

**BEATRIZ TAYNARA ARAÚJO DOS SANTOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO EM LINHAGEM  
CELULAR DE FEOCROMOCITOMA**

**BRASÍLIA, 2014**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**BEATRIZ TAYNARA ARAÚJO DOS SANTOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO EM LINHAGEM  
CELULAR DE FEOCROMOCITOMA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

**Orientador: Adriana Lofrano Alves Porto**

**BRASÍLIA**

**2014**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 1015375.

S237e Santos, Beatriz Taynara Araújo dos.  
Estudo da atividade dos extratos de plantas e fungos endofíticos isolados do cerrado brasileiro em linhagem celular de feocromocitoma / Beatriz Taynara Araújo dos Santos. -- 2014.  
72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Adriana Lofrano Alves Porto.

1. Feocromocitoma. 2. Plantas dos cerrados. 3. Fungos. 4. Medicamentos - Formas farmacêuticas. I. Porto, Adriana Lofrano Alves. II. Título.

CDU 615.4

Beatriz Taynara Araújo dos Santos

**ESTUDO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO EM LINHAGEM  
CELULAR DE FEOCROMOCITOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 10 de março de 2014.

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Adriana Lofrano Alves Porto – Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Carine Royer – Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Peróla de Oliveira Magalhães Dias Batista

*Dedico este trabalho a Deus pelas oportunidades a mim concedidas, à minha família, à minha orientadora e aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante este período sempre com palavras de apoio e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por todas as oportunidades que recebi em minha vida, os obstáculos superados e vitórias conquistadas cada um em seu momento adequado que me proporcionaram crescer profissionalmente e pessoalmente, e valorizar a vida e aqueles que fazem parte dela.

Gostaria de agradecer aos meus pais por toda a dedicação e suporte com os meus estudos, especialmente minha mãe que sempre me serviu de exemplo para dar continuidade à formação acadêmica. Aos meus avós e tios, que mesmo sem compreender inteiramente a importância desta etapa em minha vida, sempre se orgulharam e apoiaram.

A minha grande orientadora e amiga Professora Dra. Adriana Lofrano, pela oportunidade de aprendizado e confiança depositada a mim desde a Graduação, pelo exemplo de ética profissional e respeito demonstrados em tantas conversas, broncas e elogios. E que sempre terei a honra e orgulho de dizer que sou a sua primeira aluna.

Aos professores Angélica Amato, Fátima Borin, Luiz Alberto Simeoni, Francisco Neves, Carine Royer, Michella Côelho, Marie Togashi, Dâmaris Silveira, Pérola Magalhães, Maurício Homem e Patrícia Medeiros, que desde a graduação contribuíram para a minha formação e em tantas vezes me auxiliaram.

Às secretárias do Departamento de Farmácia e da Pós-Graduação Ívina, Iris e Kirla Nakayama, que sempre estiveram à disposição para ajudar em todos os momentos durante a Graduação e o Mestrado.

Aos Laboratórios de Histopatologia Bucal e de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde que contribuíram para a realização dos experimentos.

Aos meus primeiros “chefes” orientadores Amabel, Silas e Paloma que me iniciaram na pesquisa ressaltando sempre a importância do que fazemos e a honestidade com que tudo deve ser feito mesmo que isso custe abrir mão de finais de semana, feriados e férias.

Aos meus colegas e amigos de “Farmol”: Petra, Emilie, Olívia, Cínthia Gabriel, Adria, Pedro, Laíza, Carol Araújo, Paula, Gleice, Yasmin, Carol Lourenço, Cínthia Alves, Mariela, Érica, Fernanda, Igor, Maíra, Carol Moura e alguém que por acaso eu tenha esquecido. Afinal, os 06 anos de “Farmol” foram repletos de risadas e histórias para contar pela contribuição de cada um de vocês.

E aos meus amigos, que compreenderam durante todos esses anos as minhas ausências, que nunca me deixaram desistir dos meus sonhos mesmo diante das dificuldades, e que certamente se orgulham desta minha conquista.

*“O tempo te falará como tudo isso te fez feliz”*

*(Emmanuel)*



## RESUMO

SANTOS, Beatriz Taynara Araújo. **ESTUDO DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014.

**Introdução:** Feocromocitomas são tumores altamente vascularizados derivados da medula adrenal. A maioria dos casos é benigna, mas formas malignas já foram descritas. A ressecção cirúrgica é a única forma definitiva de cura para tumores benignos, enquanto tumores malignos ainda não possuem tratamento eficaz. Os sintomas da forma maligna usualmente são tratados com quimioterapia e bloqueadores adrenérgicos, mas vários outros alvos terapêuticos estão sendo estudados recentemente. Grande parte dos medicamentos quimioterápicos comercializados é obtida por semissíntese de componentes químicos de plantas e fungos, e a biodiversidade brasileira pode auxiliar no desenvolvimento de novas drogas para esta patologia. **Objetivo:** Investigar a atividade antitumoral de extratos de plantas e fungos do Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma. **Métodos:** A PC-12 Adh foi adquirida do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro), e cultivada em meio HAM-F12 suplementado com soro de cavalo, soro fetal bovino, bicarbonato de sódio, 10% de penicilina/estreptomicina, encubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos, as células foram plaqueadas na densidade de 5 x10<sup>3</sup> células por poço em placas de 96 poços, em triplicata. Após 24 horas de incubação, o ensaio de citotoxicidade foi realizado com avaliação de 24 e 48 horas de tratamento com concentrações de 500 e 1000 µg/mL das frações dos extratos (aquosa, etanólica e hexânica) dos 65 extratos obtidos de plantas e fungos do Cerrado diluídos em meio de cultura. Os extratos que demonstraram atividade citotóxica foram submetidos ao ensaio de curva dose-resposta em concentrações entre 125 e 2000 µg/mL. Após os tratamentos, a viabilidade celular foi mensurada utilizando o método colorímetro MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,3-difeniltetrazólio). Os experimentos foram realizados em três análises independentes e a atividade citotóxica foi comparada na linhagem celular não tumoral de queratinócitos HaCat. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5® pelos

testes estatísticos one-way ANOVA com teste pós-hoc de Tukey para os ensaios de citotoxicidade, e regressão não-linear e determinação do IC<sub>50</sub> para os ensaios de dose-resposta. Os extratos que apresentaram atividade citotóxica similar ou inferior na linhagem celular não tumoral foram submetidos aos ensaios de flavonoides, polifenóis totais e cromatografia de camada delgada para determinar e quantificar os compostos químicos. **Resultados:** Os extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* ADC, e o extrato hexânico da folha e sua fração hexano:acetato de Etila do *Erytroxylum subrotundum* demonstraram atividade inibitória da viabilidade celular  $\geq 50\%$ , efeito dose dependente, e toxicidade similar ou inferior em HaCat. Os extratos de *Allamanda blanchetti* ADC e os extratos do *Erytroxylum subrotundum* apresentaram flavonoides e terpenos, respectivamente. **Conclusão:** Nesta triagem biológica do Bioma Cerrado, 04 dos 65 extratos de plantas e fungos demonstraram capacidade de controlar a proliferação celular do Feocromocitoma in vitro. Esses achados sugerem que os compostos químicos ativos encontrados possuem atividade citotóxica, corroborando com estudos de bioprospecção para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

**Palavras- Chave:** Feocromocitoma; Cerrado; PC-12 Adh; Extrato; Planta; Fungo; Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais

## ABSTRACT

SANTOS, Beatriz Taynara Araújo. **STUDY OF THE ACTIVITY FROM PLANTS AND ISOLATED ENDOPHYTIC FUNGI EXTRACTS FROM BRAZILIAN SAVANNA IN PHEOCHROMOCYTOMA CELL LINE.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014.

**Introduction:** Pheochromocytomas are highly vascularized tumors arising from adrenal medulla. The majority of cases are benign, but malignant forms have been described. Surgical resection is the only definitive healing for benign tumors, while malignant tumors still have no effective treatment. Symptoms from malignant disease are usually managed with cytotoxic chemotherapy and adrenergic blockers, but several new therapeutic targets have been studied recently. Most chemotherapy commercialized drugs are obtained by semi-synthesis from chemical compounds of plants and fungi, and Brazilian biodiversity could support on new drugs development for this pathology. **Aim:** investigate antitumoral activity of extracts from Cerrado plantas and fungi in pheochromocytoma cell line. **Methods:** The PC-12 Adh was purchased from BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro), and maintained in HAM-F12 Medium supplemented with horse serum, fetal bovine serum, sodium bicarbonate, 10% penicillin/streptomycin stored at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For the experiments, cells were seeded at a density of 5 x10<sup>3</sup> cell/well in 96-well plates, in triplicate. After 24h of incubation, cytotoxicity assay was performed after 24h and 48h of exposition to 500 and 1000µg/mL of each fraction (aqueous, ethanolic and hexanic) of 65 extracts obtained from Cerrado plants and fungi diluted in cell culture medium. The extracts that demonstrated cytotoxic activity were submitted to a dose response curve assay with concentrations varying from 125 to 2000µg/mL. After treatment, cell viability was measured using MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay. Experiments were performed on three independent analysis and the cytotoxic activity were compared in non tumoral keratinocytes cell line Hacat. Data were analyzed on GraphPad Prism 5® by one-way ANOVA with Tukey pos-hoc test for cytotoxicity assays, and non-linear regression and IC<sub>50</sub> determination. The extracts that presented similar or lower cytotoxic activity in non tumoral cell line were submitted to flavonoids, total polyphenols and thin layer chromatography to determine and quantify chemical

compounds. **Results:** The ethanolic extracts of leaf and fruit from *Allamanda blanchetti* ADC, and hexanic extract and its Hexane:Ethyl Acetate of leaf from *Erytroxylum subrotundum* demonstrated a inhibitory activity of cell viability  $\geq 50\%$  on cytotoxicity assays, dose response effect, similar or lower cytotoxic activity on Hacat. The *Allamanda blanchetti* ADC extracts presented flavonoids and *Erytroxylum subrotundum* extracts terpenes. **Conclusion:** On this biological trial of Cerrado Biome, 04 of 65 plant and fungi extracts demonstrated the ability to control pheochromocytoma cell line proliferation. These findings suggest the presence of active chemical compounds with cytotoxic activity, corroborating bioprospecting studies for the development of new antitumoral drugs.

**Key-words:** Pheochromocytoma; Brazilian Savanna; PC-12 Adh; Extract; Plants; Fungi; Antitumor Drug Screening Assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Linhagem Celular PC-12 Adh. Aspecto da cultura à microscopia de luz invertida.....	34
Figura 2. Distribuição das categorias de intensidade (%) do efeito inibitório sobre a viabilidade celular de células PC-12 Adh observado após tratamento com os extratos de plantas do Cerrado (n=55).....	39
Figura 3. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos da <i>Allamanda blanchetti</i> ADC.....	41
Figura 4. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Bauhinia rufa</i> ..	42
Figura 5. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Erythroxylum subrotundum</i> .....	43
Figura 6. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.....	44
Figura 7. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Pouteria ramiflora</i> .....	45
Figura 8. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Pouteria torta</i> .	46
Figura 9. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de <i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.....	47
Figura 10. Representação gráfica do efeito citotóxico das frações do extrato hexânico da folha do <i>Erythroxylum subrotundum</i> .....	48
Figura 11. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> .....	49
Figura 12. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico induzido pelo tratamento com Maleato de Sunitinib® (Sigma).....	51

Figura 13. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico da folha da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C. com 24 e 48 horas de tratamento em linhagem celular de feocromocitoma, PC-12 Adh.....	53
Figura 14. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico da folha da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C em linhagem celular de queratinócitos humanos HaCat.....	54
Figura 15. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico do fruto da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C em linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh....	54
Figura 16. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico do fruto da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C em linhagem celular de queratinócito HaCat.....	55
Figura 17. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico da folha do <i>Erythroxylum subrotundum</i> em linhagem celular de feocromocitoma PC12-Adh.....	56
Figura 18. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico da folha do <i>Erythroxylum subrotundum</i> em linhagem celular de queratinócito HaCat.....	56
Figura 19. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico da fração Hex:AcoEt do <i>Erythroxylum subrotundum</i> em linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh.....	57
Figura 20. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico da fração Hex:AcoEt do <i>Erythroxylum subrotundum</i> em linhagem celular de queratinócito HaCat.....	57
Figura 21. Curva de Calibração do Ácido Gálico para o Teste de Polifenóis Totais..	59
Figura 22. Curva de Calibração da Quercetina para o Teste de Flavonoides.....	59
Figura 23. Triagem biológica de plantas e fungos endofíticos do Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos de espécies vegetais do cerrado analisados quanto ao seu efeito citotóxico na linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh (n=55).....	35
Tabela 2. Extratos de espécies vegetais e fungos do cerrado com efeito citotóxico em linhagem celular de feocromocitoma (n=18).....	50
Tabela 3. Extratos de espécies vegetais e fungos do cerrado com efeito dose-dependente em linhagem celular de feocromocitoma (n=8).....	52
Tabela 4. Extratos de espécies vegetais com atividade citotóxica avaliada em linhagem celular tumoral de feocromocitoma e não tumoral de queratinócitos (n=4).....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

CpG – Dinucleotídeo Citosina – Guanina

DHEA – Desidroepiandrosterona

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPAS1- Proteína endotelial induzível por hipóxia

FAPDF – Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal

GHRHR – Receptor para hormônio liberador de hormônio do crescimento

GnRHR – Receptor para hormônio liberador de gonadotrofinas

HIF – Fator induzível por hipóxia

I<sup>131</sup>-MIBG - Metaiodo-benzilguanidina Iodo-131

IC50 – Concentração necessária para inibir 50% da atividade

IGF-1 – Fator de crescimento insulina-símile 1

MAX – Oncoproteína fator X associada ao MYC

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MEN 2- Neoplasia endócrina múltipla tipo 2

MN – Metanefrina



MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil-2-il]-2,5-difeniltretrazólio

MYC – Homólogo do oncogene viral mielocitomatose

NF1- Neurofibromatose tipo 1

NMN – Normetanefrinas

PBS – Tampão fosfato salino

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PHD – Proteína domínio-prolil-hidroxilase

PTEN – Gene supressor tumoral homólogo deletado da fosfatase e tensina do cromossomo 10

RB – Retinoblastoma

RET – Proto-oncogene rearranjado durante transfecção

SDH – Complexo enzimático succinato desidrogenase

SDHAF2 – Enzima da flavinação de SDHA

sst2 – Receptor de somatostatina tipo 2

TMEM – Supressor tumoral da proteína transmembrânica 127

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VHL – *von Hippel-Lindau*

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

EAG – Equivalente a Ácido Gálico

EQ – Equivalente a Quercetina

µg- Micrograma

µL – Microlitro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

M – molar

nm - nanometro

IU – Unidade Internacional

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....	20
1.1. GLÂNDULA ADRENAL .....	20
1.2. FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMAS - CONCEITO E ASPECTOS CLÍNICOS .....	21
1.3. ASPECTOS GENÉTICOS E FISIOPATOLÓGICOS DE TUMORIGÊNESE DO FEOCROMOCITOMA.....	24
1.4. TRATAMENTOS E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS.....	27
1.5. BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS E FUNGOS .....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. OBJETIVO GERAL .....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1. CULTIVO CELULAR .....	34
3.2. EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO .....	34
3.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE .....	36
3.4. CURVA DOSE-RESPOSTA.....	37
3.5. ENSAIO DE POLIFENÓIS TOTAIS .....	37
3.6. ENSAIO DE FLAVONOIDES .....	37
3.7. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA .....	38
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS .....	39
4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA .....	39
4.1.1. <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C.....	40
4.1.2. <i>Bauhinia rufa</i> .....	41
4.1.4. <i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.....	43
4.1.5. <i>Pouteria ramiflora</i> .....	44
4.1.6. <i>Pouteria torta</i> .....	45
4.1.7. <i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.....	46
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES DE PLANTAS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA .....	47

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA.....	48
4.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DOS EXTRATOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA	49
4.4.1. <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C.....	53
4.4.1.1. Extrato etanólico da folha da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C.....	53
4.4.1.2. Extrato etanólico do fruto da <i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C.....	54
4.4.2. <i>Erythroxylum subrotundum</i> .....	55
4.4.2.1. Extrato Hexânico da Folha do <i>Erythroxylum subrotundum</i> .....	55
4.4.2.2. Extrato da Fração Hex:AcoEt do <i>Erythroxylum subrotundum</i> .....	57
4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. GLÂNDULA ADRENAL

As adrenais são glândulas também conhecidas como suprarrenais, cujo tamanho é dependente da idade e das condições fisiológicas do indivíduo, medindo aproximadamente 05 centímetros em adultos. As adrenais são encapsuladas e podem ser histologicamente divididas em córtex e medula, os quais podem ser considerados órgãos distintos, com origem embriológica diferente e apenas unidos topograficamente. O córtex surge do epitélio celomático, sendo, portanto, mesodérmico, enquanto a medula se origina de células da crista neural, ou seja, origem neuroectodérmica (Junqueira, 2004).

