

SARA SOFIA PAULISTA SILVA DA ROSA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-TUMORAL DOS COMPOSTOS
DITERPÉNICOS PARVIFLORONA D E 7 α -
ACETOXI-6 β -HIDROXIROILEANONA**

Prof. Orientador: Doutora Ana Sofia Fernandes



Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2014

SARA SOFIA PAULISTA SILVA DA ROSA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTI-TUMORAL DOS COMPOSTOS
DITERPÉNICOS PARVIFLORONA D E 7 α -
ACETOXI-6 β -HIDROXIROILEANONA**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas no Curso de Mestrado Integrado em
Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias.

Prof. orientador: Doutora Ana Sofia Fernandes



Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2014

*O que prevemos raramente
ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.*

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi desenvolvida na base de um projeto de investigação nas áreas da Farmacologia e Toxicologia aplicada ao cancro da mama. Resultou de um conjunto de esforços por parte de várias pessoas que contribuíram para a sua realização e sem as quais teria sido mais difícil chegar ao fim desta etapa que representa um importante marco na minha vida tanto a nível pessoal como profissional. Desta forma, manifesto a minha gratidão a todos aqueles que estiveram presentes durante a elaboração desta dissertação.

À minha orientadora, a Professora Doutora Ana Sofia Fernandes, por quem tenho enorme gratidão por me dado a oportunidade de entrar no mundo da investigação, que permitiu que desenvolvesse o meu interesse na área. Agradeço por toda a ajuda, motivação, disponibilidade e partilha de conhecimentos durante toda a fase deste projeto de investigação.

Aos professores, Doutora Vera Correia, Doutor Nuno Saraiva e Doutora Isabel Ribeiro por todo o apoio prestado no desenvolvimento deste projeto de investigação.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, em especial à Ana Catarina Flório e Catarina Filipe por toda a boa disposição e ajuda prestada.

Aos meus amigos, por terem estado sempre presentes nas experiências vividas nestes últimos cinco anos, por toda a força, apoio e motivação e por sempre acreditarem nas minhas capacidades para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Hugo por todo o apoio, força e carinho incondicional demonstrado ao longo deste percurso.

Aos meus pais e avós por terem estado sempre presentes, por terem acreditado no meu sucesso e terem sempre uma palavra amiga nos momentos mais complicados. Um obrigado especial aos meus pais por sempre terem acreditado em mim e terem investido no meu futuro para que eu pudesse concluir o meu curso superior.

A todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente ao longo deste percurso académico.

RESUMO

Os produtos naturais são compostos utilizados no desenvolvimento e conceção de inúmeros produtos farmacêuticos sendo uma fonte de inspiração na maioria dos fármacos hoje em dia aprovados.

Neste trabalho experimental, foram avaliadas a atividade antioxidante e anti-tumoral de dois compostos diterpénicos, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona. A nível da atividade antioxidante, realizaram-se três ensaios. Primeiro foi avaliada a capacidade de eliminação do radical DPPH, no qual se verificou que a Parviflorona D era muito mais ativa que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, possuindo portanto uma atividade antioxidante mais notória. No segundo ensaio foi avaliada a capacidade de degradação do peróxido de hidrogénio. Foi testada a Parviflorona D, a qual se verificou que não exercia efeito a este nível. O último ensaio foi realizado utilizando técnicas de eletroforese e teve como objetivo avaliar a capacidade da Parviflorona D para proteger o DNA de lesões oxidativas. Verificou-se que a Parviflorona D exerce efeito neste âmbito, o que poderá ser vantajoso a nível da sua atividade antioxidante.

Numa segunda parte foi avaliada a capacidade anti-tumoral dos mesmos compostos, utilizando um modelo *in vitro* com células de cancro da mama humanas MDA-MB-231. Através da técnica de Cristal Violeta, realizaram-se curvas de citotoxicidade nas quais se verificou que a Parviflorona D era mais ativa que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e, como tal, foi selecionada para a realização de outros estudos. Nesta sequência, foram então realizados ensaios que avaliaram a sua ação ao nível da migração e invasão celular. Os resultados obtidos sugerem que a Parviflorona D exerce efeito significativo ao nível destes dois processos. Procedeu-se ainda ao estudo do efeito deste composto, quando utilizado em conjunto com Doxorrubicina, que poderia ser vantajoso para co-tratamentos. No entanto, verificou-se que a Parviflorona D não exercia efeito sinergista quando em conjunto com este anti-tumoral. Neste âmbito foi ainda avaliado se a atividade anti-tumoral da Parviflorona D era devida ao ataque às ligações fosfodiéster do DNA. Após a realização de um ensaio utilizando o plasmídeo PuC18, verificou-se que a forma superenrolada do DNA se mantinha após exposição à Parviflorona D, o que significa que a sua atividade anti-tumoral não poderá ser explicada por este mecanismo.

