/mL) foram estimadas a partir do valor da  $CI_{50}$  encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular por um período de 24 h de incubação. A doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo (0,3 µg/mL).

##### *- Exclusão por Azul de Tripan*

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração



azulada nas células mortas. Após 24 h de tratamento, 90 µL da suspensão de células foram retirados e 10 µL do azul de tripan foram adicionados. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer (RENZI et al., 1993).

*- Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina*

A coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma, conferindo-lhe uma coloração rósea. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâminas (Cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com etanol 96 % por 1 min e a coloração foi feita com hematoxilina de Hanks (0,1 %), seguida pela eosina (0,5 %).

*- Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina*

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose por meio da revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995). Após 24 h de tratamento, uma suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação (1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de BE/LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota destas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo (GENG et al., 2003).

*- Citometria de Fluxo*

Todas as análises foram realizadas no citômetro *Guava EasyCyte Mine*<sup>®</sup> (*Guava Express Plus software*). Cinco mil eventos foram contabilizados em cada experimento e os debris celulares foram omitidos das análises.

A citometria de fluxo (*EasyCyte, Guava Technologies*<sup>®</sup>) é capaz de comparar populações de células quanto às características de tamanho e de granulosidade (relativo a organelas, vacúolos etc) usando um laser de argônio (488 nm). A partir desta ferramenta, é possível delimitar a região (através de um *gate*) que compreende a população de células normais realizando a contagem da população de interesse.

A integridade de membrana foi determinada utilizando iodeto de propídeo (*Propidium Iodide* - PI) na concentração de 50 µg/mL após 24 h de incubação. De cada poço, 100 µL da suspensão de células foram incubados com PI diluído em tampão salina-fosfato (*Phosphate-Buffered Saline* - PBS) por 5 min. A fluorescência foi então medida para permitir a observação de mudanças na morfologia, granulosidade e integridade de membrana (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Na avaliação da fragmentação do DNA, foi analisado a capacidade do iodeto de propídeo de ligar-se ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células foram lisadas por um detergente, permitindo que o PI ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o DNA íntegro emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI e por isso emitem menor fluorescência, sugestivo de apoptose. Além disso, o PI consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular, através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular (FISCHER et al., 2004). Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de lise (0,1 % de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2 µg/mL de iodeto de propídeo em PBS). Após um período de 30 minutos, onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (NICOLETTI et al., 1991).

A externalização do fosfolípídeo de membrana, fosfatidilserina (PS) é, frequentemente, um dos primeiros eventos a ocorrer quando a célula entra em apoptose (VERMES et al., 1995). A externalização de PS foi analisada por citometria de fluxo após exposição à Marinobufagina através da marcação de fosfatidilserina com a anexina V após 24 h de tratamento (VERMES et al., 1995). Para tanto, foi utilizado o kit Guava Nexin<sup>®</sup> Reagent. Um volume de 100 µL de células de cada poço foi adicionado aos 100 µL do reagente de trabalho. Este reagente é composto por anexina V conjugada com ficoeritrina e em associação com 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD). Em seguida, as células foram levemente agitadas e incubadas por 20 min em temperatura ambiente (25 °C) e protegido da luz. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por

fluorescência amarela (583 nm) e o 7-AAD na fluorescência vermelha (680 nm). A percentagem de células viáveis, apoptóticas inicial e tardia e necróticas foi calculada.

### *Análise Estatística*

Os valores de  $CI_{50}$  e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão linear. Os resultados apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido por Newman-Keuls utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) considerando  $p < 0,05$ .

## **6.3 RESULTADOS**

### *6.3.1 Atividade Citotóxica e Hemolítica*

A avaliação da atividade citotóxica da marinobufagina foi realizada pelo método do MTT contra quatro linhagens de células tumorais. Os valores de  $CI_{50}$ , determinados após 72 h de incubação com a substância, estão representados na **Tabela 1**. A marinobufagina se mostrou citotóxica contra todas as linhagens celulares, mostrando valores menores de  $CI_{50}$  para HL-60 e HCT-116 (0,06  $\mu\text{g/mL}$ ). Os estudos de atividade hemolítica foram realizados utilizando suspensão de eritrócitos de camundongos a 2 %. A substância não foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (200  $\mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que a atividade citotóxica não seja causada por danos diretos à membrana celular.

**Tabela 2** – Atividade citotóxica *in vitro* da molécula marinobufagina isolada do veneno de *Rhinella marina* avaliada pelo método MTT após 72h de incubação.

Amostra	CI <sub>50</sub> (µg/mL)*			
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116
<b>Marinobufagina</b>	<b>0,18</b> 0,15 – 0,21	<b>0,10</b> 0,09 – 0,13	<b>0,06</b> 0,05 – 0,07	<b>0,06</b> 0,05 – 0,08
<b>Doxorrubicina</b>	<b>0,20</b> 0,2 – 0,3	<b>1,30</b> 1,0 – 1,9	<b>0,02</b> 0,01 – 0,02	<b>0,01</b> 0,01 – 0,02

\*Os dados são apresentados como valores de CI<sub>50</sub> e os intervalos de confiança de 95% para células de leucemia (HL-60), carcinoma do cólon (HCT-116), carcinoma do ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295).

### 6.3.2 Toxicidade, citotoxicidade e alterações cromossômicas frente ao *Allium cepa*

Na **Tabela 3** está exposto média dos índices mitóticos e tamanho das raízes referentes a exposição da marinobufagina nos bulbos de *Allium cepa* nas três concentrações testadas (0,01; 0,1 e 0,5 µg/mL). Foi observado que apenas as duas maiores concentrações (0,1 e 0,5 µg/mL) foram estatisticamente significantes quando comparadas ao controle negativo, tanto o índice mitótico quanto o tamanho das raízes.

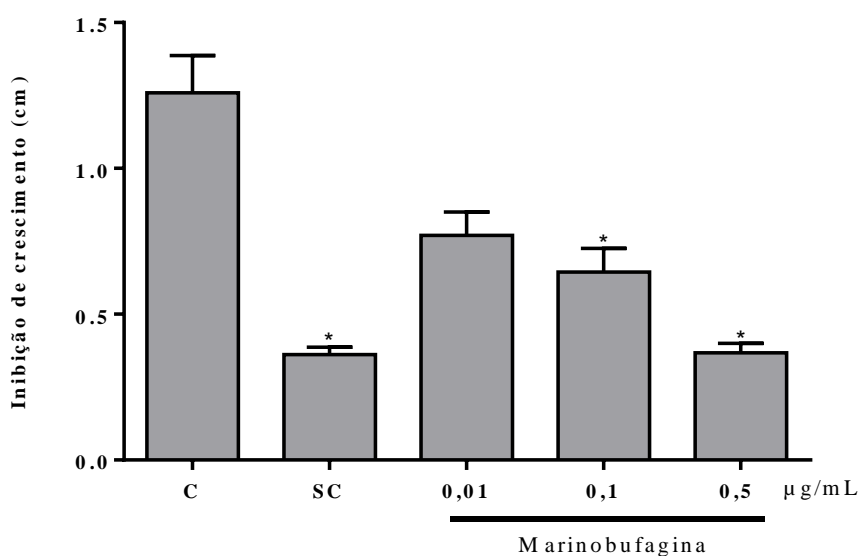
**Tabela 3:** Índice mitótico e tamanho das raízes pelo sistema teste *Allium cepa* expostas a marinobufagina por 72 h.