O córtex adrenal é originado de células mesodérmicas e é identificável como um órgão singular a partir do segundo mês de vida intrauterina. Neste período, o córtex é composto de uma zona fetal e uma zona definitiva, a qual é similar ao córtex adrenal adulto (Greenspan e Gardner, 2001). Histologicamente, o córtex em adultos é composto pelas zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticular, que secretam, respectivamente, mineralocorticoides (aldosterona), glicocorticoides (cortisol) e andrógenos (DHEA, testosterona e outros) (Junqueira, 2004).

A medula adrenal, por sua vez, é derivada de células primitivas da crista neural, as simpátogônias, que também dão origem ao sistema nervoso simpático. A partir da quinta semana de vida embrionária, essas células migram do glânglio espinhal primitivo para a região torácica para formar a cadeia ganglionar simpática posterior da aorta dorsal. A partir da sexta semana, parte destas células primitivas migra pela veia adrenal central e entra no córtex adrenal fetal para formar a medula adrenal, que pode ser detectada na oitava semana (Greenspan, 2004).

A medula adrenal é um componente especializado do sistema nervoso simpático que secreta catecolaminas como a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina. As catecolaminas são moléculas que possuem um núcleo catecol, que consiste em um benzeno com dois grupamentos laterais hidroxil ligados a uma cadeia lateral de amina. Apesar da medula adrenal não ser criticamente necessária à sobrevivência, a secreção de epinefrina e outros componentes na corrente

sanguínea ajuda a manter a homeostase corporal durante o estresse (Greenspan, 2004).

As catecolaminas são encontradas na medula adrenal e em vários órgãos inervados pelo sistema nervoso simpático como baço, cérebro, fígado e outros. Sua concentração reflete a densidade dos neurônios simpáticos. As catecolaminas são armazenadas em grânulos juntamente com ATP, neuropeptídeos, íons e proteínas hidrossolúveis denominadas cromograninas (Greenspan, 2004).

As catecolaminas são distribuídas amplamente em seres humanos. A epinefrina é sintetizada principalmente na medula adrenal, enquanto a norepinefrina é encontrada não apenas na medula adrenal, mas também no sistema nervoso central e nervos simpáticos periféricos. A dopamina, que é um precursor da norepinefrina, é encontrada na medula adrenal e nos neurônios noradrenérgicos. Em condições fisiológicas, a secreção destas catecolaminas é induzida pela liberação de acetilcolina nas fibras pré-ganglionares terminais e é aumentada por estímulos estressantes como a prática de exercícios, angina, infarto do miocárdio, hemorragia, entre outros (Greenspan, 2004).

As manifestações clínicas predominantes em feocromocitomas são atribuídas ao excesso de catecolaminas circulantes e seu impacto fisiopatológico, quase sempre ocorrendo com atraso significativo entre os sintomas iniciais e o diagnóstico da doença (Camacho, 2008).

## 1.2. FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMAS - CONCEITO E ASPECTOS CLÍNICOS

Os feocromocitomas são neoplasias altamente vascularizadas, originários de derivados da crista neural, isto é, de células adrenomedulares denominadas células cromafins ou feocromócitos (Kronenberg, 2008). Quando localizados fora da glândula adrenal denominam-se feocromocitomas extra-adrenais ou paragangliomas (Molatore *et al.*, 2010). A distinção entre feocromocitoma e paraganglioma é importante em virtude das implicações de associação com outras neoplasias, risco de malignidade, definição do teste genético para o estabelecimento do diagnóstico molecular e direcionamento da escolha terapêutica (Kronenberg, 2008).

Os paragangliomas podem ser derivados de Sistema Nervoso simpático ou parassimpático. Os paragangliomas parassimpáticos usualmente são considerados inativos ou silenciosos, isto é, não tem capacidade clinicamente significativa de secreção de catecolaminas (Jafri e Maher, 2012). Os tumores secretores de catecolaminas, tanto feocromocitomas quanto paragangliomas, são raros, com incidência anual estimada em 02 a 08 casos por milhão de pessoas. (Kronenberg, 2008). Sua prevalência estimada é de 1:4500 e 1:1700 caso por pessoas, respectivamente (Kantorovich, King e Pacak, 2010). Os valores de prevalência e incidência variam de acordo com diversos autores, porém é importante ressaltar que não foi encontrada esta estimativa aplicada à população brasileira.

Embora sejam usualmente benignos, aproximadamente 10 a 15% dos feocromocitomas humanos evoluem com comportamento maligno e são refratários ao tratamento. Feocromocitomas ocorrem esporadicamente ou como parte de síndrome de neoplasias familiares, em 25-30% dos casos. (Molatore *et al.*, 2010). Aproximadamente entre 15 e 20% dos pacientes com tumores secretores de catecolaminas têm mutações germinativas em genes associados a doenças genéticas (Kronenberg, 2008).

O desenvolvimento do feocromocitoma pode ocorrer em qualquer idade, sendo observados relatos de casos em recém-nascidos e em pacientes mais velhos. A quantidade e o padrão de secreção de catecolaminas liberadas pela maioria dos feocromocitomas tem alta variabilidade, o que explica a característica comum de sintomas paroxísticos (Camacho, 2008). As manifestações clínicas e bioquímicas estão associadas a esta produção elevada (Yuan *et al.*, 2008).

O sinal predominante em pacientes com tumores secretores de catecolaminas é a hipertensão arterial sistêmica, seja paroxística ou sustentada, além de outros sintomas associados, como palpitações, taquicardia, cefaleia, sudorese intensa, náusea, dor abdominal/torácica, febre, rubor, vômito e ansiedade ou ataques de pânico (Camacho, 2008). Menos de 0,5% dos pacientes com hipertensão arterial apresenta o tumor, porém a incidência pode ser maior em pacientes com histórico de câncer (Adler *et al.*, 2009).

O diagnóstico de feocromocitoma pode ser suscitado a partir de manifestações clínicas incluindo hipertensão arterial persistente ou paroxística, com a tríade clássica de cefaleias severas, palpitações e diaforese, principalmente em indivíduos com menos de 40 anos ou com hipertensão de difícil controle. Os parâmetros bioquímicos mais importantes, com maior sensibilidade e especificidade e que auxiliam na confirmação do diagnóstico consistem nas determinações das metanefrinas (MN) e normetanefrinas (NMN) - urinárias e/ou séricas. A presença e a localização do tumor podem ser verificadas por meio de exames de imagem como tomografia computadorizada ou ressonância magnética nuclear e complementada por estudos cintilográficos (Yuan *et al.*, 2008).

A presença de transportadores de norepinefrina na membrana dos grânulos cromafins presentes nas células produtoras de catecolaminas, bem como de um sistema de transporte vesicular de monoaminas, mecanismos de armazenamento e transporte de aminoácidos necessários para a síntese de catecolaminas são características peculiares dos feocromocitomas e constituem alvos para os testes funcionais de imagem, como a cintilografia com  $I^{131}$ -MIBG. O MIBG (metaiodo-benzilguanidina) é um fármaco que apresenta afinidade pelas vesículas das células cromafins neuroendócrinas. Quando marcado com um composto radioativo ( $I^{131}$  ou  $I^{123}$ ), constitui um radiofármaco bastante útil na localização e avaliação da funcionalidade dos tumores, bem como para o seu tratamento (Korpershoek, Pacak e Martiniova, 2012).

O diagnóstico do feocromocitoma nem sempre é imediato e deve seguir um algoritmo incluindo os testes bioquímicos, testes de imagem convencionais e funcionais, e ainda testes genéticos (Korpershoek, Pacak e Martiniova, 2012). O aspecto histológico desses tumores, mesmo com invasão capsular ou vascular, não permite a diferenciação precisa da lesão benigna ou maligna. A malignidade é definida pela invasão do tumor fora do sítio primário de origem ou demonstração de metástases (Camacho, 2008).



### 1.3. ASPECTOS GENÉTICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA TUMORIGÊNESE DO FEOCROMOCITOMA

Previamente, estudos verificaram que aproximadamente 24% dos indivíduos com feocromocitomas esporádicos apresentavam mutações genéticas; recentemente este número é dito superior a 30% dos casos (Sandgren *et al.*, 2010). Novos dados de genotipagem específica destes tumores têm sido correlacionados à localização específica, ao fenótipo bioquímico típico ou ao comportamento clínico e evolução (Karasek, Frysak e Pacak, 2010).

Várias síndromes autossômicas dominantes também podem apresentar feocromocitoma adrenal ou extra-adrenal, como a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 (MEN2), a Síndrome de *von Hippel-Lindau* (VHL), a Neurofibromatose tipo 1, e ainda síndromes hereditárias de paragangliomas (Molatore *et al.*, 2010).

Apesar da maioria dos feocromocitomas serem aparentemente esporádicos, o entendimento da genética do desenvolvimento deste tumor tem ganhado cada vez mais importância. Estudos translacionais demonstram que até 60% dos casos de feocromocitomas e paragangliomas apresentam mutações somáticas ou germinativas em genes candidatos a causadores da patologia. Atualmente, a lista de genes relacionados à tumorigênese em feocromocitomas é composta por: os genes que codificam o SDH (complexo enzimático succinato desidrogenase), isto é, aqueles que codificam as suas subunidades A, B, C e D (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*); o gene *SDHAF2*, que codifica a enzima da flavinação da SDHA (subunidade A do SDH); o *VHL* (gene supressor tumoral da Doença de *von Hippel-Lindau*); o *EPAS1* ou *HIF2A* (codante da proteína endotelial induzível por hipóxia); o *RET* (proto-oncogene rearranjado durante transfeccção); o *NF1* (gene supressor tumoral da Neurofibromatose tipo 1); o *TMEM127* (gene supressor tumoral da proteína transmembrânica 127); o *MAX* (oncoproteína fator X associada ao MYC); e o *H-RAS* (oncogene homólogo ao sarcoma viral de rato) (Crona *et al.*, 2014).

Estudos translacionais sugerem também que a genotipagem tanto dos tumores (mutações somáticas) quanto dos indivíduos afetados pode ser utilizada como marcador preditivo da sensibilidade às terapias alvo dirigidas. Verificou-se que tumores associados a mutações germinativas nos genes *VHL* e *SDH* apresentariam

melhor resposta ao tratamento anti-angiogênico, enquanto aqueles cujos portadores apresentam mutações nos genes *RET*, *NF1*, *TMEM127* e *MAX* seriam mais responsáveis à terapia com inibidores das vias dependentes de quinases (Crona *et al.*, 2014).

Outros genes ainda estão sendo investigados para permitir a correlação com o desenvolvimento de feocromocitoma e paragangliomas. O gene *PTEN* (gene supressor tumoral homólogo deletado da fosfatase e tensina do cromossomo 10) apresenta mutações com elevadas frequências em tumores humanos, porém não teve associação direta estabelecida ao feocromocitoma. Entretanto, curiosamente, outros estudos demonstraram que ratos com *knock-out* do gene *PTEN* desenvolveram feocromocitomas em alta frequência (Korpershoek, Pacak e Martiniova, 2012)

A família de genes do retinoblastoma inclui o gene *RB*, o gene *p107* e o *p130*, que são todos supressores tumorais. O gene *RB* está mais frequentemente envolvido na patogênese de tumores múltiplos. A inativação do gene *RB* está associada com retinoblastomas familiares e esporádicos, carcinomas de pequenas células em pulmão, e osteosarcomas. Em adição, a inativação do *RB* também está associada a instabilidade cromossômica, progressão tumoral e ativação da angiogênese. O *RB* funciona como um regulador essencial à progressão do ciclo celular. Modelos animais com *knock-out* para este gene desenvolveram feocromocitomas, paragangliomas e outros tumores (Korpershoek, Pacak e Martiniova, 2012).

Além disso, alterações epigenéticas são importantes na biologia tumoral já que podem alterar genes que codificam fatores de transcrição. O perfil epigenético do feocromocitoma, por enquanto, está restrito à investigação do padrão de metilação das regiões CpG (dinucleotídeo citosina-guanina) dos promotores de genes selecionados. Modificações na histona ou nos cromossomos, ou a associação destas, constituem fatores responsáveis pela alteração da expressão de frações substanciais de genes investigados e correlacionados ao feocromocitoma, apresentando um comportamento característico de malignidade (Sandgren *et al.*, 2010).

As análises do perfil transcricional de feocromocitomas e paragangliomas os classificam em duas diferentes classes, conhecidas como *cluster 1* e *cluster 2*. Os tumores que pertencem ao *cluster 1* são principalmente representados pelos que apresentam mutações nos genes *VHL* e *SDH* e exibem um fenótipo de pseudohipóxia. Esse fenótipo caracteriza-se pela presença de características de hipóxia celular mesmo na presença de concentrações suficientes de oxigênio, com consequente aumento da transcrição de genes envolvidos no angiogênese e proliferação celular, e tipicamente aumento da capacidade secretória e metabolismo de norepinefrina. Os tumores classificados no *cluster 2* incluem aqueles com mutações no *RET* e *NF1*, e são caracterizadas pelo fenótipo de ativação da sinalização mediada pela via Ras/Raf/Erk, também levando ao efeito final pró-proliferativo e angiogênico. Contudo, ao contrário do cluster 1, nesses tumores predomina o aumento de expressão de genes relacionados à síntese de epinefrina, e não norepinefrina, o que possibilita sua diferenciação com base no perfil bioquímico de secreção de catecolaminas (Cascón e Tennant, 2012).

Grande parte do fenótipo de pseudohipóxia está relacionada à atividade de fatores transcricionais chamados fatores induzíveis por hipóxia (HIFs), embora esteja se tornando claro que isso é apenas uma parte do processo. Os genes alvo de HIFs desempenham um papel importante na progressão tumoral, incluindo aqueles envolvidos na angiogênese, adaptação metabólica, divisão celular e morte celular. Existem 03 tipos de HIFs expressos em células de mamíferos, onde HIF1 e HIF2 são os mais bem definidos até o momento. São fatores de transcrição heterodiméricos compostos pelas subunidades constitutiva beta e a subunidade alfa expressa na hipóxia e pseudo-hipóxia, os quais induzem ou suprimem a expressão de genes ao se ligarem aos elementos responsáveis à hipóxia nas regiões promotoras de genes por eles regulados. Em condições normais, as subunidades alfas são hidroxiladas pelas dioxigenases dependentes de alfa-cetoglutarato conhecidas como proteínas domínio - prolil-hidroxilase (PHD) (Cascón e Tennant, 2012).

A angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, é crucial para o crescimento tumoral e metastáse. Vários estudos demonstraram efetividade em inibir o crescimento tumoral e metastáse pelo bloqueio da angiogênese tumoral. A angiogênese é um processo complexo incluindo

proliferação celular endotelial, migração e formação de tubos. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), secretado por células tumorais e endoteliais, atua como fator autócrino e parácrino, essencial para todas as etapas da progressão tumoral incluindo o crescimento das células tumorais e angiogênese (Cho *et al.*, 2009).

A complexidade observada na tumorigênese dos feocromocitomas e paragangliomas proporciona diferentes alvos terapêuticos para o tratamento desta patologia.