Assim, a importância deste trabalho concentra-se essencialmente no estudo de duas vertentes diferentes destes dois compostos naturais, cuja ação poderá ser vantajosa em tratamentos futuros no cancro de mama.

Palavras chave: Cancro de mama; atividade anti-tumoral; atividade antioxidante; Parviflorona D; 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona

ABSTRACT

Natural products are chemical compounds that may be found in nature or are produced by living organisms and can have biological or pharmacological activity. These compounds are used for conception or discovery of numerous pharmaceutical products being a source of inspiration in most drugs approved today.

In this experimental work the antioxidant and anti-tumor activity of two diterpene compounds, Parvifloron D and 7 α -acetoxi-6 β -hydroxyroyleanone were evaluated. To characterize their antioxidant activity three tests were performed. The first test aimed to evaluate the ability of DPPH scavenging and revealed that Parvifloron D is much more active than 7 α -acetoxi-6 β -hydroxyroyleanone, having therefore a most remarkable antioxidant activity. In the second trial the capability of hydrogen peroxide degradation was evaluated and it was found that the Parvifloron D does not possess this effect. Finally, a test with pUC18 plasmid was performed to evaluate the protective capacity of parvifloron D against ROS-induced DNA damage. Parvifloron D had a protective effect, which may be advantageous in terms of its antioxidant activity.

In a second stage we studied the antitumor capacity of the same compounds using the *in vitro* model MDA-MB-231 human breast cancer cells. From the cytotoxicity curves obtained using the Crystal Violet technique, it was found that the Parvifloron D was much more cytotoxic than 7 α -acetoxi-6 β -hydroxyroyleanone. Therefore, it was selected for further studies. Subsequently, assays were performed to evaluate its action at the level of cell migration and invasion. The results suggested that Parvifloron D has effects on these mechanisms. Also, we studied the effect of this compound when used in combination with an existing cytotoxic agent, Doxorubicin that may be advantageous for future co-treatments. It was found that Parvifloron D does not exert synergistic effect when combined with this cytotoxic agent. It was also evaluated whether the anti-tumor activity Parvifloron D shown in previous tests was due to attacks on the DNA phosphodiester bonds. After performing a test with pUC18 plasmid it was found that the supercoiled form of DNA remained unchanged upon Parvifloron D exposure, which means that its anti-tumor activity could not be explained by this mechanism.

The importance of this work is thus based on the study of two different aspects of these two natural compounds, whose action can be advantageous in future treatments of breast cancer.

Keywords: Breast cancer; anti-tumor activity; antioxidant activity; Parvifloron D; 7 α -acetoxi-6 β -hydroxyroyleanone

ABREVIATURAS

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DPPH- Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FBS –Soro bovino fetal

MDA-MB-231 – Células epiteliais de tecido humano de adenocarcinoma mamário metastizado

HO $\cdot$ - Radical Hidroxilo

PBS- Tampão fosfato salino

RNS- Espécies reativas de azoto

ROS- Espécies reativas de oxigénio

RPM- Rotações por minuto

TBE- Solução tampão Tris-Borato-EDTA

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona.....	12
1.2. Stress oxidativo e atividade antioxidante	13
1.3. Cancro de mama e abordagens terapêuticas emergentes	17
2. OBJETIVO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Compostos utilizados	20
3.2 Ensaio DPPH	20
3.3 Ensaio de degradação do peróxido de hidrogénio	20
3.4 Mecanismo lesão/proteção do DNA	21
3.5 Cultura e manutenção de células MDA-MB-231	22
3.6 Ensaio Cristal Violeta	22
3.7 Ensaio quimiotaxia e quimioinvasão	23
4. RESULTADOS OBTIDOS	25
4.1. Atividade Antioxidante	25
4.1.1. Atividade sequestradora do radical DPPH.....	25
4.1.2. Ensaio Degradação do peróxido de hidrogénio.....	25
4.1.3. Proteção da lesão oxidativa do DNA.....	26
4.2. Atividade Anti-tumoral	28
4.2.1. Viabilidade celular	28
4.2.2. Quimiotaxia e quimioinvasão	29