Grupo (µg/mL)	Índice Mitótico (%)	Tamanho das raízes (cm)
CN	52,90 ± 5,870	1,25 ± 0,12
CP	1,90 ± 0,41 *	0,36 ± 0,02 *
<b>Marinobufagina 0,01</b>	6,63 ± 0,43	0,77 ± 0,07
<b>Marinobufagina 0,1</b>	4,29 ± 0,32 *	0,64 ± 0,08 *
<b>Marinobufagina 0,5</b>	3,22 ± 0,25 *	0,36 ± 0,03 *

\*Média ± Desvio Padrão. CN (Água desclorificada); CP (solução de sulfato de cobre). Resultados expressos em média ± desvio padrão. Kruskal-Wallis test. Significâncias para \*p < 0,05.

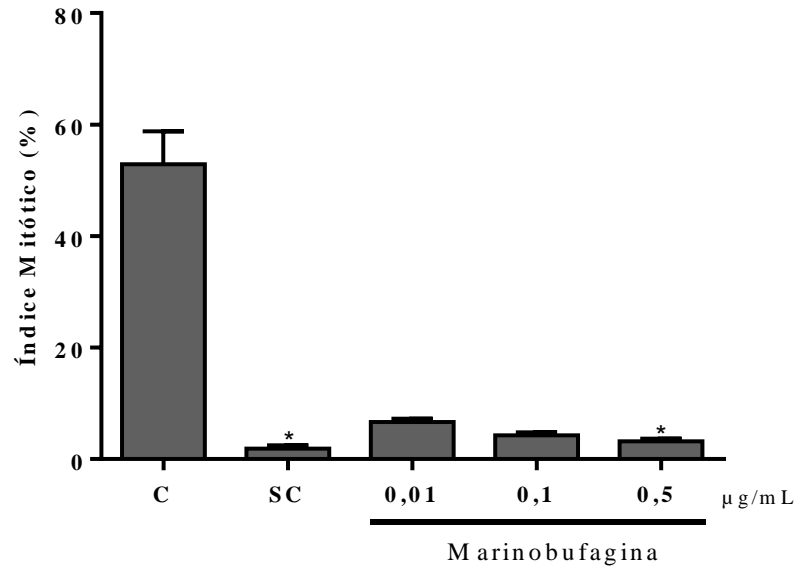
A marinobufagina inibiu o crescimento de raízes de *Allium cepa* após 72 h de exposição nas duas maiores concentrações testadas (0,1 µg/mL:  $0,6 \pm 0,08$  cm; 0,5 µg/mL:  $0,36 \pm 0,03$  cm) (**Figura 2**) quando comparadas ao controle negativo ( $1,25 \pm 0,12$  cm), sugerindo, portanto, toxicidade em parâmetro macroscópico ( $p < 0,05$ ).

**Figura 2** - Inibição do crescimento de raízes de *Allium cepa* expostas a marinobufagina isolada do veneno de *Rhinella marina* após 72h de incubação. CN (controle negativo-água desclorificada); CP (controle positivo-solução de sulfato de cobre). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Kruskal-Wallis test. Significâncias para \* $p < 0,05$ .



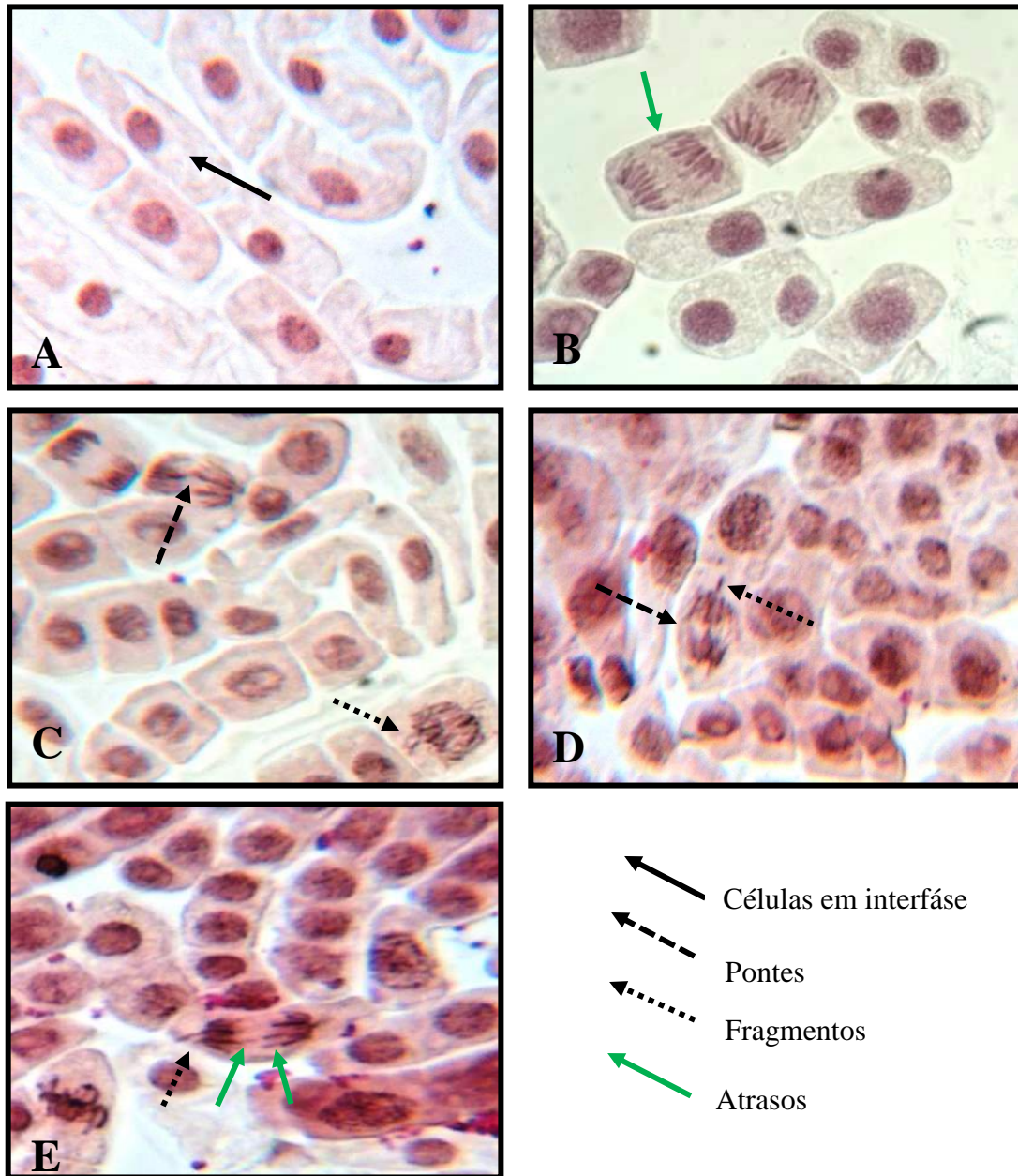
Em parâmetros microscópicos, a marinobufagina também induziu citotoxicidade pela inibição do IM na maior concentração testada (0,5 µg/mL,  $3,22 \pm 0,25$  %), em comparação com o controle negativo ( $52,9 \pm 5,9$  %). O controle positivo também apresentou inibição do IM ( $1,9 \pm 0,32$ %), como apresentado na **Figura 3** ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3** - Inibição da divisão celular de meristemas de *Allium cepa* expostos a marinobufagina, isolada do veneno de *Rhinella marina*. Controle negativo utilizado foi água desclorificada; CP (controle positivo-solução de sulfato de cobre). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. *Kruskal-Wallis test*. Significâncias para \* $p < 0,05$ .