#### 1.4. TRATAMENTOS E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

A ressecção cirúrgica ainda constitui a única cura definitiva para lesões benignas, enquanto os tumores malignos ou não ressecáveis não apresentam tratamento efetivo (Adler *et al.*, 2009). Tumores malignos têm como tratamentos possíveis a quimioterapia antineoplásica tradicional, sendo mais comumente utilizada a associação entre ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina. A quimioterapia pode induzir respostas terapêuticas parciais e, atualmente, ainda é considerada um dos tratamentos mais efetivos, porém com morbi-mortalidade ainda pouco caracterizada (Favier *et al.*, 2002). Tumores que apresentem radio-marcação positiva na cintilografia podem ser tratados com doses terapêuticas elevadas de I-MIBG ou de análogos da somatostatina, como o octreotide-radionuclídeo (Kantorovich, King e Pacak, 2010). Além disso, portadores de feocromocitomas malignos são usualmente tratados paliativamente com fármacos alfa e beta-bloqueadores para controle dos sintomas de hiperatividade adrenérgica (Kappes *et al.*, 2007). Porém, estas opções de tratamento não aumentam a estimativa de sobrevivência do paciente com metástases (Favier *et al.*, 2002) e a busca por novos alvos terapêuticos tem sido permanente (Kappes *et al.*, 2007).

Com a necessidade urgente de terapias farmacológicas direcionadas ao tratamento dos feocromocitomas malignos, a utilização de vias múltiplas como alvo visa potencialmente elevar a eficácia do tratamento, bem como ampliar o conhecimento sobre o desenvolvimento tumoral (Korpershoek, Pacak e Martiniova, 2012).

Diversas vias moleculares estão envolvidas no desenvolvimento do feocromocitoma e estudos *in vitro* buscam elucidar novos alvos terapêuticos e proporcionar uma maior compreensão sobre o tumor.

Ziegler e colaboradores (2013), em seu estudo com linhagens celulares de feocromocitoma MPC e MTT, propuseram que a terapia direcionada para receptores hormonais possa ser útil para o tratamento de tumores metastáticos. Nesse estudo, foram observados efeitos antitumorais *in vitro* de peptídeos análogos de receptores de hormônios, como o receptor de somatostatina (sst2), o receptor para o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHR) e o receptor para o hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRHR).

Ainda na busca de terapias alternativas e alvo-dirigidas, Fernandez e colaboradores (2013) demonstraram que a elevação das concentrações do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF-1) em culturas de células PC-12 Adh e MPC induziu a proliferação, migração, capacidade de crescimento sem agrupamento e inibição da apoptose celular, sugerindo um efeito tumorigênico. De fato, a expressão elevada de IGF-1 e 2 e do receptor 1R já foi documentada em várias malignidades como glioblastomas, neuroblastomas, meningiomas, meduloblastomas, carcinomas de mama, colorretal e pancreático, e câncer de ovário. Os autores concluíram que IGF-1 e seu receptor são fundamentais para a manutenção do fenótipo tumoral e a sobrevivência das células diferenciadas de feocromocitoma. Sua inibição corresponderia a um possível novo alvo terapêutico. (Fernández *et al.*, 2012).

O Maleato de Sunitinib® é um fármaco inibidor de receptores de tirosina quinase considerado múltiplo, pois atua em diversas vias reguladas por esses receptores. Possui atividade anti-angiogênica e antitumoral ao atuar nos receptores do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Os efeitos antitumorais no feocromocitoma ainda não estão bem estabelecidos, porém estudos *in vitro* demonstraram a inibição do crescimento celular, e alterações na expressão gênica e fosforilação das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (Saito *et al.*, 2012)

Complementando os efeitos observados por Saito e colaboradores (2012), trabalhos recentes demonstram que o Maleato de Sunitinib® é capaz de inibir a

síntese e a secreção de catecolaminas intra e extracelulares via VEGFR-2 (Aita *et al.*, 2012) e inibir a autofagia celular potencializando os efeitos citotóxicos e reduzindo a resistência ao fármaco (Ikeda *et al.*, 2013).

Apesar das fortes evidências de um efeito antitumoral *in vitro* do Maleato de Sunitinib®, os primeiros estudos clínicos em pacientes com feocromocitoma apresentaram resultados inconclusivos.

Nemoto e colaboradores reportaram o caso de uma paciente com recidiva tumoral pós-cirúrgica e não responsiva a quimioterapia, que desenvolveu hipertensão causada pela síndrome da lise tumoral após o tratamento com Maleato de Sunitinib® em altas doses. Após o ajuste de dose houve resposta parcial com a redução do tumor e controle dos sintomas, porém o tratamento foi suspenso devido à inacessibilidade ao medicamento e a paciente foi a óbito durante o período de cuidados paliativos (Nemoto *et al.*, 2011).

Hata e colaboradores reportaram o caso de paciente tratado com Maleato de Sunitinib® para Feocromocitoma maligno refratário. Após ressecção cirúrgica, tratamento com quimioterapia e imunomarcagem positiva para VEGF-R, o Maleato de Sunitinib® foi introduzido no esquema terapêutico e foi observada a estabilização da progressão tumoral. Este paciente desenvolveu como efeitos adversos hipotireoidismo e trombocitopenia e, após 05 meses de tratamento, houve novamente aumento da metastase hepática e elevação dos níveis séricos de normetanefrina e metanefrina. (Hata *et al.*, 2014)

Assim, embora os resultados do uso de Maleato de Sunitinib® *in vitro* sejam promissores, ainda não há evidência suficiente para seu uso clínico em larga escala em pacientes com feocromocitoma, sendo reservado ainda para protocolos clínicos experimentais. O manejo de paciente com feocromocitoma maligno pode ser frustrante, uma vez que as opções curativas são limitadas e os custos elevados. Claramente, protocolos inovadores prospectivos são necessários para buscar novas opções de tratamento para esta neoplasia (Kronenberg, 2008).

## 1.5. BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS E FUNGOS

A biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existente entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Uma de suas principais características é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico (Simões, 2003).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica destacando-se os fitoterápicos e fitofármacos. As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (Simões, 2003)

Alguns quimioterápicos de ampla utilização clínica terapêutica foram inicialmente extraídos de plantas, como o Paclitaxel extraído da *Taxus brevifolia* que apresenta atividade anticancerígena em tumores de ovário e mama, e a Vincristina e Vimblastina, extraídas atualmente da *Catharanthus roseus* e utilizada no tratamento da leucemia infantil, entre outros (Simões, 2003)

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural do sintético: a diversidade molecular e a função biológica (Simões, 2003). Há vários caminhos para o estudo de plantas medicinais e o Brasil é um país propício e produtivo à pesquisa científica que envolve a aplicação de conhecimentos locais sobre o uso de plantas e animais medicinais. (Albuquerque e Hanazaki, 2006).

Produtos naturais possuem uma vasta diversidade química, não apenas relacionada às estruturas químicas, mas também com diversas atividades biológicas. A identificação dos diferentes tipos de compostos principais pode permitir a utilização em diferentes patologias, portanto o estudo dos produtos naturais poderia ser utilizado como para ampliar os bancos de dados sobre os compostos químicos que ainda se encontram largamente incompletos devido às constantes descobertas de novas moléculas, às pesquisas com aplicações biológicas restritivas e aos erros nos dados já existentes (Gu et al, 2013).

Zhu e colaboradores (2012) sugerem que novas espécies produtoras de fármacos ainda inexploradas não estão próximas à extinção, e existe uma alta probabilidade em encontrar novas espécies produtoras de novas moléculas nas famílias e grupos já estudados e caracterizados como produtores de fármacos. O surgimento de novas tecnologias permitem estudos dos mais diversos grupos de produtos naturais, juntamente com análises retrospectivas, revelam estratégias úteis para a descoberta e produção de novas moléculas derivadas de fontes naturais.

Bessa e colaboradores (2012), em seu estudo etnobotânico de plantas do Cerrado nativas do estado de Tocantins, encontraram que as indicações terapêuticas empíricas realizadas pela comunidade deste local sinalizam para uma relação semelhante com a ação biológica e farmacológica dos constituintes fitoquímicos presentes nos extratos das plantas avaliadas concordante com a literatura e ressaltam que os estudos e padronização de marcadores são indispensáveis para validação das plantas medicinais, usos populares mais seguros e para testes de avaliação de qualidade e integridade, possibilitando melhor controle dessas espécies.

A partir da biodiversidade nacional, com ênfase nas espécies de plantas e fungos do Cerrado, bioma dominante na região Centro-Oeste do Brasil, a busca de novas moléculas de origem natural justifica a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do feocromocitoma.

O presente estudo consiste basicamente no rastreamento de diversos extratos obtidos de plantas e fungos do Cerrado e caracterização de seu efeito antiproliferativo em células de feocromocitoma PC-12 Adh. O rastreamento inicial incluiu o maior número de extratos disponível nos laboratórios que os produzem. A seleção das plantas para produção dos extratos feita principalmente com base em informações etnobotânicas e/ou em resultados anteriores disponíveis na literatura ou em estudos anteriores da equipe de pesquisadores envolvidos, potencialmente aplicáveis ao tratamento do câncer em geral.

Nesse sentido, esse trabalho foi contemplado com financiamento do CNPq, como parte dos projetos da REDE PRÓ-CENTRO OESTE, que tem por objetivo central a investigação do potencial da biodiversidade do Cerrado e Pantanal para o



desenvolvimento de novos biofármacos, assim em plena consonância com as políticas mais atuais do país.

Por sua vez, a escolha pelo estudo de Feocromocitoma reside principalmente na escassez de conhecimentos sobre sua fisiopatologia e na ausência de tratamento eficaz nos casos malignos, a despeito de sua raridade. Além disso, a investigação das doenças que acometem a glândula adrenal ainda é pouco explorada em nosso país e poucos dados brasileiros foram produzidos até o momento. O fato de o feocromocitoma ser um tumor com características peculiares de neovascularização e perfil molecular de alterações no ciclo celular e influências neuro-hormonais também acrescenta valor ao seu estudo. Potencialmente muito contribui para o entendimento dos múltiplos processos de tumorigênese e desenvolvimento de novos tratamentos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar a existência de atividade antitumoral de extratos de plantas e fungos endofíticos isolados do Cerrado em linhagem de células de feocromocitoma

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica de extratos de espécies de plantas e fungos isolados do Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma;
- Avaliar a atividade citotóxica das frações dos extratos de plantas das espécies nativas do Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma;
- Identificar a dose necessária do extrato das espécies nativas do Cerrado capaz de induzir a morte celular em linhagens de células de feocromocitoma;
- Comparar a atividade citotóxica de extratos de espécies de plantas e fungos com atividade antitumoral em linhagem celular não tumoral;
- Identificar grupos químicos responsáveis pela possível atividade antitumoral presentes nos extratos das espécies nativas do Cerrado.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. CULTIVO CELULAR

A linhagem celular de Feocromocitoma PC-12 Adh (Figura 1) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivada em Meio Ham-F-12K (Sigma N6760) suplementado com 15% de Soro de Cavalo, 5% de Soro Bovino Fetal e 10 mL de penicilina 100IU/mL + estreptomicina 100µg/µL, incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> conforme descrito no *American Type Culture Collection* (ATCC).

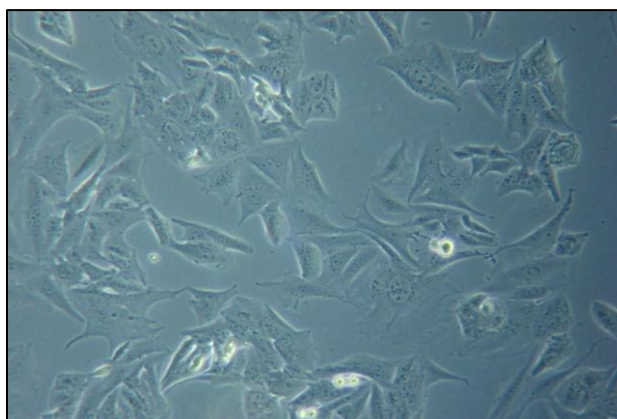


Figura 1. Linhagem Celular PC-12 Adh. Aspecto da cultura à microscopia de luz invertida.

A linhagem celular de queratinócitos HaCat foi compartilhada pela Professora Eliete Guerra do Laboratório de Histopatologia Bucal da Universidade de Brasília, e cultivada em Meio DMEM (Sigma D5648) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal e 10mL de Penicilina 100IU/mL + Estreptomicina 100µg/µL, incubadas a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. EXTRATOS DE PLANTAS E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DO CERRADO

Os extratos das plantas do Cerrado (Tabela 1) foram compartilhados pelas Professoras Dâmaris Silveira e Pérola Magalhães, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília. Os extratos utilizados foram solubilizados na concentração de 25mg/mL em água Mili-Q para os extraídos em solvente aquoso, ou em uma mistura de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Etanol na proporção de 2:3 partes para os extraídos em solvente etanólico ou hexânico.

Tabela 1. Extratos de espécies vegetais do cerrado analisados quanto ao seu efeito citotóxico na linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh (n=55)

Espécie de Planta	Parte da Planta	Solvente
<b>Apocynaceae</b>		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C	Folha	E, H
	Caule	E
	Fruto	E, H
<i>Harcornia speciosa</i> Gomes	Folha	E, H
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.D.C	Folha	E
<b>Caryocaraceae</b>		
<i>Caryocar brasiliense</i>	Semente	E
	Casca do Fruto	E
	Polpa fresca	E
<b>Erythroxylaceae</b>		
<i>Erythroxylum daphnites</i>	Folha	A, E, H
<i>Erythroxylum suberosum</i>	Folha	A, E, H
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Folha	A, E, H
<b>Fabaceae</b>		
<i>Bauhinia rufa</i>	Folha	A, E, H
<i>Bauhinia variegata</i>	Folha	A, E, H
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Casca do caule	E, H
	Folha	E, H
<b>Moraceae</b>		
<i>Morus nigra</i>	Folha	A, E, H
<b>Myrtaceae</b>		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC	Folha	A
<b>Rubiaceae</b>		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	Fruto verde	E
	Casca do fruto verde	E, H
	Fruto	E, H
	Folha	E, H
<b>Sapindaceae</b>		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fruto	E, H
<b>Sapotaceae</b>		
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	Folha	A, E, H
<i>Pouteria gardnerii</i> (Mart. & Miq.) Baehni	Folha	A, E, H
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	Folha	A, E, H
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	Folha	A, E, H

\* Solventes: A- Aquoso, E- etanólico e H-hexânico

Os extratos de 07 fungos endofíticos isolados do Cerrado extraídos da espécie vegetal *Bauhinia variegata* sp. foram compartilhados pela Professora Maria de Fátima Borin, do Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília. Os extratos foram solubilizados na concentração de 25mg/mL em Metanol. As espécies de fungos de *Bauhinia variegata* sp. cujos extratos foram disponibilizados não foram identificadas até o presente momento.

### 3.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células por poço da placa de 96 poços e o tratamento com os extratos foi realizado após 24 horas de incubação. Em cada poço, foram adicionados 100µL dos extratos brutos diluídos em meio de cultura específico para cultivo de cada linhagem celular para obtenção das concentrações de 500µg/mL e 1000µg/mL utilizadas em outros estudos integrantes da REDE PRÓ-CENTRO OESTE. Em 24 horas e 48 horas de tratamento, foi realizado o teste enzimático colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação da viabilidade celular. O MTT foi diluído na concentração de 5mg/mL em PBS (tampão fosfato salino), foram adicionados 10µL em cada poço e as células foram incubadas por 4 horas protegidas da exposição à iluminação. Em seguida, foi adicionado 100µL da solução de álcool iso-propílico e ácido clorídrico e realizada a leitura no Espectrofotômetro Leitor de Placas Beckman Coulter DTX 800 no comprimento de onda 570nm.

Os testes foram realizados para os extratos de plantas, extratos fracionados das plantas e extratos de fungos, em triplicata, e em três ensaios distintos considerando a variabilidade inerente à técnica e ao experimentador.

A intensidade do efeito citotóxico foi analisada conforme o percentual de inibição da viabilidade celular induzido pelos extratos quando comparados ao controle negativo, utilizando volume equivalente do solvente de solubilização dos extratos, cujo valor foi padronizado como 100% de viabilidade celular, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{Absorbância do extrato} \times 100}{\text{Absorbância do controle}}$$

### 3.4. CURVA DOSE-RESPOSTA

Os extratos selecionados após o ensaio de citotoxicidade para a curva dose-resposta foram aqueles que demonstraram capacidade de inibir o crescimento celular em aproximadamente 50% e que não apresentaram efeito citostático com recuperação do crescimento em 48 horas de tratamento.