4.2.3. Lesão do DNA.....	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1- Estrutura química da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona.....	12
Fig. 2- Estrutura química da Parviflorona D	12
Fig. 3- Esquema das reações de Fenton e Haber Weiss.....	14
Fig. 4- Representação esquemática do ensaio de quimiotaxia e quimioinvasão...	23
Fig. 5- Capacidade antioxidante da Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona face ao radical DPPH	25
Fig. 6- Estudo da capacidade de degradação do Peróxido de Hidrogénio pela Parviflorona D	26
Fig. 7- Avaliação dos danos no DNA através da análise da quebra de ligações do DNA	27
Fig. 8- Efeito da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e Parviflorona D na viabilidade das células MDA-MB-231	28
Fig. 9- Efeito da Parviflorona D na migração e invasão das células MDA-MB-231	29
Fig. 10- Potencial efeito da Parviflorona D para provocar lesões no DNA.....	30

I. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos em estudo- Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona

Os compostos em estudo, 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Fig.1) e Parviflorona D (Fig.2) são diterpenos abietanos extraídos de espécies de *Plectranthus*, pertencente à família Lamiaceae. Este gênero encontra-se largamente distribuído na África tropical e subtropical, Ásia e Austrália e envolve cerca de 300 espécies. ^[1]

Relativamente à espécie *Plectranthus grandidentatus*, de onde se extrai a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, sabe-se que os seus maiores constituintes são os diterpenóides, Barbatusina, ciclobutatusina, 6 α -Hidroxicarnosol, barbatusol, plectrina, cariocol, coleonon E, coleon F, plectrinona A, plectrinona B, e 12,9(10,20)-abeo-abieta-8,11,13-trien-10,11,12-triol, óleos essenciais (extraídos da planta com a função de aromatizantes em certos produtos e cosmética) e compostos fenólicos. ^[1]

A Parviflorona D, por sua vez é extraída de *Plectranthus ecklonii*, uma espécie com ampla distribuição em *Somerset East* em *Eastern Cape*, uma província sul africana. Está limitada a florestas costeiras subtropicais húmidas. Tradicionalmente é utilizada no sul de África no tratamento de dores de estômago, náuseas, vômitos e meningite. ^[2]

Os diterpenos são metabolitos secundários dos terpenos, compostos por 20 átomos de carbono, o que corresponde a 4 unidades de isopreno. Estes derivam do 2E,6E,10E geranilgeranilpirofosfato. São substâncias naturais e muito comuns em plantas e fungos, sendo no entanto também sintetizadas por certos animais marinhos e insetos. ^[3]

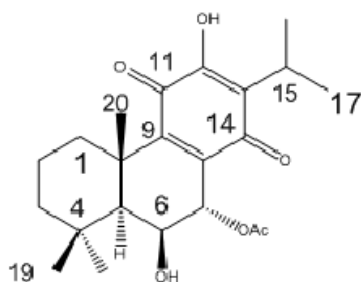


Fig.1 Estrutura química da 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona

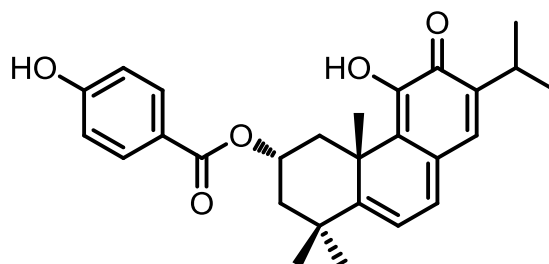


Fig.2 Estrutura química da Parviflorona D

1.2. Stress oxidativo e antioxidantes

O stress oxidativo descreve-se como um desequilíbrio que ocorre no estado redox de um determinado sistema, no qual o potencial oxidante prevalece sobre as moléculas antioxidantes, determinando assim um aumento da disponibilidade de espécies reativas de oxigénio (ROS), que em consequência lesam os vários componentes celulares conduzindo a vários processos fisiopatológicos. Este aumento da biodisponibilidade das espécies reativas pode ser devido ao aumento da sua formação, comprometimento do sistema anti-oxidante ou mesmo ambas as situações. ^[4] As ROS são espécies transientes que contém oxigénio com elevada reatividade química que podem ser radicais livres, isto é, espécies químicas com um ou mais eletrões desemparelhados ou derivados não radicalares. Entre estas espécies está incluído o anião superóxido, o radical hidroxilo, peróxido de hidrogénio, singleto de oxigénio, radicais alcóxido e peróxido, de entre as quais se destacam o anião superóxido e o radical hidroxilo devido à relevância que apresentam a nível biológico. As ROS podem ter origem no metabolismo celular, produzidas maioritariamente na respiração mitocondrial mas podem também surgir como resultado da ação de oxidases intra e extracelulares; processos de defesa celular; peroxissomas e lipoperoxidação ou ainda da ação de agentes externos como a radiação ou xenobióticos. ^[5] Das várias ROS, o peróxido de hidrogénio destaca-se pela relevância biológica, nomeadamente na sinalização celular. Apesar de não ser um radical livre, está envolvido de uma forma direta ou indireta em diversas patologias. O peróxido de hidrogénio forma-se *in vivo*, no decurso de diversos processos metabólicos, nomeadamente através da ação de diversas enzimas como a glucose oxidase ou as superóxido dismutases. O seu poder reativo é fraco, no entanto exerce um papel importante no stress oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares com facilidade, e por poder gerar o radical hidroxilo ($\bullet$ OH). Esta reação pode advir da exposição à luz ultra violeta ou interações com metais de transição, como o ferro. O ferro tem propriedades de transferência de O_2 que potenciam a atividade do peróxido de hidrogénio, um oxidante bastante conhecido e envolvido no stress oxidativo. Além disso possui um forte poder catalisador com capacidade de gerar radicais hidroxilo altamente reativos que perturbam a homeostase celular. A reação de Fenton (fig.3) descreve o processo acima descrito. ^[6]