As alterações cromossômicas também foram avaliadas no teste citogenético em meristemas de *A. cepa* expostas a marinobufagina, indicando que na menor concentração testada (0,01 µg/mL) foram evidenciadas alterações cromossômicas em anáfase do tipo pontes, fragmentos e cromossomos em atrasos (**Figura 4**).

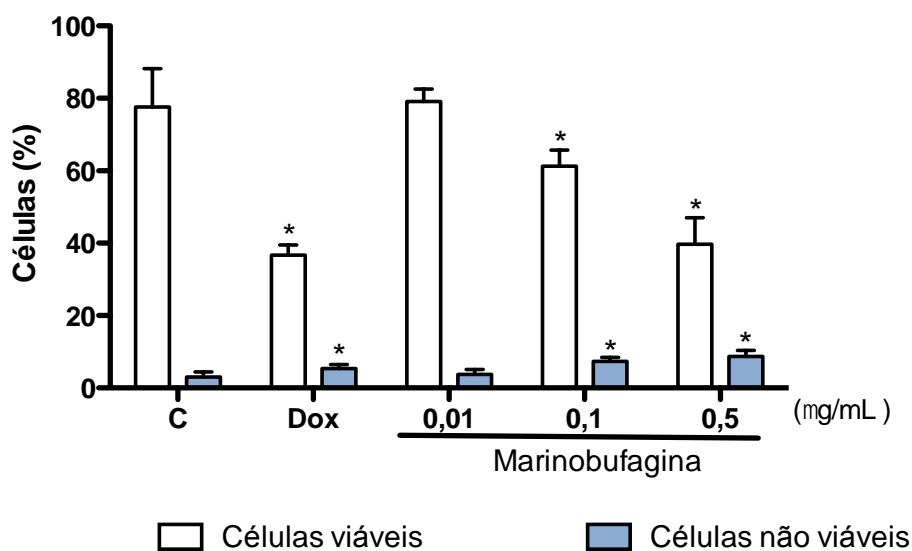
**Figura 4** – Fotomicrografias de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas à marinobufagina na concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  após 72h de incubação. A – Células em interfase na concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  da marinobufagina. B, C, D e E – Células em anáfase com aberrações cromossômicas do tipo, pontes, fragmentos e atrasos. Aumento de 400X em microscópio óptico.



### 6.3.3 Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan

A análise da viabilidade celular na linhagem leucêmica HL-60 por exclusão de azul de tripan após 24 h de exposição (**Figura 5**) demonstrou que a marinobufagina causou uma significativa redução no número de células viáveis de forma crescente e dependente da concentração ( $61,3 \pm 4,4$  e  $39,7 \pm 7,4\%$  para 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) quando comparado com o controle negativo ( $77,7 \pm 10,5\%$ ) mas apenas nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  houve um aumento do número de células não-viáveis ( $p < 0,05$ ). O controle positivo Dox também causou redução de células viáveis ( $36,7 \pm 2,9\%$ ).

**Figura 5** – Efeito do composto marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina* na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinada por exclusão de azul de tripan após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usado como controle positivo (Dox). Os dados correspondem a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.



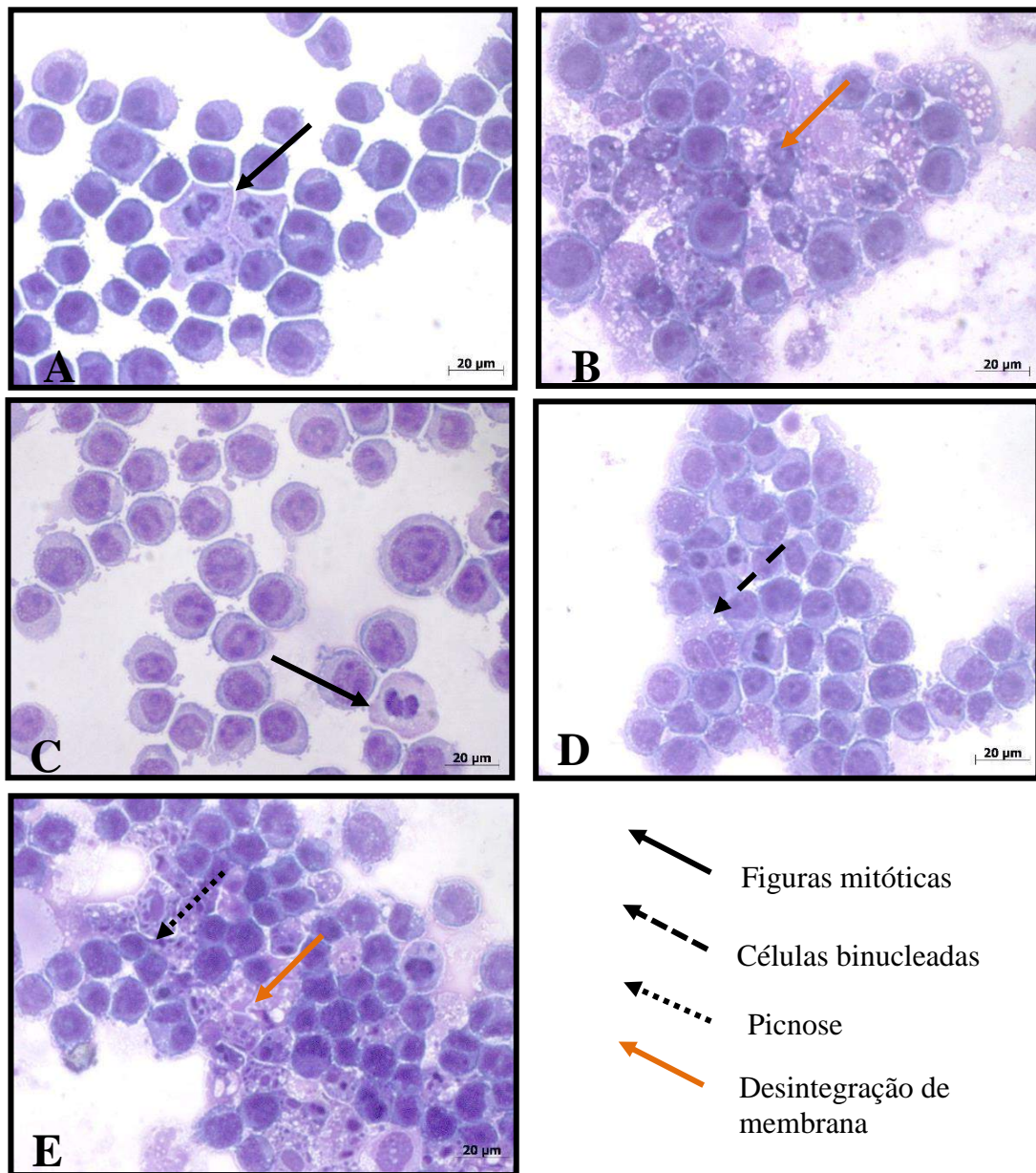
### 6.3.4 Coloração por Hematoxilina-Eosina

A morfologia das células da linhagem leucêmica promielocítica humana HL-60 tratadas com crescentes concentrações do composto marinobufagina e os controles negativos e positivos pode ser visualizada na **Figura 6**.