As concentrações testadas variaram de 125 a 2000µg/mL, obtidas com diluição seriada e correção do solvente de diluição do extrato, seguindo os parâmetros do teste de citotoxicidade. Os testes foram realizados em triplicata e em três ensaios distintos, e comparados aos resultados obtidos com o tratamento utilizado como controle positivo, Maleato de Sunitinib® (Sigma), nas concentrações de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$ M adaptadas a partir dos estudos realizados por Saito e colaboradores (2012).

### 3.5. ENSAIO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Os extratos foram ressuspensos em água Mili-Q para a concentração de 4mg/mL e avaliados pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* como adaptado por Georgetti e colaboradores (2006). Para o teste utilizou-se volume equivalente a 200µg do extrato com adição de 250µL do Reagente de *Folin-Ciocalteu*, 250µL de Carbonato de Sódio 10% e água mili-Q para completar o volume de 2mL. A mistura foi incubada por 01 hora e a leitura realizada no Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 com o software UVProbe® no comprimento de onda de 760nm, e a concentração de polifenóis totais no extrato foi determinada a partir da curva de calibração construída previamente com o Ácido Gálico com as concentrações de 0 µg/mL, 1,5625 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL.

### 3.6. ENSAIO DE FLAVONOIDES

Os extratos foram ressuspensos em água Mili-Q para a concentração de 4mg/mL e avaliados pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio como adaptado por Georgetti e colaboradores (2006). Para o teste utilizou-se 800µg do extrato com adição de 02 mL de Metanol e 300µL de cloreto de alumínio 5%. A mistura foi incubada por 30 minutos e a leitura realizada no Espectrofotômetro

Shimadzu UV-1800 com o software UVProbe® no comprimento de onda de 420nm. A concentração de Flavonoides no extrato foi determinada a partir da curva de calibração construída previamente com quercetina com as concentrações de 0 µg/mL, 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 20,0 µg/mL e 40 µg/mL.

### 3.7. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Os extratos foram diluídos em diclorometano e aplicados na placa de sílica gel previamente ativada por aquecimento a 105°C, juntamente com os padrões dos grupos químicos a serem identificados. A eluição foi feita por capilaridade com uma mistura de hexano:acetato de etila na proporção 7:3 partes.

A revelação foi feita inicialmente com a aplicação de radiação UV e posteriormente com a solução A (anisaldeído 2% e ácido acético 98%) e solução B (etanol 80% e ácido sulfúrico 20%).

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente tratados no Microsoft Office Excel e a análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma 5®. Para os testes de citotoxicidade foi padronizado o teste One-way ANOVA com pós-teste Tukey, assim como utilizado por Phan e colaboradores (2012). Para as curvas dose-resposta foi padronizado o teste de regressão não-linear (dose-resposta x curvatura variável) para obtenção do IC<sub>50</sub> conforme trabalho de Souza e colaboradores (2012).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA.

Cinquenta e cinco extratos de Plantas do Cerrado (Tabela 1) foram utilizados nos testes de citotoxicidade. Por não haver a identificação e a quantificação prévias dos constituintes químicos desses extratos, foi realizado teste para verificar possível interação entre os flavonoides do extrato ou o meio de cultura e o reagente MTT, como descrito por Peng e colaboradores (2005). Não foram encontradas interações que induzissem a resultados falso positivos para a viabilidade celular.

Os extratos analisados foram distribuídos em categorias conforme o percentual de inibição da viabilidade celular nas concentrações de 500µg/mL (Figura 2A) e 1000µg/mL (Figura 2B). Desta forma, realizada uma triagem biológica para atividade antitumoral, na qual foram selecionados para as etapas seguintes do estudo os extratos capazes de inibir a viabilidade celular para níveis iguais ou menores que 50% em relação aos níveis basais de viabilidade celular, em células sem tratamento.

#### Distribuição dos Extratos Avaliados

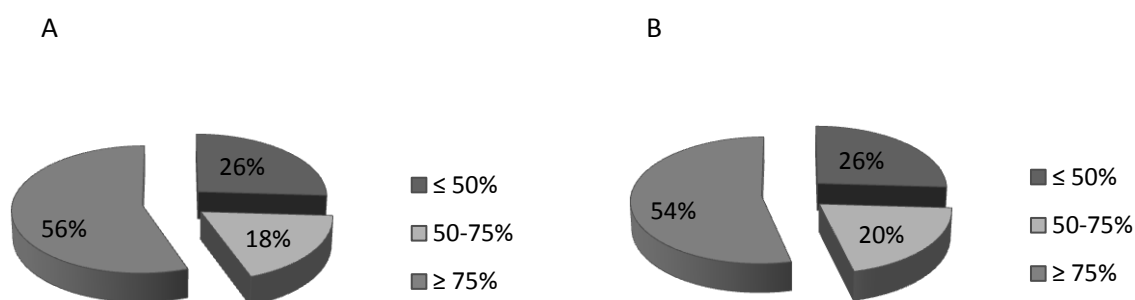


Figura 2. Distribuição das categorias de intensidade (%) do efeito inibitório sobre a viabilidade celular de células PC-12 Adh observado após tratamento com os extratos de plantas do Cerrado (n=55), nas concentrações de 500µg/mL (A) e 1000µg/mL (B).



Em uma análise mais cuidadosa dos efeitos citotóxicos observados para todo o grupo de extratos, optou-se por selecionar os extratos que induziram inibição constante da viabilidade celular ( $\leq 50\%$ ) nas concentrações avaliadas, e, ainda, de forma sustentada nos tempos avaliados. Esse critério final de seleção foi definido com o objetivo de incluir todos os extratos com potencial citotóxico sobre as células PC-12 Adh, as quais são sabidamente bastante resistentes ao tratamento antiproliferativo.

Com esse critério, 14 dentre os 55 extratos analisados (26%) apresentaram o efeito desejado, porém não houve similaridade destes extratos quanto à família vegetal. Observou-se predominância do efeito desejado nos extratos cujo solvente de extração foi o hexano.

A seguir, são apresentados os resultados do teste de citotoxicidade dos extratos selecionados para continuidade do estudo, segundo a planta de origem.

#### 4.1.1. *Allamanda blanchetti* A.D.C

Extratos da folha, do caule e do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C mostraram o efeito citotóxico definido nas concentrações testadas, isto é, induziram inibição da viabilidade celular para níveis menores de 50% em relação aos níveis basais (células não tratadas) (Figura 3). Os extratos tiveram efeito inibitório contínuo no período de tratamento de 48 horas, com exceção do extrato hexânico do fruto que manteve a taxa de inibição semelhante.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas na proporção de células viáveis observadas após tratamento com os extratos hexânico do fruto na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  em 24 horas e hexânico da folha na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  dessa planta, em comparação ao controle sem tratamento. Estes extratos atingiram os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos e, portanto, foram submetidos à curva dose-resposta.

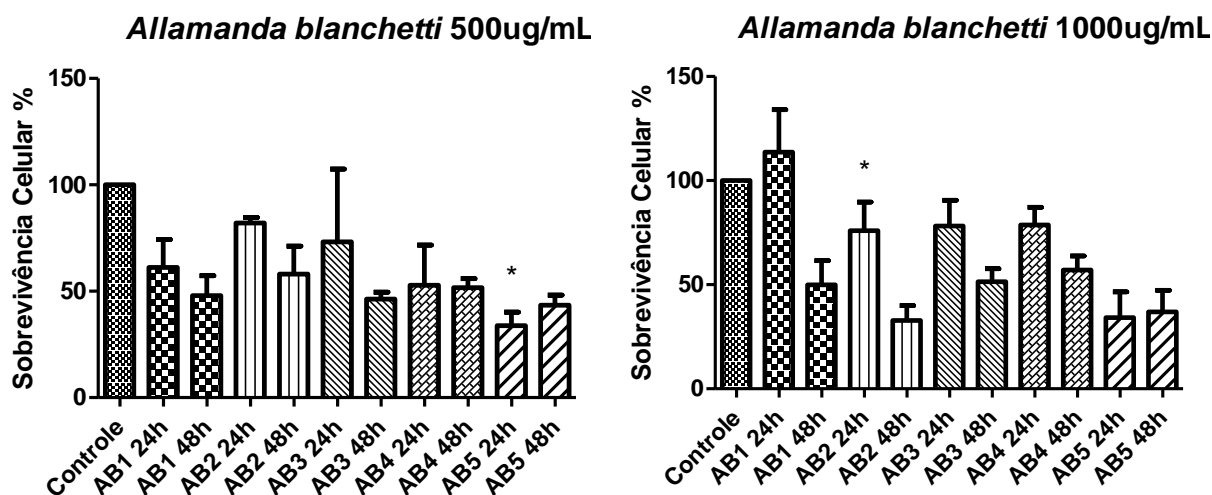


Figura 3. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos da *Allamanda blanchetti* ADC, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de inibição percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, AB5 24h em 500µg/mL com  $p=0,0357$  e AB2 24h em 1000µg/mL com  $p= 0,007$ , determinado por *One-way* ANOVA com pós-teste *Tukey*. Onde: AB1 – Folha E; AB2 – Folha H; AB3 – Caule E; AB4 – Fruto E; AB5 – Fruto H.

#### 4.1.2. *Bauhinia rufa*

O extrato aquoso da folha da *Bauhinia rufa* não mostrou efeito citotóxico nas concentrações testadas. Ao contrário, observou-se estimulação do crescimento celular para o extrato aquoso. Os extratos etanólico e hexânico induziram a inibição da proliferação celular, mas apenas o extrato hexânico atingiu os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos. Este efeito não apresentou significância estatística comparada ao controle (Figura 4).

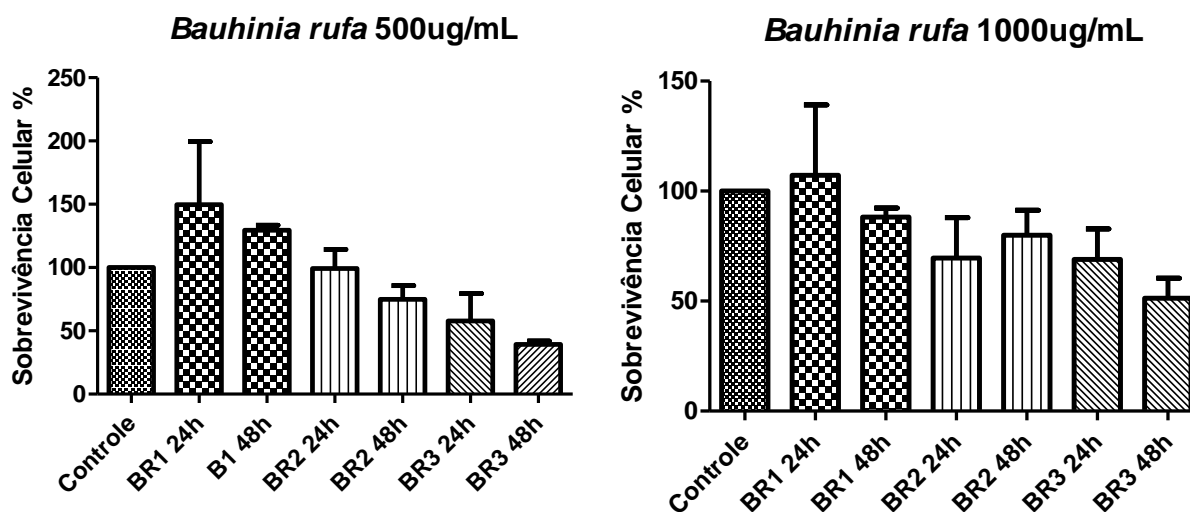


Figura 4. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Bauhinia rufa*, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa nos efeitos desses extratos, determinado por *One-way ANOVA* com pós-teste *Tukey*. Onde: BR1 – Folha A; BR2 – Folha E; BR3 – Folha H.

#### 4.1.3. *Erythroxylum subrotundum*

Os extratos aquoso e etanólico da folha de *Erythroxylum subrotundum* não apresentou efeito citotóxico nas concentrações testadas, sendo observado efeito estimulatório da viabilidade celular. O efeito inibitório foi observado apenas para o extrato hexânico, embora sem significância estatística. Este extrato atingiu os critérios de seleção determinados e foi submetido ao ensaio de curva dose-resposta (Figura 5).

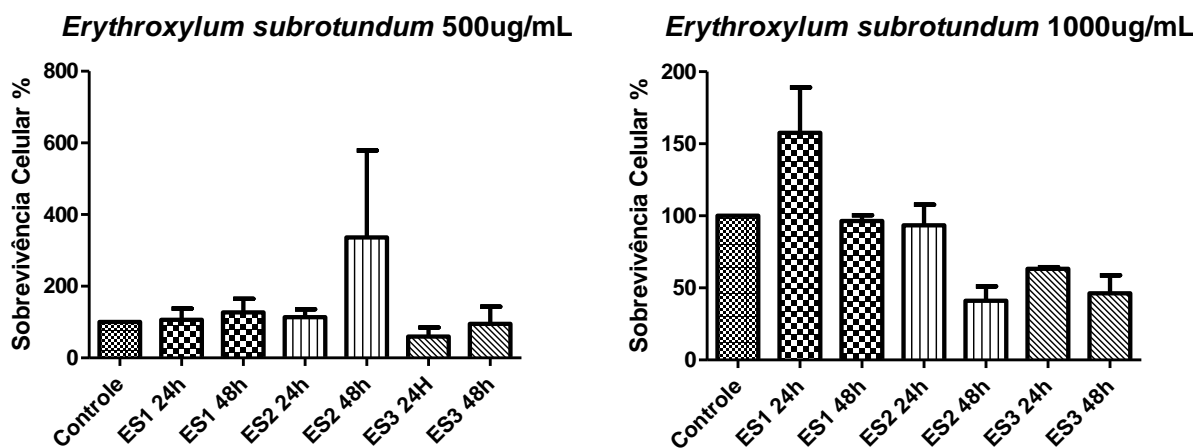


Figura 5. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Erythroxylum subrotundum*, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento. O extrato hexânico em ambas as concentrações mostrou efeito inibitório da viabilidade celular em torno de 50%, embora sem significância estatística em relação ao controle, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: ES1 – Folha A; ES2 – Folha E; ES3 – Folha H.

#### 4.1.4. *Genipa americana* L. Var. *caruto* (H.B.K) K. Shum.

Os extratos hexânicos testados da casca do fruto verde, do fruto e da folha da *Genipa americana* L. Var. *caruto* (H.B.K) K. Shum demonstraram apresentaram citotóxico nas concentrações testadas e atingiram os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos (figura 6).

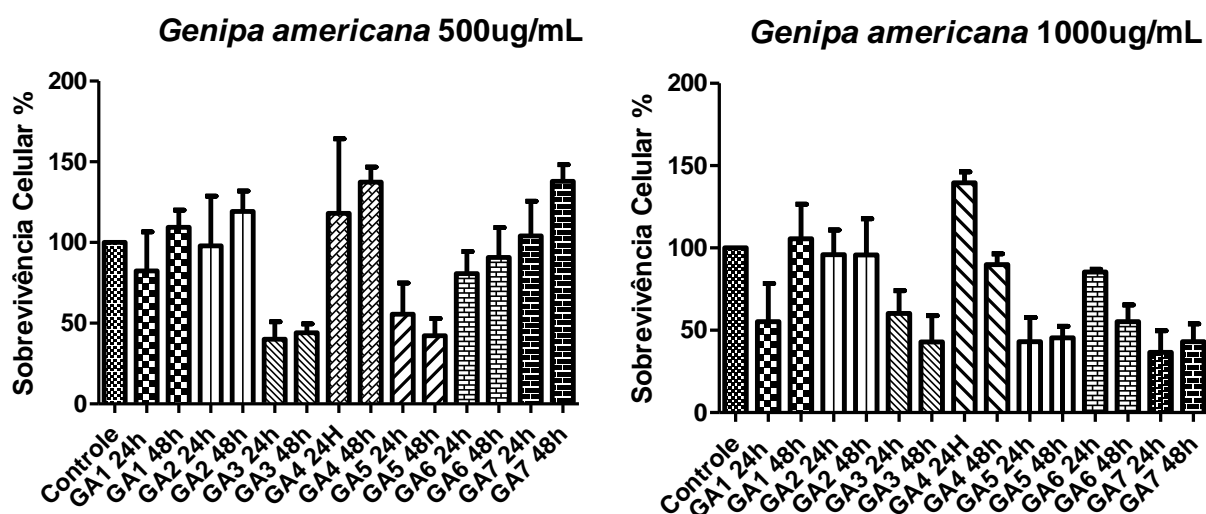


Figura 6. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Genipa americana* L. Var. caruto (H.B.K) K. Shum., após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: GA1 – Fruto verde E; GA2 – Casca do fruto E; GA3 – Casca do fruto H; GA4 – Fruto E; GA5 – Fruto H; GA6 – Folha E; GA7 – Fruto H.