O controle negativo (**Figura 6A**) apresentou características de células íntegras, com citoplasma homogêneo, presença de figuras mitóticas, nítida visualização da membrana plasmática e nuclear e nucléolos evidentes. As células tratadas com a concentração de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  de marinobufagina ainda mostram figuras mitóticas, porém menos frequentes e alterações membranares (**Figura 6C**). A marinobufagina na concentração de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  apresentou células binucleadas, compactação nuclear e redução do volume celular (**Figura 6D**). Na maior concentração (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ), fragmentação nuclear, picnose, vacúolos citoplasmáticos, redução do volume celular, e desintegração de membrana (**Figura 6E**). Rarefação celular, fragmentação nuclear e presença de núcleos picnóticos também foram encontrados após o tratamento com doxorrubicina 0,3  $\mu\text{g/mL}$  (controle positivo), além da basofilia e restos nucleares hipercromáticos consistentes com necrose (**Figura 6B**).

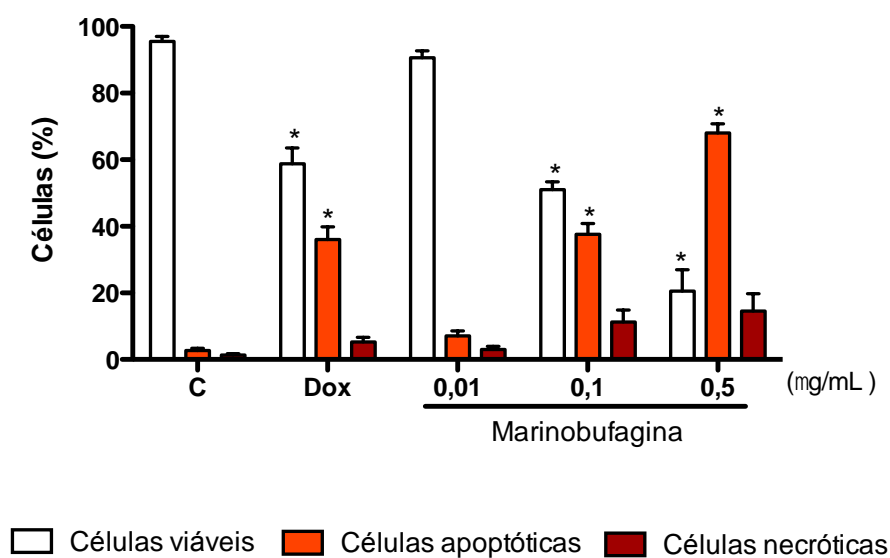
**Figura 6** – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação com o composto marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina*, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3 µg/mL) foi utilizado como controle positivo (B). C, D e E correspondem, respectivamente, ao tratamento com a marinobufagina (0,01; 0,1 e 0,5 µg/mL). Aumento de 400x.



### 6.3.5 Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Um dos métodos aplicados para avaliar o padrão de morte celular induzida pela marinobufagina foi realizado através da coloração diferencial com BE/LA e posterior análise por microscopia de fluorescência. Após 24 h de incubação das células HL-60 na presença da marinobufagina, ocorreu redução do número de células viáveis de forma concentração-dependente. A maior redução ocorreu nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e na presença de Dox ( $51 \pm 2,4$ ,  $20,5 \pm 6,5$  e  $58,8 \pm 4,8\%$  respectivamente) quando comparadas ao controle negativo ( $95,5 \pm 1,5\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Esta redução foi acompanhada pelo aumento de células apoptóticas ( $37,6 \pm 3,2$ ,  $68,0 \pm 2,8$  e  $36 \pm 3,8\%$ ) nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de marinobufagina e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de doxorubicina, respectivamente (**Figura 7**) ( $p < 0,05$ ).

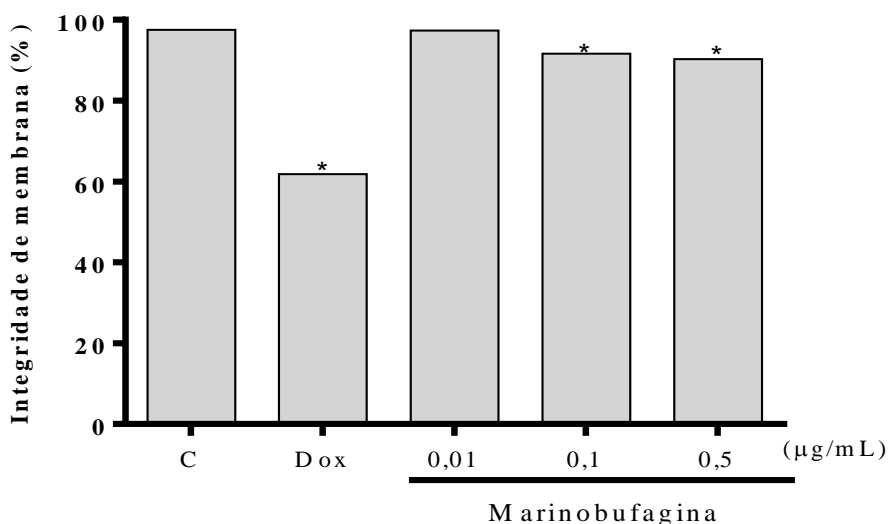
**Figura 7** – Efeitos do composto marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina* sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após de 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



### 6.3.6 Integridade de Membrana

A integridade de membrana analisada com PI após 24 h de incubação mostrou que a substância testada diminuiu a integridade da membrana plasmática das células. Porém, foi observado que esta diminuição de integridade foi dependente da concentração (**Figura 8**). Assim, o composto causou diminuição da integridade da membrana somente nas maiores concentrações testadas (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ,  $91,6 \pm 0,3$  %; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ,  $90,3 \pm 1,0$  %) ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a Dox mostrou resultados significantes somente após 24 h ( $61,1 \pm 1,0$  %) quando comparados com o controle ( $97,5 \pm 0,3$  %).