#### 4.1.5. *Pouteria ramiflora*

Os extratos aquoso e etanólico da folha da *Pouteria ramiflora* não tiveram efeito citotóxico nas concentrações testadas e foi observada estimulação do crescimento celular no tempo de 24 horas, com discreta redução após 48 horas. O extrato hexânico mostrou capacidade em inibir a proliferação celular com intensidade próxima a 50% na concentração superior (1000µg/mL) e após 48 horas de tratamento, sugerindo um efeito concentração e tempo dependente. Embora esse resultado não tenha sido estatisticamente significativo, atingiu os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos (Figura 7).

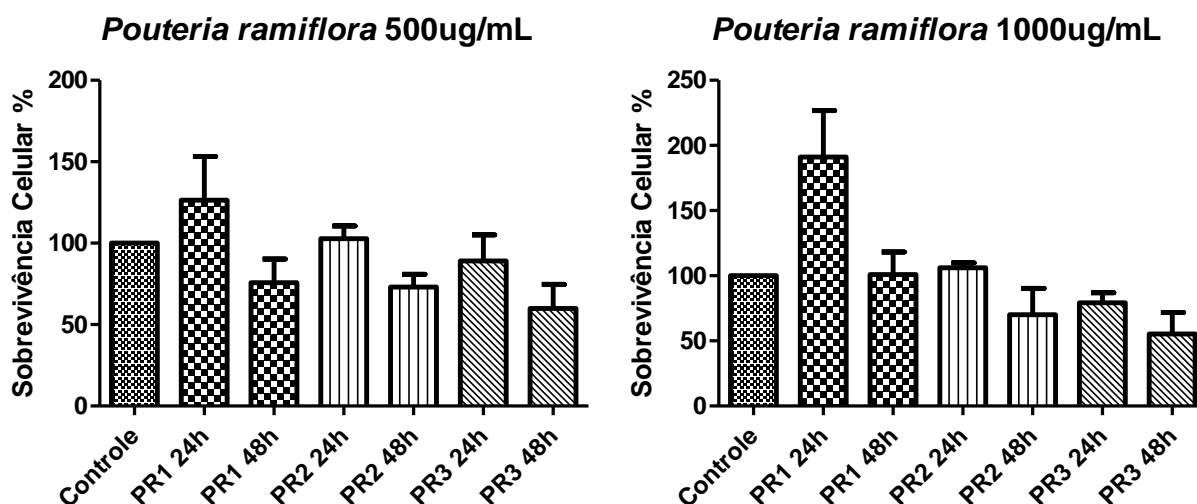


Figura 7. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Pouteria ramiflora*, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: PR1 – Folha A; PR2 – Folha E; PR3 – Folha H.

#### 4.1.6. *Pouteria torta*

Os extratos aquoso e etanólico da folha da *Pouteria torta* não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações testadas e foi observada estimulação do crescimento celular no tempo de 24 horas, principalmente para o solvente aquoso. O extrato hexânico mostrou capacidade em inibir a proliferação celular, aparentemente de forma concentração e tempo dependente, embora não estatisticamente significativa. De acordo com esse efeito, também atingiu os critérios de seleção para a continuidade dos estudos (Figura 8)

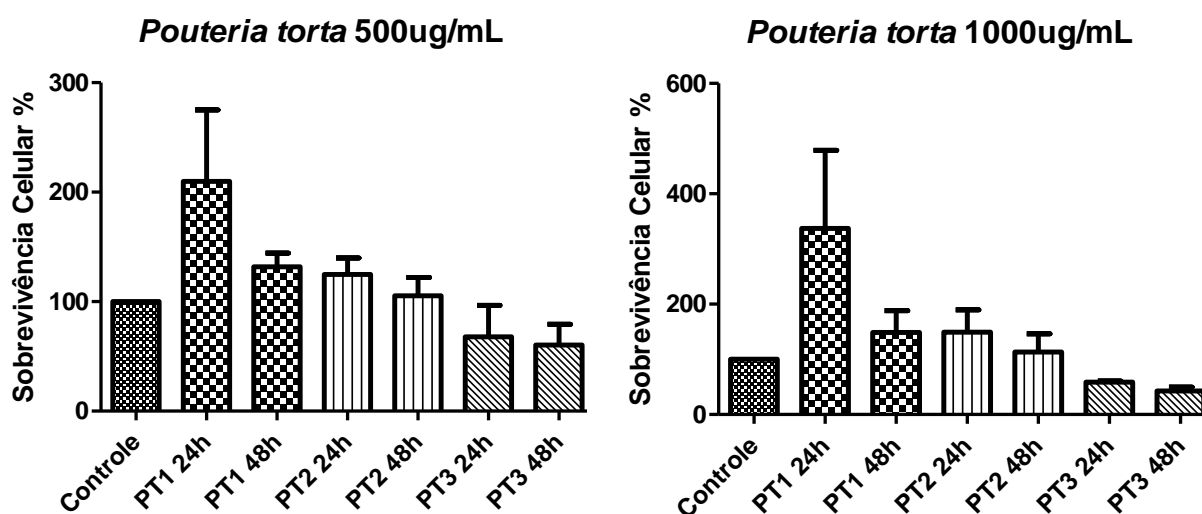


Figura 8. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Pouteria torta*, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: PT1 – Folha A; PT2 – Folha E; PT3- Folha.

#### 4.1.7. *Sapindus saponaria* L. variedade inaequalis (DC.) Radlk.

Os extratos etanólico e hexânico testados do fruto da *Sapindus saponaria* L. variedade inaequalis (DC.) Radlk apresentaram efeito citotóxico nas concentrações testadas com significância estatística quando comparados ao controle, com  $p < 0,05$ . Estes extratos atingiram os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos e também foram submetidos ao ensaio de curva dose-resposta (Figura 9).

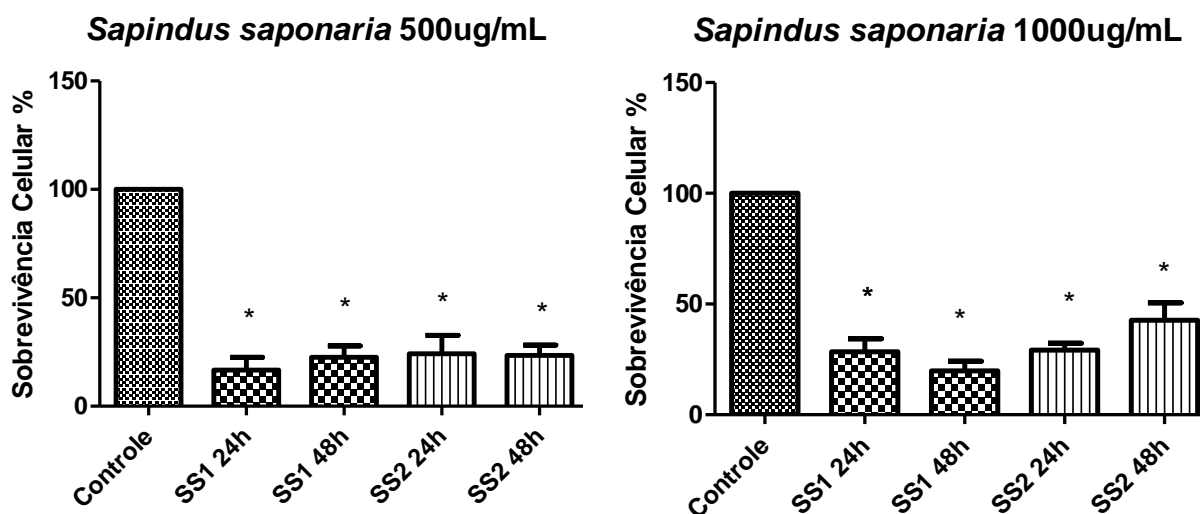


Figura 9. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de *Sapindus saponaria* L. variedade *inaequalis* (DC.) Radlk, após 24 e 48 horas de tratamento, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, apresentado sob a forma de modificação (inibição ou estimulação) percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento,  $p < 0.05$ , determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: SS1 – Fruto E; SS2- Fruto H.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS FRACIONADOS DE PLANTAS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA.

Dentre os extratos selecionados nos ensaios de citotoxicidade e curva dose-resposta, o extrato hexânico do *Erythroxylum subrotundum* foi fracionado em 03 partes, as quais foram submetidas ao teste de citotoxicidade para que houvesse uma maior aproximação do composto responsável pela possível atividade antitumoral. As frações Hexano:Acetato de Etila (Hex:AcoEt) e Acetato de Etila (AcoET) apresentaram inibição da proliferação celular, estatisticamente significativa em comparação ao controle sem tratamento, alcançando os critérios de seleção para dar continuidade aos estudos e também foram submetidas ao ensaio de curva dose-resposta (Figura 10).



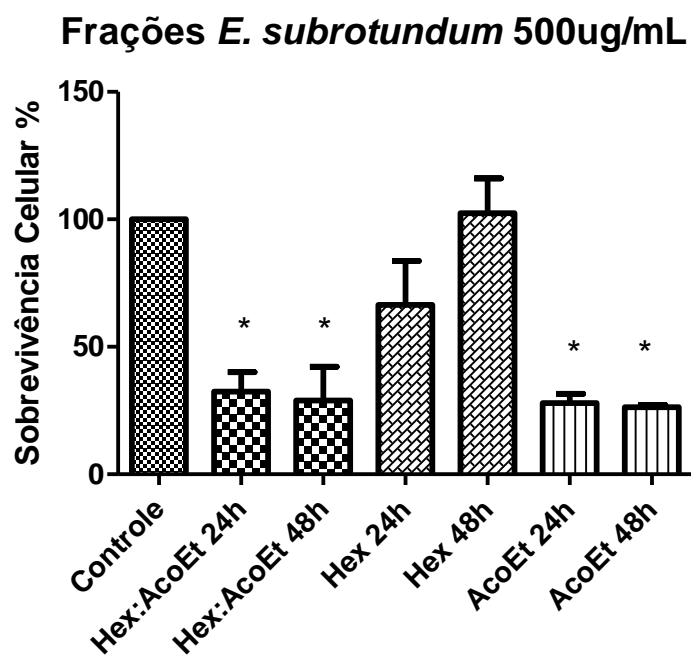


Figura 10. Representação gráfica do efeito citotóxico das frações do extrato hexânico da folha do *Erythroxylum subrotundum*, após 24 e 48 horas de tratamento, na concentração de 500 µg/mL, apresentado sob a forma de inibição percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE FUNGOS DO CERRADO EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA.

Os extratos de fungos endofíticos extraídos da *Bauhinia variegata* foram testados na concentração de 500µg/mL e avaliados quanto ao efeito citotóxico. Os fungos identificados como 03 e 09 apresentaram o efeito desejado, diferentemente dos extratos da espécie vegetal da qual foram extraídos, e, portanto, foram submetidos ao teste de curva dose-resposta (Figura 11).

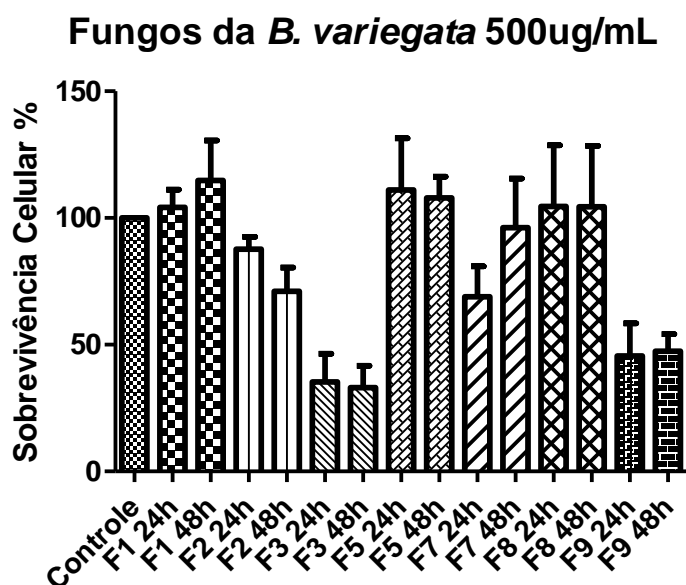


Figura 11. Representação gráfica do efeito citotóxico dos extratos de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*, após 24 e 48 horas de tratamento, na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , apresentado sob a forma de inibição percentual da viabilidade celular em relação ao controle sem tratamento, determinado por One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Onde: F1 – Fungo 1; F2 – Fungo 2; F3 – Fungo 3; F5 – Fungo 5; F7 – Fungo 7; F8 – Fungo 8; F9 – Fungo 9.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DOS EXTRATOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGEM CELULAR DE FEOCROMOCITOMA

Os extratos selecionados nos ensaios de citotoxicidade (Tabela 2) foram submetidos ao ensaio de curva-dose resposta nas concentrações de 125 a 2000  $\mu\text{g/mL}$  para avaliar seu efeito dose-dependente e determinar a  $\text{IC}_{50}$ . Foram selecionados 14 dentre os 55 extratos de plantas de Cerrado rastreados inicialmente, duas frações de *Erythroxylum subrotundum* e dois extratos de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*, totalizando 18 extratos analisados nessa etapa.

Tabela 2. Extratos de espécies vegetais e fungos do cerrado com efeito citotóxico em linhagem celular de feocromocitoma (n=18)

Espécie de Planta	Parte de Planta	Solvente
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C	Folha	E, H
	Caule	E
	Fruto	E, H
Erythroxylaceae		
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Folha	H
	Fração	Hex:AcoEt AcoEt
Fabaceae		
<i>Bauhinia rufa</i>	Folha	H
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	Casca do fruto verde	H
	Fruto	H
	Folha	H
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fruto	E, H
Sapotaceae		
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	Folha	H
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	Folha	H
Fungos Endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i>		
	Fungo	3 9

\* Solventes: A- Aquoso, E- etanólico, H-hexânico, Hex:AcoEt –Hexano: Acetato de Etila, AcoEt: Acetato de Etila

O Maleato de Sunitinib® (Sigma) foi utilizado como controle positivo para o efeito citotóxico na linhagem celular PC-12 Adh. Este efeito descrito por Saito e colaboradores (Saito *et al.*, 2012) apresentou a capacidade de induzir apoptose em 30% das células atuando pelas vias dependentes de tirosina quinase a partir da concentração de  $10^{-6}$ M. Esta concentração foi aumentada nos ensaios para que fosse verificado o efeito de 50% de inibição da viabilidade celular de forma comparativa aos extratos de plantas e fungos.

Inicialmente, foi realizada curva dose-resposta com o Maleato de Sunitinib®, com o objetivo de confirmar os resultados de Saito e colaboradores e para padronização do fármaco como controle positivo nos experimentos desse estudo.

Os resultados obtidos mostraram que a partir da concentração de  $10^{-5}$ M é possível alcançar 50% da inibição da viabilidade celular em 24 horas, porém este efeito é sustentado após 48 horas de ensaio apenas a partir de  $10^{-4}$ M (Figura 12). Para uma estimativa de comparação das curvas de citotoxicidade deste controle positivo com os extratos, foi possível determinar um padrão de citotoxicidade concentração e tempo dependente para o Maleato de Sunitinib®, como esperado para o  $IC_{50}$  de  $10^{-4}$ M.