**Figura 8** – Integridade de membrana de células leucêmicas da linhagem HL-60 analisada com iodeto de propídeo através de citometria de fluxo após 24 h de incubação com a marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

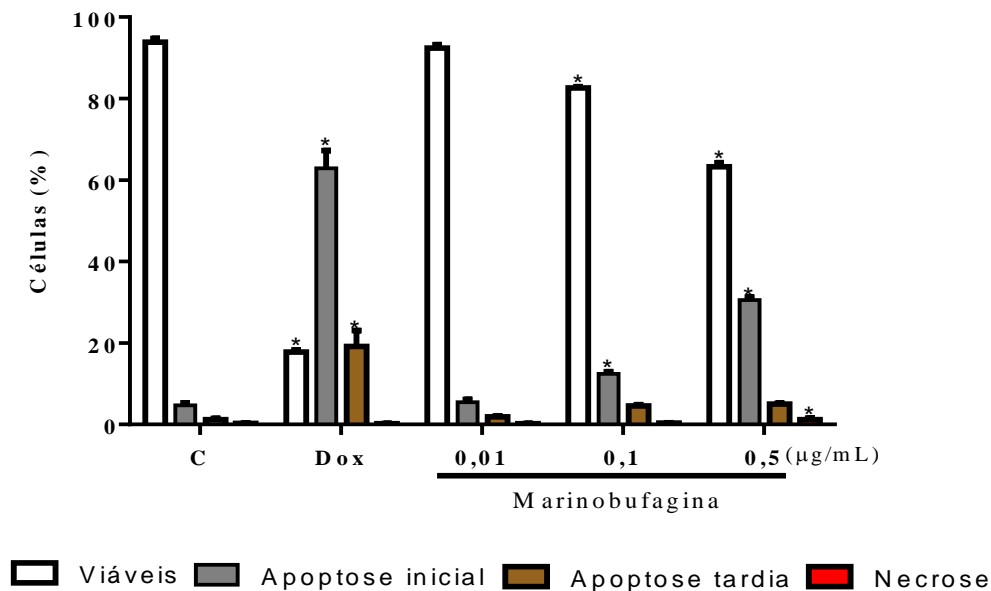


### 6.3.7 Externalização de Fosfatidilserina – Ensaio de Anexina V

A Dox (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) diminuiu o percentual de células viáveis após 24 h de incubação ( $17,7 \pm 0,5$  %) e aumentou o de células em apoptose inicial ( $62,9 \pm 4,4$  %). A marinobufagina reduziu a quantidade de células viáveis nas maiores concentrações testadas (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ,  $82,6 \pm 0,3$  % e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ,  $63,2 \pm 1$  %) quando comparados ao controle ( $93,8 \pm 0,9$  %) (**Figura 9**).

Aumentou o percentual de células em fase de apoptose inicial nas duas maiores concentrações de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $12,43 \pm 0,6$  e  $30,52 \pm 0,7\%$ , respectivamente), quando comparados ao controle negativo ( $4,7 \pm 0,6\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Níveis significantes de apoptose tardia foram encontrados na presença de Dox ( $1,2 \pm 0,3 \%$ ) e após 24 h na presença da Marinobufagina (0,1  $\mu\text{g/mL}$   $4,6 \pm 0,3 \%$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$   $5,0 \pm 0,2 \%$ ) em relação ao controle ( $1,2 \pm 0,3\%$ ). A necrose foi detectada somente na maior concentração da marinobufagina (0,5  $\mu\text{g/mL}$   $1,2 \pm 0,3 \%$ ) em relação ao controle ( $0,2 \pm 0,1 \%$ ) ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9** – Externalização de fosfatidilserina analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 com anexina-V e 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD) após 24 h de incubação com a Marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

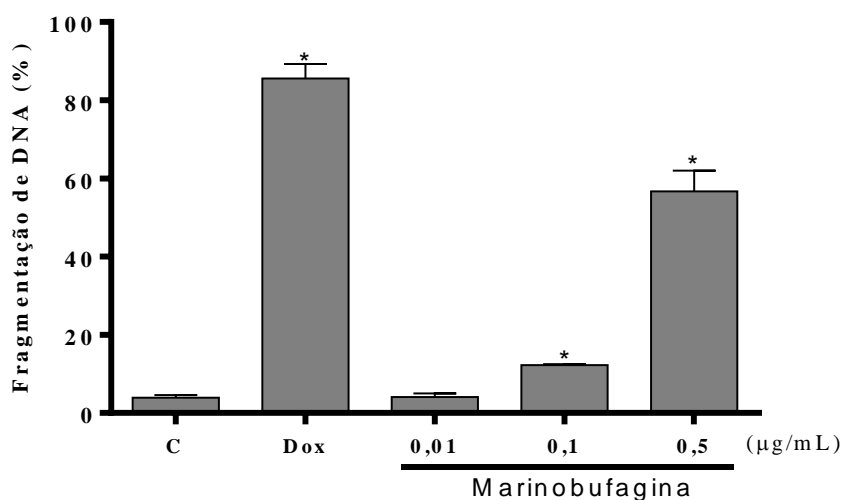


### 6.3.8 Fragmentação de DNA

Neste ensaio, as células controle e tratadas foram incubadas com uma solução contendo Triton X-100 e PI. O Triton permeabiliza a membrana celular e o PI se liga ao DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células com

condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. Como demonstrado na **Figura 10**, a Dox (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) acarretou fragmentação ao DNA das células leucêmicas (85,5  $\pm$  3,7 %). A marinobufagina apresentou fragmentação nas duas maiores concentrações testadas (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 12,2  $\pm$  0,3 e 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 56,6  $\pm$  5,3 %), quando comparadas ao controle (3,9  $\pm$  0,7%) ( $p < 0,05$ ).

**Figura 10** – Fragmentação do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 revelada com iodeto de propídeo e triton X-100 através de citometria de fluxo após 24 h de incubação com a marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi utilizado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.



## 6.4 DISCUSSÃO

Ao longo dos tempos os seres humanos têm contado com a natureza para atender suas necessidades básicas, sendo frequentemente utilizados para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer. Produtos naturais são de particular interesse como agentes citoprotetores por causa da baixa toxicidade e alta eficácia (GREENLEE, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013). Dentre as fontes naturais, os anfíbios têm recebido atenção especial, com relatos sobre as atividades biológicas de moléculas e extratos aquosos e orgânicos obtidos a partir de

glândulas da pele que podem atuar como hormônios esteróides endógenos (SCHONER; SCHEINER-BOBIS, 2009) e exibir efeitos antiangiogênicos (LEE et al., 1997), anti-endometriose (NASU et al., 2005), antibacterianos, antifúngicos, leishmanicidas, tripanossomicidas (CUNHA-FILHO et al., 2005; TEMPONE et al., 2008), inseticidas (SUPRATMAN et al., 2000) e antivirais (WANG et al., 2011).

O interesse em desenvolver bufadienolídeos isolados de sapos como agentes anticâncer vem aumentando progressivamente, pois estas substâncias com ação cardiotônica tem revelado atividade antitumoral (IMAI et al., 1965; CUNHA-FILHO et al., 2010). A maioria destas atividades tem sido atribuídas aos bufadienolídeos presentes na secreção de espécies da família Bufonidae (LENAERTS et al., 2013). Diante desta infinidade de ações biológicas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa do bufadienolídeo marinobufagina isolado do veneno de *Rhinella marina* em linhagens de HL-60.

Inicialmente, foi avaliado o potencial antiproliferativo *in vitro* utilizando o método do MTT. A análise de citotoxicidade pelo ensaio do MTT vem sendo utilizada em programa de *screening* para selecionar substâncias com ação antineoplásica, sendo um método rápido, sensível e barato (BERRIDGE et al., 1996; FERREIRA et al., 2011). A marinobufagina revelou citotoxicidade superior ao controle positivo Dox utilizado na clínica (**Tabela 2**) confirmando os estudos anteriores realizados com extratos provenientes dos venenos de *R. marina* (FERREIRA et al., 2014).