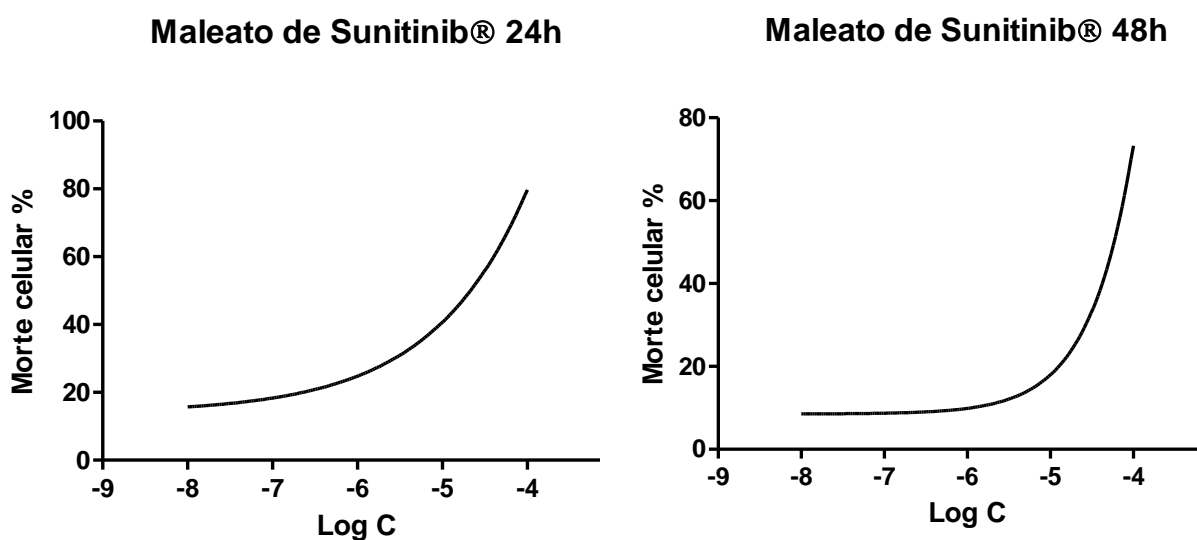


Figura 12. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico induzido pelo tratamento com Maleato de Sunitinib® (Sigma) durante 24 e 48 horas em células de feocromocitoma PC-12 Adh.

Os extratos com efeito citotóxico observado na etapa anterior foram submetidos ao ensaio de curva dose-resposta e os critérios de seleção para a próxima etapa, isto é, para a identificação dos componentes químicos de extratos citotóxicos, foram a reprodutibilidade do efeito, o padrão dose-dependente, a ausência de recuperação significativa da viabilidade celular ao longo do tempo e a possibilidade de definição da  $IC_{50}$ .

Dos 18 extratos em que foram determinadas as curvas-dose resposta, 08 atenderam aos critérios estabelecidos (Tabela 3). Estes 08 extratos, por sua vez, foram testados também para avaliar o efeito citotóxico em linhagem celular não tumoral de queratinócitos humanos HaCat, sob as mesmas condições de ensaio empregadas para a linhagem tumoral PC-12 Adh. Essa análise buscou realizar

comparação da sensibilidade de cada linhagem celular, tumoral e de queratinócitos humanos (epitélio), aos efeitos citotóxicos dos extratos, uma vez que ambas tem alta taxa de proliferação basal e teoricamente podem sofrer os efeitos citotóxicos simultaneamente, num modelo *in vivo*.

. Tabela 3. Extratos de espécies vegetais e fungos do cerrado com efeito dose-dependente em linhagem celular de feocromocitoma (n=8)

Espécie de Planta	Parte da Planta	Solvente
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C	Folha	E
	Fruto	E
Erythroxylaceae		
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Folha	H
	Fração	Hex:AcoEt AcoEt
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	Fruto	H
Fungos Endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i>		
	Fungo	3 9

\* Solventes: A- Aquoso, E- etanólico, H-hexânico, Hex:AcoEt – Hexano:Acetato de Etila, AcoEt: Acetato de Etila

A partir da análise da citotoxicidade em queratinócitos HaCat, foi definido novo critério de seleção, de que a toxicidade observada nessa linhagem não tumoral de queratinócitos fosse semelhante ou inferior à observada na linhagem tumoral. Este critério comparativo entre as linhagens foi proposto como uma predição de possíveis efeitos tóxicos *in vivo*.

Os resultados obtidos mostraram que apenas 04 extratos (*Allamanda blanchetti* folha etanólico, *Allamanda blanchetti* fruto etanólico, *Erythroxylum subrotundum* folha hexânico, e Fração Hex:AcoEt do *Erythroxylum subrotundum*) apresentaram efeito citotóxico em queratinócitos semelhante ou inferior ao verificado em células de feocromocitoma. Esses resultados encontram-se detalhados a seguir.

#### 4.4.1. *Allamanda blanchetti* A.D.C

##### 4.4.1.1. Extrato etanólico da folha da *Allamanda blanchetti* A.D.C

O extrato etanólico da folha da *Allamanda blanchetti* A.D.C apresentou toxicidade entre 20% e 60% nos tempos de análise de 24 horas e 48 horas na linhagem celular de Feocromocitoma, mostrando que seu efeito é mantido de forma semelhante. Os  $IC_{50}$  calculados pelo programa GraphPad Prisma 5® foram de ~242.8  $\mu\text{g/mL}$  e ~93.58  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 13).

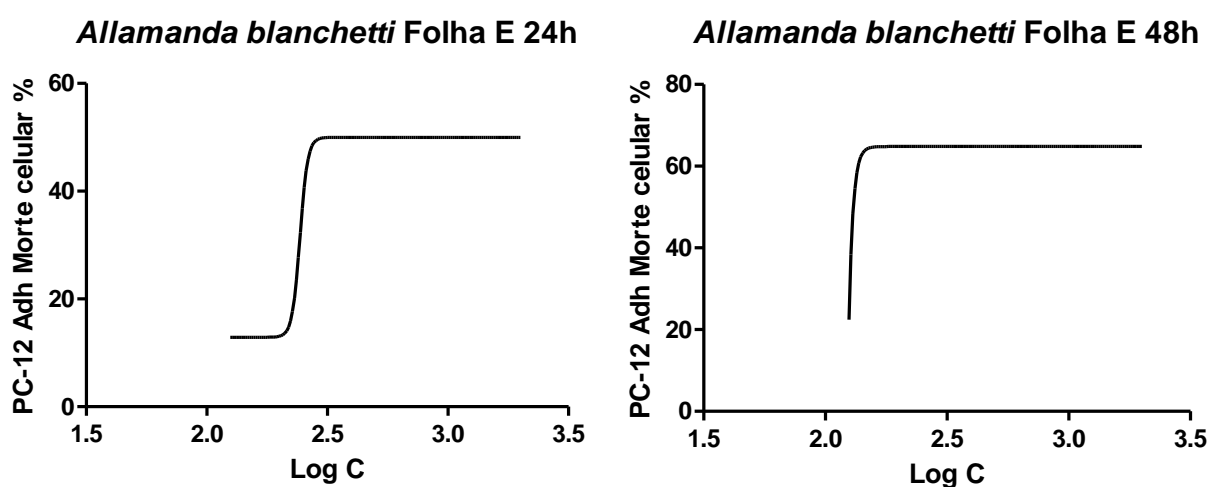


Figura 13. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico da folha da *Allamanda blanchetti* A.D.C com 24 e 48 horas de tratamento em linhagem celular de feocromocitoma, PC-12 Adh.

Para a linhagem celular não tumoral de queratinócitos, este extrato apresentou toxicidade entre 25% e 45% no tempo de análise de 24 horas e entre 45% e 70% em 48 horas. Os  $IC_{50}$  calculados foram de ~563,9  $\mu\text{g/mL}$  e 689,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Assim, observou-se que este extrato apresentou efeito semelhante entre as duas linhagens celulares, porém com valores de  $IC_{50}$  um pouco menores na linhagem tumoral (Figura 14).

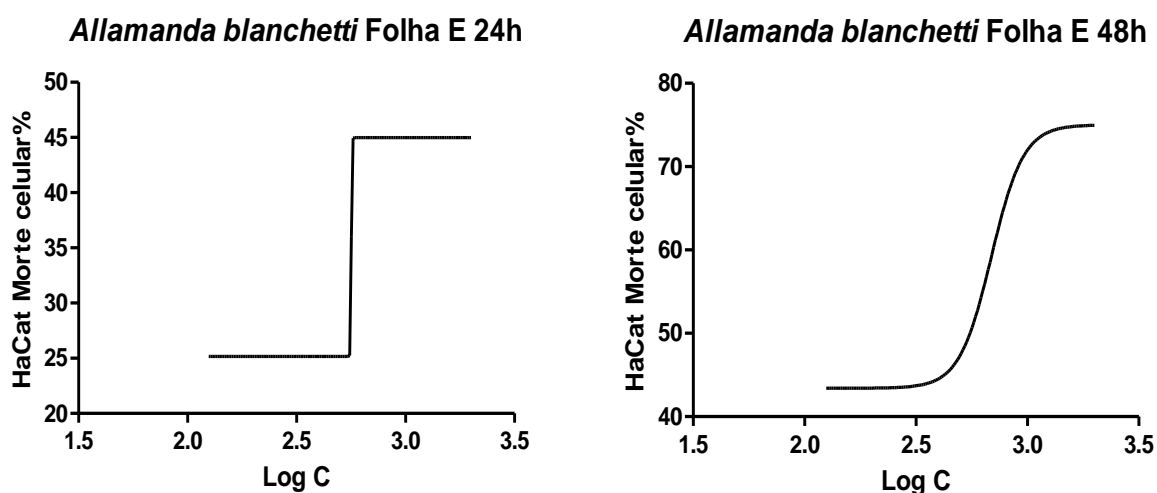


Figura 14. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico da folha da *Allamanda blanchetti* A.D.C em linhagem celular de queratinócitos humanos HaCat

#### 4.4.1.2. Extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C

O extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C apresentou toxicidade entre 30% e 80% no tempo de análise de 24 horas e entre 20% e 70% 48 horas na linhagem celular de Feocromocitoma, com um mínimo decaimento do efeito tóxico. Os IC<sub>50</sub> calculados pelo programa GraphPad Prisma 5® foram de 542.3 µg/mL e 309.9 µg/mL, respectivamente (Figura 15)

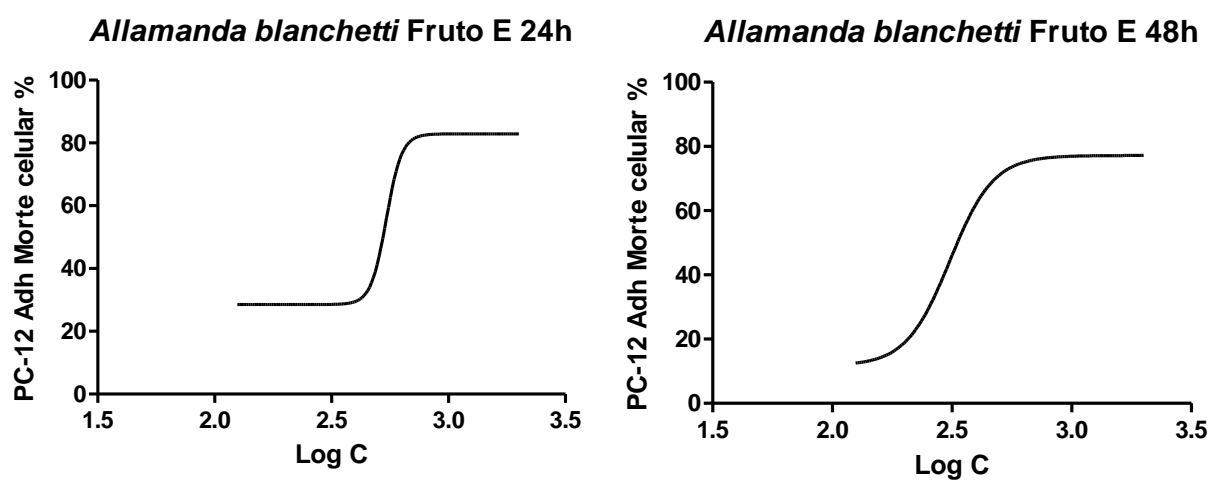


Figura 15. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C em linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh.

Para a linhagem celular não tumoral de queratinócitos, apresentou toxicidade entre 20% e 50% no tempo de análise de 24 horas e entre 10% e 70% em 48 horas. Os IC<sub>50</sub> calculados foram de ~2580 µg/mL para 24 horas de análise e não calculável para 48 horas.

Estes resultados sugerem efeito tóxico superior na linhagem celular tumoral, porém com algum grau de ambiguidade, considerando o formato da curva para o tratamento de 24 horas e a impossibilidade de definição do IC<sub>50</sub> no de 48 horas (Figura 16).

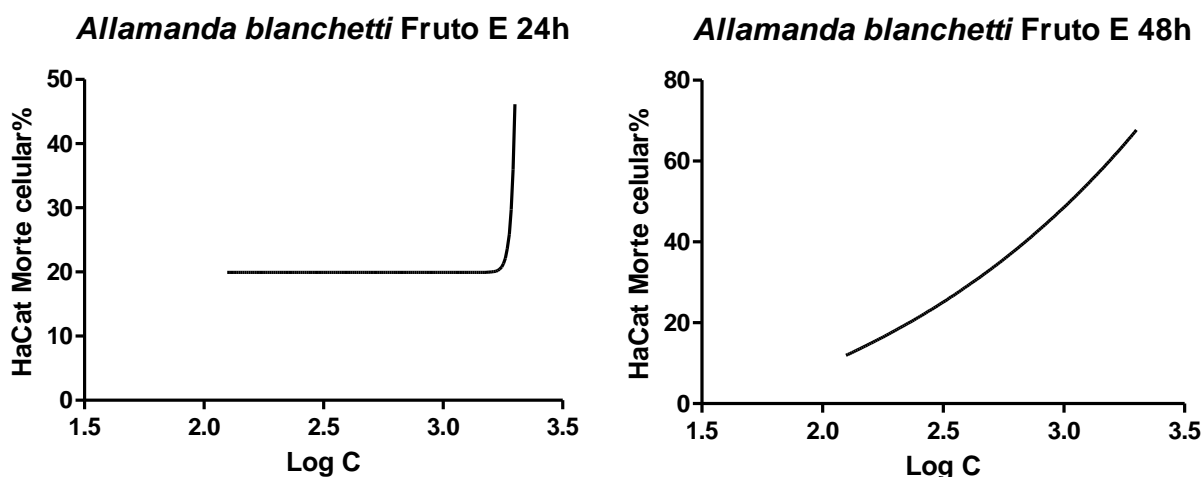


Figura 16. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C em linhagem celular de queratinócito HaCat.

#### 4.4.2. *Erythroxylum subrotundum*

##### 4.4.2.1. Extrato Hexânico da Folha do *Erythroxylum subrotundum*

O extrato hexânico da folha do *Erythroxylum subrotundum* apresentou toxicidade entre 10% e 50% no tempo de análise de 24 horas e entre 0% e 70% em 48 horas na linhagem celular de Feocromocitoma, demonstrando que seu efeito é potencializado com o aumento do tempo nas mesmas concentrações. Os IC<sub>50</sub> calculados pelo programa GraphPad Prisma 5® foram de ~509.7 µg/mL e 795.5 µg/mL, respectivamente (figura 17).



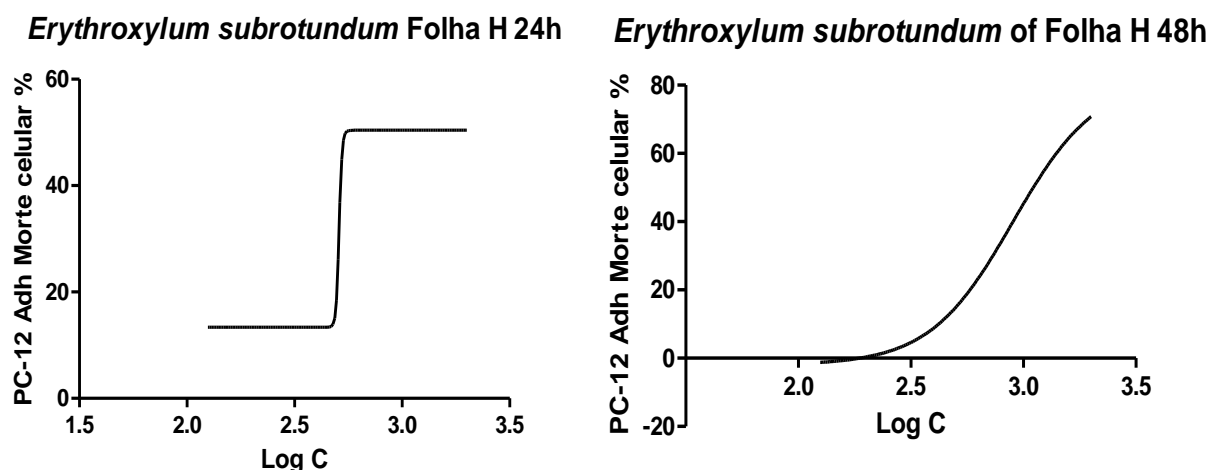


Figura 17. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico da folha do *Erythroxyllum subrotundum* em linhagem celular de feocromocitoma PC12-Adh.

Para a linhagem celular não tumoral de queratinócitos, apresentou toxicidade sem efeito dose-dependente no tempo de análise de 24 horas e entre 40% e 70% em 48 horas. O  $IC_{50}$  calculado para 48 horas foi de  $\sim 941,3 \mu\text{g/mL}$ .

Este extrato demonstrou efeito semelhante entre as duas linhagens celulares em 48 horas, porém não foi possível a comparação para o tempo de 24 horas. Entretanto, os valores de  $IC_{50}$  foram um pouco menores na linhagem tumoral com o tratamento por 48 horas (Figura 18).

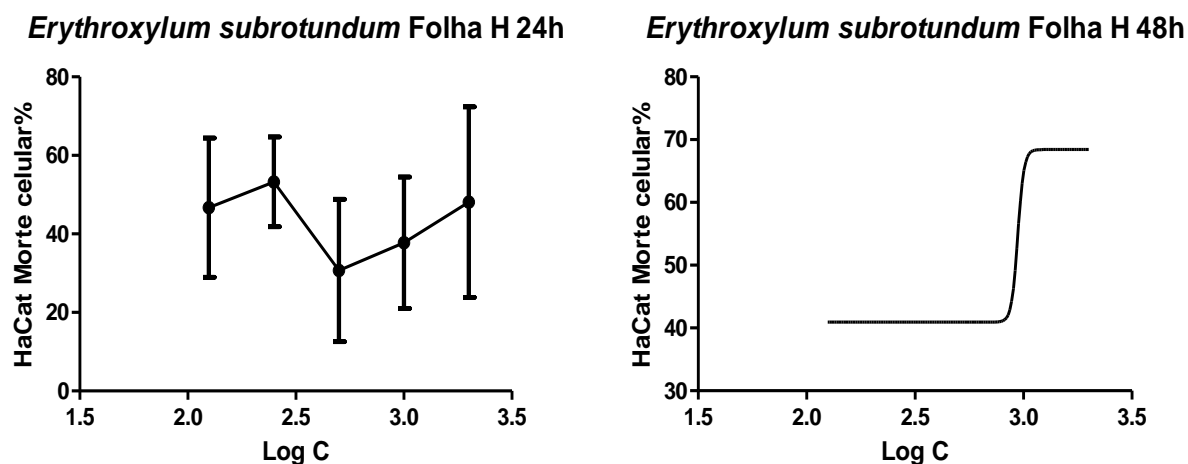


Figura 18. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico da folha do *Erythroxyllum subrotundum* em linhagem celular de queratinócito HaCat.

#### 4.4.2.2. Extrato da Fração Hex:AcoEt do *Erythroxylum subrotundum*

O extrato Fração Hex:AcoEt do *Erythroxylum subrotundum* apresentou toxicidade entre 30% e 60% no tempo de análise de 24 horas e 48 horas na linhagem celular de Feocromocitoma, demonstrando que seu efeito é mantido de forma semelhante. Os  $IC_{50}$  calculados pelo programa GraphPad Prisma 5® foram de 250.7  $\mu\text{g/mL}$  e 291.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 19).

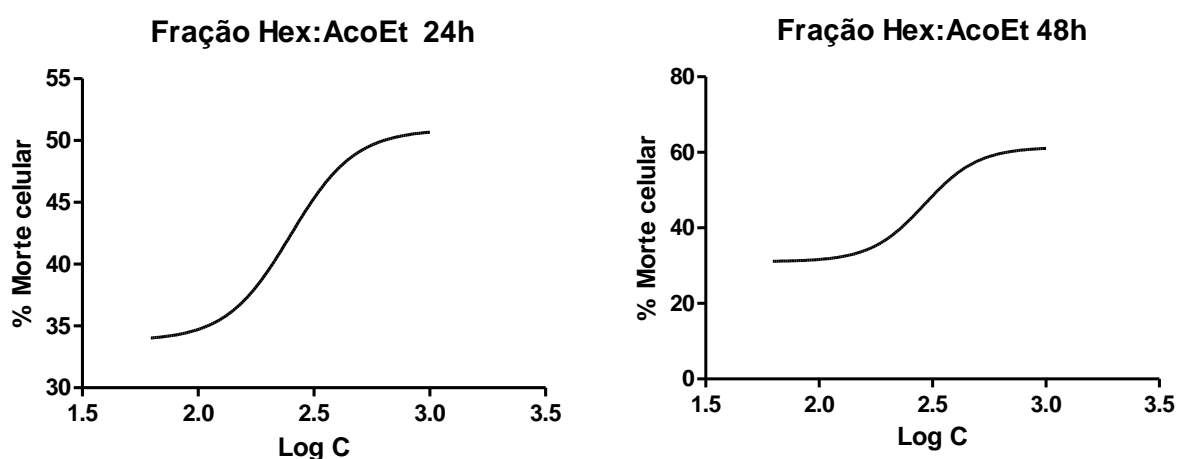


Figura 19. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico da fração Hex:AcoEt do *Erythroxylum subrotundum* em linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh.

Para a linhagem celular não tumoral de queratinócitos, a toxicidade não foi comparável com a célula tumoral, pois não houve efeito dose-dependente reproduzível (Figura 20).

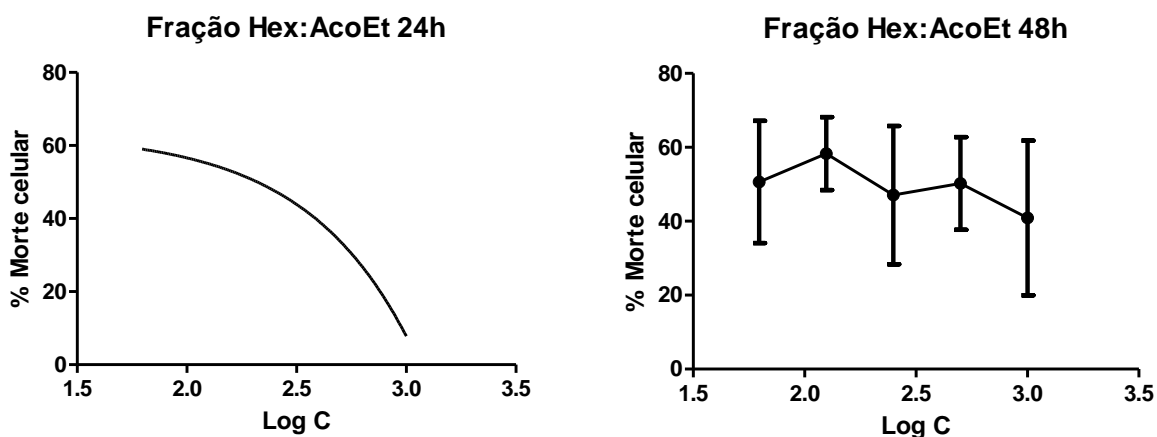


Figura 20. Curvas dose-resposta do efeito citotóxico da fração Hex:AcoEt do *Erythroxylum subrotundum* em linhagem celular de queratinócito HaCat

. Esta fração apresentou resultado muito semelhante ao extrato hexânico da folha do *Erythroxylum subrotundum*, do qual foi obtido, possivelmente contendo os compostos químicos responsáveis pela ação desta planta.

#### 4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS NOS EXTRATOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os extratos que apresentaram efeito citotóxico nas células tumorais, curva dose-resposta adequada e efeito citotóxico semelhante ou inferior nas células não tumorais foram submetidos a testes para identificação dos componentes químicos (Tabela 4)

Tabela 4. Extratos de espécies vegetais com atividade citotóxica avaliada em linhagem celular tumoral de feocromocitoma e não tumoral de queratinócitos (n=4)

Espécie de Planta	Parte da Planta	Solvente	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
			PC-12 Adh	Hacat
Apocynaceae				
<i>Allamanda blanchetti</i> A.D.C	Folha	E	242,8/93,58	563,9/689,5
	Fruto	E	542,3/309,9	2580/ -
Erythroxylaceae				
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Folha	H	509,7/795,5	- /941,3
	Fração	Hex:AcoEt	250,7/291,6	- / -

\* Solventes: E- etanólico, H-hexânico, Hex:AcoEt – Hexano:Acetato de Etila.

Atendendo a esses critérios, os extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* A.D.C foram utilizados nos ensaios de Polifenóis Totais e Flavonóides. Foram construídas curvas de calibração utilizando o Ácido Gálico para os Polifenóis Totais (Figura 21) e a Quercetina para os Flavonóides (Figura 22).

### Curva de Calibração Ácido Gálico

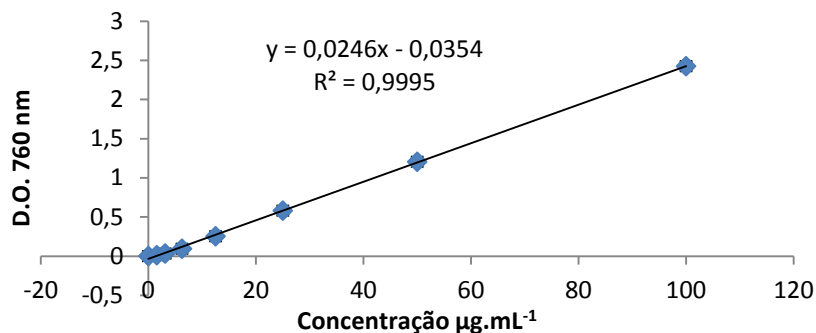


Figura 21. Curva de Calibração do Ácido Gálico para o Teste de Polifenóis Totais

Os extratos etanólicos do Fruto e da Folha apresentaram concentrações de Polifenóis Totais de 126,9 e 227,5 µg EAG/mg, respectivamente.

### Curva de Calibração Quercetina

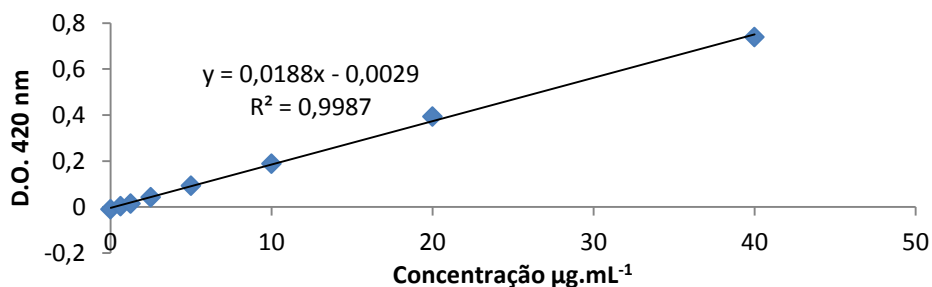


Figura 22. Curva de Calibração da Quercetina para o Teste de Flavonoides

Os extratos diluídos apresentavam a coloração amarelada anteriormente ao teste de ensaio de flavonoides, caracterizando uma possível interferência avaliada com a leitura do extrato e dos reagentes separadamente no mesmo comprimento de onda. Para o ensaio de Flavonoides, os extratos etanólicos do Fruto e da Folha apresentaram concentrações de 2,8 e 9,4 µg de EQ/ mg de extrato, respectivamente.

O extrato etanólico da folha apresentou concentrações superiores em ambos os testes, e sua atividade citotóxica nas células tumorais foi superior ao extrato

etanólico do fruto, podendo haver uma relação entre a concentração dos componentes químicos do extrato e o efeito observado.

O extrato hexânico da folha do *Erytroxylum subrotundum* e sua fração Hex:AcoEt foram utilizados no ensaio de Cromatografia de Camada Delgada. A primeira análise foi realizada para identificação do grupo químico e os dois extratos avaliados apresentaram como componente principal terpenos.

Após esta identificação primária, uma nova cromatografia foi realizada utilizando os padrões de Terpenos disponíveis no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências de Saúde da UnB: Acetato de lupeíla, Acetato de L-amirina, Lupeol,  $\beta$ -friedelinol, Friedelina, Ácido ersólico, Ácido pureônico e Ácido linoleico. O terpeno presente no extrato bruto da folha e em sua fração não correspondeu aos padrões utilizados no ensaio. Assim, torna-se necessária a comparação com outros padrões.

## 5. DISCUSSÃO

O bioma Cerrado possui flora característica e de grande diversidade, que ocupa mais de 02 milhões de quilômetros quadrados da área do Brasil. Número crescente de plantas com potencial terapêutico vem sendo identificadas e representam patrimônio biológico e científico de grande valor para o país (Burman, 1991).

Atualmente, a possibilidade de produção em escala industrial e o uso clínico de quimioterápicos derivados de plantas suportam a existência de projetos para o desenvolvimento de fármacos baseados em produtos naturais. Paclitaxel, Alcaloides da *Vinca* e Etoposídeo são alguns antineoplásicos amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, e constituem moléculas originalmente isoladas a partir de drogas vegetais (Younes, Varella e Suffredini, 2007). Assim, a proposta de desenvolvimento de novos biofármacos com atividade antitumoral tem sido revisitada ao longo da última década. Paralelamente, o maior entendimento dos aspectos moleculares da biologia tumoral traz à tona a grande complexidade estrutural das moléculas que interagem com alvos específicos nas células de mamíferos.

Nesse sentido, a diversidade da flora brasileira em geral, e do Cerrado especificamente, ainda permanece relativamente pouco explorada em comparação à de outras regiões do planeta, como a China e Índia, por exemplo.. Entretanto, observa-se interesse crescente na bioprospecção de biomas brasileiros diante de sua grande diversidade e riqueza de compostos químicos. Assim, programas de rastreamento de plantas com potencial terapêutico têm sido estimulados no Brasil como estratégia para ampliar a identificação de substâncias com atividade terapêutica.

O presente estudo constitui parte de um projeto maior que recebeu o apoio de instituições de pesquisa e saúde nacionais (Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, Fundações de Amparo à Pesquisa - FAPs, Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, dentre outros) e que envolve um conjunto de trabalhos voltados à Bioprospecção do Cerrado para o desenvolvimento de novos fármacos. A partir de um modelo de tumor que vem recebendo interesse e destaque progressivo na

literatura científica internacional, esse estudo engloba os requisitos que o tornam ferramenta importante em consonância com as políticas nacionais atuais. A partir de rastreamento realizado a partir de 65 extratos de plantas e fungos do Cerrado, foi estabelecida atividade citotóxica desses extratos em linhagem celular de feocromocitoma, um modelo raro de tumor, porém com mecanismos de tumorigênese peculiares comuns à vários outras neoplasias malignas. Além disso, os tratamentos disponíveis em nosso país para tumores neuroendócrinos em geral, incluindo o feocromocitoma, ainda são escassos e de eficácia limitada, o que justifica a busca por compostos a partir do patrimônio natural do país.

A partir de uma ampla triagem biológica dos extratos de plantas e fungos do Cerrado para a verificação da atividade antitumoral em linhagem celular de Feocromocitoma, o presente estudo possibilitou a identificação de 03 extratos brutos (Extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* ADC e extrato hexânico da folha do *Erythroxylum subrotundum*) e 01 fração (Fração Hexano:Acetato de Etila do extrato hexânico da folha *Erythroxylum subrotundum*) que foram capazes de induzir inibição da viabilidade celular de forma dose-dependente, *in vitro*.

Os extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* ADC apresentaram efeito dose e tempo dependente nos ensaios de citotoxicidade, com taxa de inibição na concentração máxima da curva dose-resposta de aproximadamente 60 e 80%, respectivamente. Os valores calculados para IC<sub>50</sub> foram menores na linhagem tumoral quando comparada a linhagem não tumoral Hacat, mostrando uma possível seletividade pelo tumor. As concentrações encontradas para a quantificação de polifenóis totais e flavonoides estão em consonância com a literatura, como descrito por Das e colaboradores (2014) que utilizando os mesmos ensaios obtiveram concentrações semelhantes a partir dos extratos etanólicos da folha e da casca da raiz da *Crescentia cujete*.