Diferentes bufadienolídeos, tais como bufotalina, telocinobufagina, gamabufotalina e cinobufacinina, previamente estudados, também revelaram citotoxicidade promissora contra carcinomas hepatocelulares (HepG2, BEL-7402), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) (QI et al., 2011; ZHANG et al., 2011; LEE et al., 2014), carcinoma de pulmão (A-549) (LEE et al., 2014) e leucemias (Jurkat T, HL-60) (LEE et al., 2014). Frações do veneno isolado de *Rhinella schneideri*, onde a molécula marinobufagina se mostrou como constituinte majoritário, apresentaram atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais de fibroblasto de pulmão (MRC-5), epitélio gástrico humano (AGS), câncer de pulmão (SK-MES-1), carcinoma de bexiga (J82) e leucemia promielocítica (HL-60) pelo ensaio do MTT, com  $CI_{50}$  variando de 0,04 – 0,102  $\mu\text{g/mL}$  (SCHMEDA-HIRSCHMANN, et al., 2014).

O teste *Allium cepa* é utilizado rotineiramente para avaliação de químicos e monitoramento ambiental. Para tanto devem ser utilizados controle de exposição e não exposição aos bulbos de *Allium cepa*. Para estudos de toxicidade, o teste é relativamente rápido, sensível e reproduzível e aponta resultados comparáveis a outros sistemas testes

procarióticos e eucarióticos (FISKESJO, 1985). No estudo foi demonstrado a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da marinobufagina em meristemas de raízes de *Allium cepa* pelas alterações de crescimento de raízes, inibição do índice mitótico e aberrações cromossômicas. Foi observado que as duas maiores concentrações testadas (0,1 e 0,5 µg/mL) se mostraram tóxicas, inibindo o crescimento das raízes (**Figura 2**). Quando avaliada a citotoxicidade, a molécula em estudo se mostrou citotóxica na maior concentração (0,5 µg/mL), inibindo o IM (**Figura 3**). IM mede a proporção das células na fase M do ciclo celular e a sua inibição pode ser interpretado como morte celular ou um atraso da cinética de proliferação de células (CELIK; ASLANTURK, 2010). A diminuição do índice mitótico pode ser devido à inibição da síntese de DNA ou de um bloqueio na fase G2 do ciclo celular, prevenindo a célula de entrar na fase de divisão celular (PANDEY; KUMAR; ROY, 2014).

Estudos relatam a importância do Teste *Allium cepa* como modelo para avaliação de drogas, a exemplo das antiretrovirais, para avaliação de genotoxicidade, bem como por alterações em cromossomos (ONWUAMAH et al., 2014). Aberrações cromossômicas também foram vistas neste estudo, na menor concentração da marinobufagina, 0,01 µg/mL, sendo encontradas pontes, fragmentos e cromossomos em atraso na anáfase (**Figura 4**). Pontes de cromatina ocorrem na mitose quando os telômeros de cromátides irmãs se fundem e não conseguem separar completamente em suas respectivas células-filhas, permanecendo unidas (ONWUAMAH et al., 2014). Os fragmentos dos cromossomos são uma indicação de quebras cromossômicas, e pode ser uma consequência de pontes durante as fases de anáfase/telófase. A indução de quebras cromossômicas, distúrbios na montagem de microtúbulos, atrasos dos cromossomos durante a anáfase podem estar relacionados a morte celular (PANDEY; KUMAR; ROY, 2014).

Após demonstrar a atividade citotóxica da marinobufagina pelo teste MTT e teste *Allium cepa*, o potencial antiproliferativo da marinobufagina foi confirmado pelos resultados encontrados no teste de exclusão de azul de tripan, cuja redução de células viáveis ficou evidente em concentrações acima de 0,1 µg/mL (**Figura 5**), o que confirma os estudos prévios de citotoxicidade por MTT após 72h de incubação, cuja  $CI_{50}$  foi de 0,06 µg/mL (FERREIRA et al., 2013).

Com o intuito de averiguar o mecanismo de ação da marinobufagina, alterações morfológicas por coloração em H/E (**Figura 6**) e BE/LA (**Figura 7**) foram investigadas com o intuito de determinar qual mecanismo de morte celular estaria relacionado com a citotoxicidade da marinobufagina. Os estudos tanto por microscopia óptica quanto de fluorescência mostraram que a marinobufagina causou fragmentação nuclear, vacuolização



citoplasmática, alterações membranares semelhantes a corpos apoptóticos, redução do volume celular (concentração de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e desintegração de membrana (na maior concentração: 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Estudos mais detalhados foram realizados utilizando citometria de fluxo, que pode ser muito útil para a avaliação da função das células incluindo a capacidade reprodutiva, atividade metabólica, integridade da membrana e potencial de membrana (PAPARELLA et al., 2008). É uma técnica que foi desenvolvida para medições rápidas de partículas luminosas individuais ou de células quando elas fluem em uma corrente passando em um ponto de detecção. Medições de citometria de fluxo são realizadas separadamente em cada partícula, fazendo passar milhares de células por segundo através de um feixe de laser e capturam a luz que emerge a partir de cada célula, assim que a atravessa (JUAN-GARCÍA et al., 2013). Estas análises confirmaram os estudos morfológicos realizados com HE e BE/LA, verificando aumento da fragmentação de DNA, externalização de PS e diminuição da integridade de membrana apenas na maior concentração.

A análise de externalização de PS é considerada padrão-ouro para a confirmação de apoptose. Células sanguíneas normais exibem assimetria fosfolipídica, com predominância de fosfatidilcolina e esfingomiéline na parte externa da membrana plasmática e fosfatidiletanolamina e PS na parte interna (KUMAR et al., 2004). Células apoptóticas mostram perda desta assimetria aumentando a externalização de PS, como visto após o tratamento de células HL-60 com a molécula marinobufagina nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  conforme mostra a **Figura 9**. Então, a PS pode ser detectada usando anexina V, uma proteína ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  de 35 kDa com grande afinidade pela PS (VERMES et al., 1995).

A apoptose é caracterizada por uma série de critérios morfológicos, incluindo encolhimento da célula, alterações na morfologia nuclear, a manutenção da integridade da membrana, e a formação de corpos apoptóticos. Pode também ocorrer mudanças na membrana plasmática, como a externalização da fosfatidilserina e a condensação com consequente quebra do DNA, na fase sub-G1 quando realizado a citometria de fluxo (LOCK et al., 2007). A molécula marinobufagina, nas concentrações de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , aumentou a fragmentação do DNA (fase sub-G1 do ciclo celular) (**Figura 10**).

A apoptose é um mecanismo de defesa celular para eliminar as células malignas e desempenha um importante papel na prevenção do desenvolvimento de tumores. Por ser um processo altamente regulado e com alterações morfológicas específicas e bem descritas. Estas mudanças começam com a compactação da cromatina nuclear, seguido por condensação do citoplasma, degradação de DNA, vesículas de membrana e fragmentação da célula em corpos

apoptóticos. Os corpos apoptóticos são absorvidos por macrófagos e degradados nos seus lisossomas na ausência de inflamação. Na verdade, muitas drogas anticâncer, como a Doxorubicina, funcionam principalmente por induzir apoptose através da regulação da sinalização associada a apoptose (ZHU, et al., 2012; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014).