Observou-se ainda que o extrato etanólico da folha da *Allamanda blanchetti* ADC possuía concentrações mais elevadas de polifenóis e de flavonoides quando comparado ao extrato etanólico do fruto. Este achado, juntamente com o efeito citotóxico superior obtido em concentrações semelhantes e menor concentração do

IC<sub>50</sub>, permite sugerir que os compostos químicos identificados estão relacionados com a inibição da viabilidade celular tumoral.

O extrato hexânico da folha do *Erythroxylum subrotundum* e Fração hexano:acetato de etila apresentaram efeito citotóxico dose e tempo-dependente, com efeito máximo semelhante. Este resultado possibilita propor que esta fração é a responsável pela atividade tumoral.

Observou-se ainda que esses extratos apresentaram aparente maior seletividade na célula tumoral, em relação à linhagem não tumoral de queratinócitos, E ainda, apontou a natureza dos constituintes químicos identificados nestes extratos, que pertencem ao grupo dos flavonoides e dos terpenos, gerando assim informações úteis para estudos futuros que busquem identificação química direta de moléculas associadas à atividade antineoplásica.

Os extratos da *Allamanda blanchetti* ADC e do *Erythroxylum subrotundum* apresentaram uma faixa de ação citotóxica superior ao Maleato de Sunitinib®. Observou-se toxicidade superior em comparação indireta entre as concentrações iniciais e finais entre os extratos e o medicamento. É importante ressaltar ainda que o medicamento teve decaimento do efeito exceto em suas concentrações finais, enquanto a atividade do extrato foi mantida dose e tempo dependente.

Ressalta-se que o feocromocitoma maligno caracteriza-se por grande resistência aos tratamentos citotóxicos tradicionais, e a limitada resposta da linhagem celular ao efeito dos extratos concorda com a observada complexidade das respostas tumorais à terapêutica utilizada na prática clínica e nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

Verificou-se que os extratos etanólicos do fruto e da folha da *Allamanda blanchetti* A.D.C demonstraram atividade antitumoral para feocromocitoma e incluem em sua composição uma alta concentração de flavonoides. Em consonância, Schmidt e colaboradores haviam previamente observado atividade antiproliferativa dos extratos etanólicos da *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* em linhagem celular de Leucemia K562. Nesse trabalho, a citotoxicidade foi superior no extrato da raiz quando comparado aos extratos da folha e caule. O extrato do caule da



*Allamanda schottii* apresentou toxicidade 10 vezes menor na linhagem celular não tumoral de endotélio, de maneira similar aos resultados aqui apresentados para a linhagem de queratinócitos utilizada (Schmidt *et al.*, 2006).

Schmidt e colaboradores também identificou em trabalhos anteriores a presença de lactonas iridóides nestes extratos e especulou que este extrato poderia apresentar altas concentrações de compostos com atividade específica anti-angiogênica, que é essencial para a nutrição e progressão tumoral (Schmidt *et al.*, 2006). Interessantemente, vale ressaltar que o tratamento anti-angiogênico, com inibidores do VEGF, tem sido proposto como nova ferramenta terapêutica alvo-específica para feocromocitomas (Saito *et al.*, 2012).

Por sua vez, o extrato hexânico da folha da *Erythroxylum subrotundum* e sua respectiva Fração Hexano:Acetato de Etila demonstraram atividade antitumoral na linhagem de feocromocitoma, mas não foi encontrada atividade semelhante na literatura descrita para esta espécie. Considerando serem plantas da mesma família, vale mencionar que Prayong e colaboradores identificaram atividade citotóxica na espécie *Erythroxylum cuneatum* para a linhagem tumoral de hepatocarcinoma humano, HepG2. (Prayong, Barusrux e Weerapreeyakul, 2008).

Os demais extratos avaliados, mas que não atenderam a todos os critérios estabelecidos nesta pesquisa, não devem ter sua atividade antitumoral descartada. Pois podem apresentar esta atividade em outras linhagens tumorais.

Conceição e colaboradores identificaram a inibição da proliferação celular placentária com a utilização do extrato do fruto da *Genipa americana* (Da Conceição *et al.*, 2011). Ferreira e colaboradores demonstram que o inibidor de protease extraído da *Bauhinia rufa* pode ser utilizado na semissíntese de um inibidor recombinante com atividade em linhagem celular de próstata andrógeno-dependente (Ferreira *et al.*, 2013). Em conjunto, esses estudos somam informações identificadas a partir de metodologias muito semelhantes à do presente trabalho e que requerem maior detalhamento com vistas à identificação de moléculas com atividade antitumoral.

Como revisado por Zhang vários estudos sugeriram que os alcaloides produzidos pelos fungos endofíticos possuem efeito antimicrobiano, inseticida, citotóxico e anticancerígeno (Zhang *et al.*, 2012). Embora os fungos aqui estudados não tenham apresentado atividade citotóxica significativa e sustentada, outros estudos em outras espécies podem trazer novas contribuições.

É necessário considerar as possíveis limitações dos ensaios aqui realizados, que dizem respeito principalmente à variabilidade intrínseca dos resultados observados com células em cultura. Entretanto, a identificação de 04 extratos com atividade citotóxica dose-dependente e sustentada, e de seus componentes químicos principais, a partir de uma triagem inicial de 65 extratos do Cerrado, torna esse estudo útil para o seguimento de experimentos biomonitorados com os mesmos (Figura 23).

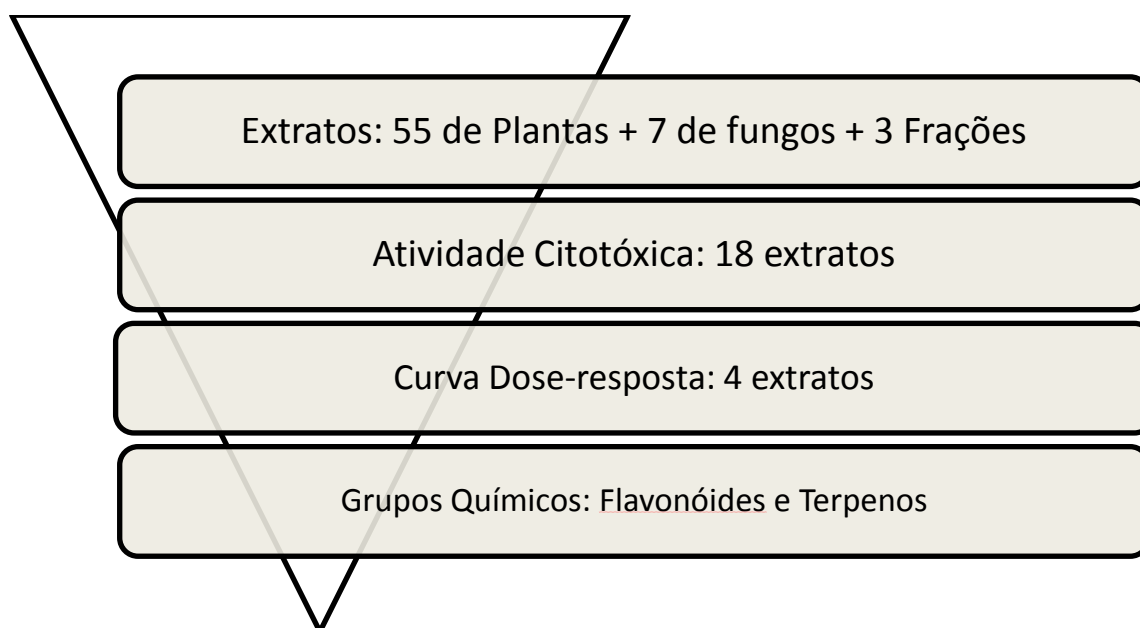


Figura 23. Triagem biológica de plantas e fungos endofíticos do Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma

Outros ensaios e análises poderão ser realizados para a melhor caracterização da atividade antitumoral das espécies do Cerrado no Feocromocitoma. A caracterização do perfil de morte celular, avaliação de potenciais interferências no padrão de secreção de catecolaminas, análise da expressão de genes e/ou proteínas envolvidas na proliferação celular e na angiogênese do tumor

são promissores. E ainda, novos testes e análises para isolamento e identificação dos compostos responsáveis pela atividade antitumoral, desenvolvimento e otimização de técnicas para aumentar o rendimento das extrações a partir de produtos naturais.

## 6. CONCLUSÃO

A investigação da existência de atividade antitumoral de extratos de plantas e fungos do Cerrado em linhagem de células de feocromocitoma é importante para a busca de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do Feocromocitoma.

Os resultados obtidos pela análise da citotoxicidade dos extratos, do efeito dose-dependente, comparação da citotoxicidade em linhagem celular não tumoral e identificação dos componentes químicos nos permitiram concluir:

- Quatorze extratos de espécies de plantas e dois extratos de fungos nativos do Cerrado apresentaram atividade citotóxica em linhagem celular de feocromocitoma;
- Duas frações do extrato hexânico do *Erythoxylum subrotundum* apresentaram atividade citotóxica Cerrado em linhagem celular de feocromocitoma;
- Oito extratos das espécies nativas do Cerrado foram capaz de induzir a morte celular em linhagens de células de feocromocitoma com dose calculável;
- Os extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* ADC, e o extrato hexânico da folha do *Erythoxylum subrotundum* e sua fração Hexano:Acetato de Etila apresentaram atividade citotóxica semelhante ou inferior de em linhagem celular não tumoral;
- Os extratos etanólicos da folha e do fruto da *Allamanda blanchetti* ADC apresentaram concentrações elevadas de flavonoides, e o extrato hexânico da folha do *Erythoxylum subrotundum* e sua fração Hexano:Acetato de Etila apresentaram a presença de terpenos, como grupos químicos possivelmente responsáveis pela atividade antitumoral.

## 7. REFERÊNCIAS

ADLER, J. T. et al. Inhibition of the PI3K pathway suppresses hormonal secretion and limits growth in pheochromocytoma cells. **World journal of surgery**, v. 33, n. 11, p. 2452-2457, 2009. ISSN 0364-2313.

AITA, Y. et al. Sunitinib inhibits catecholamine synthesis and secretion in pheochromocytoma tumor cells by blocking VEGF receptor 2 via PLC- $\gamma$ -related pathways. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 8, p. E1006-E1014, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P. D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006. ISSN 0102-695X.

BESSA, N.G.F. de et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Res. Bras. Pl. Med**, v.15, n.4, supl. I, p.692-707, 2013.

BURMAN, A. Saving Brazil Savannas. **New Scientist**, v. 129, n. 1758, p. 30-34, 1991. ISSN 0262-4079.

CAMACHO, P. M. G., HOSSEIN. SIZEMORE, GLEN W. **Endocrinologia Baseada em Evidências**. 2 Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008. ISBN 9788536313764.

CASCÓN, A.; TENNANT, D. A. From Transcriptional Profiling to Tumor Biology in Pheochromocytoma and Paraganglioma. **Endocrine Pathology**, p. 1-6, 2012. ISSN 1046-3976.

CHO, S. G. et al. Kisspeptin-10, a KISS1-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 7062-7070, 2009. ISSN 0008-5472.

CRONA, J. et al. Integrative Genetic Characterization and Phenotype Correlations in Pheochromocytoma and Paraganglioma Tumours. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86756, 2014. ISSN 1932-6203.

DA CONCEIÇÃO, A. O. et al. Genipa americana (Rubiaceae) Fruit Extract Affects Mitogen-Activated Protein Kinase Cell Pathways in Human Trophoblast-Derived

BeWo Cells: Implications for Placental Development. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 5, p. 483-494, 2011. ISSN 1096-620X.

DAS, N. et al. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15:45, 2014.

DE SOUZA, P. M. et al. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta medica**, v. 78, n. 04, p. 393-399, 2012. ISSN 0032-0943.

FAVIER, J. et al. Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. **The American journal of pathology**, v. 161, n. 4, p. 1235-1246, 2002. ISSN 0002-9440.

FERNÁNDEZ, M. C. et al. Igf-I regulates pheochromocytoma cell proliferation and survival in vitro and in vivo. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3724-3734, 2012. ISSN 0013-7227.

FERREIRA, J. G. et al. The impaired viability of prostate cancer cell lines by the recombinant plant kallikrein inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13641-13654, 2013. ISSN 0021-9258.

GEORGETTI, S. R. et al. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006. ISSN 0939-6411.

GREENSPAN, F.. **Basic & clinical endocrinology**. New York: McGraw-Hill, 2004. ISBN 0071402977 9780071402972.

HATA, J. et al. Sunitinib for refractory malignant pheochromocytoma: two case reports. **International urology and nephrology**, p. 1-4, 2014. ISSN 0301-1623.

IKEDA, T. et al. Inhibition of Autophagy Enhances Sunitinib-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma PC12 cells. **Journal of pharmacological sciences**, v. 121, n. 1, p. 67-73, 2013. ISSN 1347-8613.

JAFRI, M.; MAHER, E. R. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: The genetics of pheochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing. **European Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 151-158, 2012. ISSN 0804-4643.

JUNQUEIRA, L. C.. **Histologia basica : texto, atlas**. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2004.

KANTOROVICH, V.; KING, K. S.; PACAK, K. SDH-related pheochromocytoma and paraganglioma. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 415-424, 2010. ISSN 1521-690X.

KAPPES, A. et al. Lithium ions: a novel treatment for pheochromocytomas and paragangliomas. **Surgery**, v. 141, n. 2, p. 161-165, 2007. ISSN 0039-6060.

KARASEK, D.; FRYSAK, Z.; PACAK, K. Genetic testing for pheochromocytoma. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 6, p. 456-464, 2010. ISSN 1522-6417.

KORPERSHOEK, E.; PACAK, K.; MARTINIOVA, L. Murine Models and Cell Lines for the Investigation of Pheochromocytoma: Applications for Future Therapies? **Endocrine Pathology**, p. 1-12, 2012. ISSN 1046-3976.

KRONENBERG, H. W. R. H. **Williams tratado de endocrinología**. Barcelona: Saunders, 2008. ISBN 9788480863773 8480863773.

MOLATORE, S. et al. Pheochromocytoma in rats with multiple endocrine neoplasia (MENX) shares gene expression patterns with human pheochromocytoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 43, p. 18493-18498, 2010. ISSN 0027-8424.

NEMOTO, K. et al. Sunitinib treatment for refractory malignant pheochromocytoma. **Neuro endocrinology letters**, v. 33, n. 3, p. 260-264, 2011. ISSN 0172-780X.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 2, p. 108-111, 2005. ISSN 0927-7765.

PHAN, C.-W. et al. Pleurotus giganteus (Berk.) Karunarathna & KD Hyde: Nutritional value and in vitro neurite outgrowth activity in rat pheochromocytoma cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 102, 2012. ISSN 1472-6882.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7, p. 598-601, 2008. ISSN 0367-326X.

SAITO, Y. et al. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 302, n. 6, p. E615-E625, 2012. ISSN 0193-1849.

SANDGREN, J. et al. Integrative epigenomic and genomic analysis of malignant pheochromocytoma. **Experimental & molecular medicine**, v. 42, n. 7, p. 484-502, 2010. ISSN 1226-3613.

SCHMIDT, D. D. F. N. et al. Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of Allamanda blanchetti and A. schottii on the growth of leukemic and endothelial cells. **J Pharm Pharm Sci**, v. 9, p. 200-208, 2006.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. Florianópolis, SC: Editora da UFSC : Ed. da UFRGS, 2003. ISBN 8570256825 9788570256829.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007. ISSN 1807-5932.

YUAN, W. et al. Overexpression of ERBB-2 was more frequently detected in malignant than benign pheochromocytomas by multiplex ligation-dependent probe amplification and immunohistochemistry. **Endocrine-related cancer**, v. 15, n. 1, p. 343-350, 2008. ISSN 1351-0088.

ZHANG, Y. et al. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. **Natural product communications**, v. 7, n. 7, p. 963-968, 2012. ISSN 1934-578X.



ZHU, F. et al. Drug Discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. **PLoS ONE**, v.7, n.7, e39782. 2012.

ZIEGLER, C. G. et al. Anti-tumor effects of peptide analogs targeting neuropeptide hormone receptors on mouse pheochromocytoma cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 371, n. 1, p. 189-194, 2013. ISSN 0303-7207.