Investigações anteriores demonstraram que algumas secreções da pele de sapos possuem compostos que são capazes de induzir parada do ciclo celular na fase G2/M ou na fase S, redução dos níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2, diminuição da viabilidade celular e a síntese de DNA, ativar caspases iniciadoras e efetoras e provocar alterações morfológicas (condensação da cromatina, fragmentação nuclear, retração de citoplasma, descolamento celular, bolhas de membrana e corpos apoptóticos) em carcinomas da próstata e da mama (YEH et al., 2003; SU; XU; YE, 2009; SCIANI et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

Os bufadienolídeos bufalina e cinobufagina de *B. bufo gargarizans* induziram, em concentrações tão baixas quanto 0,1  $\mu$ M, a morte de células HepG<sub>2</sub> após 24 de tratamento, com redução da viabilidade celular, aumento de células apoptóticas determinado por citometria de fluxo, liberação de citocromo *c*, despolarização mitocondrial, clivagem de PARP [poli(ADPribose)polimerase] e Bid, aumento dos níveis de Bax e redução dos níveis de Bcl-2, ativação das caspases-3, -9, -8 e -10, inibição da apoptose por inibidores de caspases e maior expressão da proteína de morte Fas, indicando que o processo apoptótico está associado a vias dependentes da ativação das caspases-8/-10 por meio do receptor de morte Fas e da ativação da caspase-9 por via mitocondrial (QI et al., 2011). O extrato etanólico, cujo compostos majoritários são a bufalina e cinobufagina, mostraram resultados semelhantes sobre as linhagens tumorais MCF-7, A-549 e leucemia de células T (Jukart T) após 48h de tratamento, detectando-se intensa redução da viabilidade celular, aumento do percentual de células apoptóticas, quebras simples e duplas das fitas do DNA detectadas pelo ensaio do cometa e indução da formação de micronúcleos (fragmentos de DNA envolvidos por membrana presentes no citoplasma de células interfásicas) (LEE et al., 2014). Todos estes achados sugerem que os bufadienolídeos causam morte celular por apoptose e efeitos genotóxicos direcionados a células tumorais.

Hashimoto e colaboradores (1997) mostraram que a bufalina é eficiente em inibir a topoisomerasas II (Topo II), enzima responsável pela estabilização do complexo de clivagem do DNA e alvo de inúmeras drogas antitumorais. A inibição da Topo II promove a fragmentação do DNA, um atributo importante para apoptose das células tumorais. No estudo de Han e colaboradores (2014) a bufalina na concentração de 0,2 mg/mL induziu apoptose em células de

câncer de fígado humana transplantado em camundongos nude, não foi observado toxicidade aos órgãos analisados (coração, pulmão, fígado, rins e cérebro), sendo seletiva as células tumorais. Esta molécula também inibiu a atividade migratória e invasiva do carcinoma de bexiga T24 em teste *in vitro* (HONG, et al., 2013). Foi demonstrado que bufalina inibe a proliferação de células humanas de adenocarcinoma de pulmão humano - A549, através da indução da apoptose de um modo dependente da dose e do tempo, inibindo a ativação de PI3K/Akt, regula a expressão de proteínas pro-apoptóticas e anti-apoptóticas e promove a ativação de caspase-3, o que leva à execução de apoptose (ZHU, et al., 2012).

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a cinobufacina e os seus compostos ativos (por exemplo, bufalina e cinobufagina) exibem significativa atividade antitumoral, incluindo a inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular e da apoptose, a interrupção do ciclo celular, inibição da angiogênese, reversão da resistência a multidrogas e ainda interfere na regulação da resposta imune (ZHU; LIU, 2006). Em um estudo pré-clínico, camundongos *nude* transplantados com carcinoma hepatocelular humano e tratados com cinobufacina em associação com o trióxido de arsênio revelou efeitos sinérgicos que reduziram o crescimento do carcinoma, o número de vasos sanguíneos (efeito anti-angiogênico) e a expressão de receptores dos fatores de crescimento endotelial vascular e epidérmico (LIU et al., 2011).

## 6.5 CONCLUSÃO

A molécula marinobufagina revelou grande potencial citotóxico *in vitro* contra todas as linhagens neoplásicas humanas testadas, apresentou toxicidade contra células meristemáticas de *Allium cepa* e achados morfológicos e bioquímicos sugestivos de morte celular por apoptose em células leucêmicas.

## REFERÊNCIAS

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S.; McCOY, K.D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p. 2141-2153, 2004.

CELIK, T.A.; ASLANTURK, O.S. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf Extracts with Allium Test. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A, FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B, CUNHA, K. M. A., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., GRAMOSA, N. V., RAO, V. S. N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, 40: 1231-1234, 2002.

COSTA-NETO, E.M. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.33-43, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670–3695, 2013.

CUNHA FILHO, G.A.; SCHWARTZ, C.A.; RESCK, I.S.; MURTA, M.M.; LEMOS, S.; CASTRO, M.S.; KYAW, C.; PIRES Jr, O.R.; LEITE, J.R.S.; BLOCH, C.; SCHWARTZ, E.F. Antimicrobial activity of bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777-782, 2005.

CUNHA-FILHO, G.A., RESCK, I.S., CAVALCANTI, B.C., Pessoa, C.O., MORAES, M.O., FERREIRA, J.R., RODRIGUES, F. A., DOS SANTOS, M.L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v.56, p.339–348, 2010.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.9-13, 1995.

DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P., TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. The biology of amphibians. New York: **MacGraw-Hill**, 1996.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F., VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1045–1058, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASE, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K.; NOROMHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SHINHORIN, A. P.; PESSOA, C & VIEIRA-

JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo gutatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v.72, p.43-51, 2013.

FISCHER, P.M.; GLOVER, D.M.; LANE, D.P. Targeting the cell cycle. **Drug Discovery Today**, v. 1, p. 417-423, 2004.

FISKESJO, G. The *Allium cepa* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

GENG, C. X., ZENG, Z. C., WANG, J. Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 696 - 700, 2003.

GREENLEE, H. Natural products for cancer prevention. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 28, p. 29-44, 2012.

HAN, K.; HUAN, G.; GU, W.; SU, Y.H.; HUANG, X.Q.; LING, C.Q. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 3374-3379, 2007.

HASHIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZA, N.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of topoisomerase ii in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leukemia Research**, v. 21, p. 875-883, 1997.

HONG, S.H.; KIM, G.Y.; CHANG, Y.C.; MOON, S.K.; KIM, W.J.; CHOI, Y.H. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions. **International Journal of Oncology**, v. 42, p. 277-286, 2013.

IMAI, S., MURASE, H., KATORI, M., OKADA, M., SHIGEI, T. A study on the structure-activity relationship of the cardiotonic steroids. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.15, p.62-71, 1965.

JUAN-GARCIA, A.; MANYES, L.; RUIZ, M.J.; FONT, G. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 40-59, 2013.

KHAN, K.H.; BLANCO-CODESIDO, M.; MOLIFE, L.R. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 90, p. 200–219, 2014.

KUMAR, V., ABBAS, A.K, FAUSTO, N., ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004, 1552p.

- LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y. J.; HAN, K-S.; CHUNG, H. W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of Chan Su, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 372-376, 2014.
- LENAERTS, C.; DEMEYER, M.; GERBAUX, P.; BLANKERT, B. Analytical aspects of marinobufagenin. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 193–201, 2013.
- LIU, L.; CHEN, B.A.; QIN, S.K. Anti-angiogenesis effect of arsenic trioxide plus cinobufacin on human hepatocarcinoma transplantation model nude mice. **Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, v. 31, p. 67-72, 2011.
- LOCK, E.A.; REED, C.J.; KINSEY, G.R.; SCHNELLMANN, R.G. Caspase-dependent and -independent induction of phosphatidylserine externalization during apoptosis in human renal carcinoma Cak<sub>1</sub>-1 and A-498 cells. **Toxicology**, v. 229, p. 79-90, 2007.
- MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.M.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN,D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NASU, K.; NISHIDA, M.; UEDO, T.; TAKAI, N.; NARAHARA, H.; MIYAKADA, I. Bufalin induces apoptosis and the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p. 817, 2005.
- 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, p.311-335, 2012.
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.
- ONWUAMAH, C.H.; EKAMA, S.O.; AUDU, R.A.; EZECHI, O.C.; POIRIER, M.C.; ODEIGAH, P.G.C. Exposure of *Allium cepa* Root Cells to Zidovudine or Nevirapine Induces Cytogenotoxic Changes. **Plos One**, v. 9, p. 1-7, 2014.
- PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B.K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 300-308, 2014.

PAPARELLA, A.; TACCOGNA, L.; AGUZZI, I.; CHAVES-LOPEZ, C.; SERIO, A.; MARSILIO, F.; SUZZI, G. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, p. 1174-1182, 2008.

PERRY, P. Proteins of parotoid gland secretions from toads of genus *Bufo*. Contemporary **Herpetology**, v. 2000, n. 3, p. 1-3, 2000.

QI, F.; LI, A.; INAGAKI, Y.; KOKUDO, N.; TAMURA, S.; NAKATA, M.; TANG, W. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 342-349, 2011.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASSULAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1. 2004.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of the multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v.21, p. 89-96, 1993.

SANTOS, A.C.B.; SILVA, M.A.P.; SANTOS, M.A.F.; LEITE, T.R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, p.442-458, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; SOUSA-JUNIOR, P.T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new arginyl bufadienolide esters from the “cururu” toad *Rhinella (Bufo) schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1076-1085, 2014.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous cardioactive steroids--a new class of steroid hormones. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, v. 134, p. 632-636, 2009.

SCIANI, J.M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.L.; FERREIRA, A.K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; PIMENTA, D.C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 10-18, 2012.

SU, J.; XU, Z.J.; YE, M.S. An experimental study of bladder cancer cell apoptosis induced by cinobufacin. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 25, p. 351-353, 2009.

SUPRATMAN, U.; FUGITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 1310-1312, 2000.

TEMPONE, A.G., PIMENTA, D.C., LEBRUN, I., SARTORELLI, P., TANIWAKI, N.N., DE ANDRADE Jr., H.F., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C. Antileishmanial and

antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13–21, 2008.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

WANG, D.L.; QI, F.H.; TANG, W.; WANG, F.S. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, p. 559–567, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer). Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)>. Acesso em: 30 jan. 2014.

XU, W.; LUO, H.; ZHANG, Y.; SHAN, L.; LI, H.; YANG, M.; LIU, R.; ZHANG, W. Simultaneous determination of five main active bufadienolides of Chan Su in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 859, p. 157–163, 2007.

YEH, J.Y.; HUANG, W.J.; KAN, S.F.; WANG, P.S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p. 112–124, 2003.

ZHANG, X.; YE, M.; DONG, Y.; HU, H.; TAO, S.; YIN, J.; GUO, D. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucreata*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1779–1785, 2011.

ZHU, X.Y.; LIU, L.M. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobufacini injection and its active ingredient. **Journal of Tumor**, v. 5, p. 272–275, 2006.

ZHU, Z.; SUN, H.; MA, G.; WANG, Z.; LI, E.; LIU, Y.; LIU, Y. Bufalin Induces Lung Cancer Cell Apoptosis via the Inhibition of PI3K/Akt Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2025-2035, 2012.



## **ANEXOS**

## ANEXO A: Artigo publicado na Toxicon.

Toxicon 72 (2013) 43–51



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



### Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon



Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>a,b</sup>, Daisy Jereissati Barbosa Lima<sup>c</sup>,  
Bryan Wender Debiasi<sup>d</sup>, Bruno Marques Soares<sup>c</sup>,  
Kátia da Conceição Machado<sup>b</sup>, Janaina da Costa Noronha<sup>f</sup>,  
Domingos de Jesus Rodrigues<sup>e,f</sup>, Adilson Paulo Sinhorin<sup>d,e</sup>, Cláudia Pessoa<sup>c</sup>,  
Gerardo Magela Vieira Júnior<sup>d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Sciences, Campus Senador Helvécio Nunes de Barros, Federal University of Piauí, 64007-670 Picos, Piauí, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 64049-550 Teresina, Piauí, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Laboratórios Integrados de Pesquisa em Ciências Químicas (IJPHQui), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267 Sinop, Mato Grosso, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267 Sinop, Mato Grosso, Brazil

<sup>f</sup> Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Acervo Biológico da Amazônia Meridional (ABAM), Universidade Federal de Mato Grosso, 78577-267 Sinop, Mato Grosso, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 28 March 2013

Received in revised form 11 June 2013

Accepted 13 June 2013

Available online 22 June 2013

##### Keywords:

Antiproliferative activity

Bufadienolides

*Rhinella marina*

*Rhaebo guttatus*

#### ABSTRACT

The venom of amphibians is a fascinating source of active substances. In view of their medical importance and aiming to explore the amazing Brazilian biodiversity, we conducted bio-prospecting of antiproliferative activity in extracts of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* toads occurring in the Southern Amazon of Mato Grosso, Brazil. LC–MS and HPLC analysis of the venom extracts of *R. marina* revealed four bufadienolides (telocinobufagin – **1**, marinobufagin – **2**, bufalin – **3** and resibufogenin – **4**). *R. guttatus* venom extracts contained only marinobufagin (**2**). First, *R. marina* and *R. guttatus* venom extracts were evaluated for cytotoxicity against tumor cell lines by the MTT assay. All extracts revealed cytotoxicity, where *R. marina* extracts were comparable to doxorubicin (IC<sub>50</sub> values ranging from 0.01 to 0.23 μg/mL). Only extracts of *R. guttatus* toad venom caused membrane disruption of human erythrocytes. The extracts were investigated for selective activity by determining their effect on stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the Alamar Blue™ assay. The extracts were up to 80-fold more selective against leukemia cells when compared to dividing leukocytes. Aiming to confirm these antiproliferative effects, BrdU incorporation into DNA was measured in HL-60 treated cells with *R. marina* venom extracts. These extracts decreased BrdU incorporation at both concentrations tested. In summary, nine extracts of *R. marina* and *R. guttatus* venom showed pronounced lethal and discriminating effects on tumor lines, especially those from *R. marina*, highlighting toad parotid gland secretions as a promising source for novel lead anticancer chemicals.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.