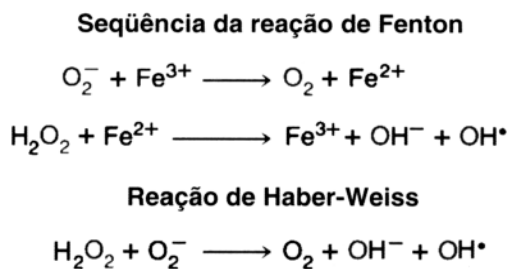


Fig.3- Reações de Fenton e Haber-Weiss

Ao longo da evolução, os seres vivos foram desenvolvendo determinados mecanismos de defesa no que diz respeito ao stress oxidativo, de forma a assegurar a sua sobrevivência. Este sistema de defesa permite, em condições normais, que as ROS e os produtos que resultam das suas reações bioquímicas sejam neutralizados em moléculas inócuas para o organismo. Assim, a produção de ROS é contrabalançada por um complexo sistema antioxidante. ^[7] Este sistema antioxidante natural consiste numa organização complexa bioquímica, que está disposta de acordo com os compartimentos intra e extracelular, e da qual faz em parte uma grande quantidade de enzimas e moléculas antioxidantes. As três principais enzimas antioxidantes incluem as superóxido dismutases, a catalase e as glutathione peroxidases. Por outro lado, as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem a ligação de proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina a iões metálicos pró-oxidantes como o Ferro ou Cobre; proteção da agressão a macromoléculas por proteínas de stress ou choque térmico e a redução de radicais livres por eletrodadores como a glutathione, Vitaminas E e C, bilirrubina e ácido úrico. ^[8] Estes mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos podem ter origem em fontes endógenas ou exógenas e atrasam ou previnem de modo significativo a oxidação um substrato que seja oxidável. ^[9]

Muitas evidências científicas indicam que o *stress* oxidativo está envolvido em diversas patologias (ex. cancro, doenças inflamatórias, cardiovasculares, respiratórias, oculares, neurodegenerativas etc.), assim como nos mecanismos de toxicidade de muitos xenobióticos e no processo de envelhecimento. Este facto justifica o interesse generalizado pela procura de novos antioxidantes com potencial ação terapêutica. ^[10]

As ROS podem causar danos nos tecidos pela reação com os lípidos nas membranas celulares, nucleótidos no DNA, grupos sulfidril nas proteínas e fragmentação das proteínas ribonucleicas levando a fenómenos como instabilidade cromossómica, mutações ou alterações nas membranas celulares podendo provocar cancro. Assim, é aceite que uma das causas do

cancro sejam os danos provocados no DNA pelas ROS. Estas danificam o DNA e a divisão celular através de mecanismos que levam à não reparação do DNA ou ao seu desemparelhamento, provocando mutações. As mutações causadas pela oxidação do DNA envolvem uma gama de purinas e pirimidinas especificamente oxidadas, locais alcalinos lábeis (Incluindo locais apurínicos ou apirimidínicos, que surgem da perda ou danificação de uma base levando à perda de um açúcar na sua estrutura) ^[12], rutura nos filamentos individuais e instabilidade criada diretamente ou através de processos de reparação que são inibidos. ^[13] As quatro bases que constituem o DNA são alteradas pelas ROS, no entanto as mutações estão mais fortemente envolvidas com a modificação do par de bases guanina/citosina. Estas mutações incluem maioritariamente substituições no par de bases, enquanto que inserções ou deleções ocorrem com maior raridade. Em tumores humanos, as transversões de guanina em tirosina no gene supressor p53 são as mutações mais frequentes que podem levar à indução ou progressão do fenómeno oncológico. Assim, um elevado número de alterações nas bases, num tecido canceroso pode estar associado à produção de maiores quantidades de peróxido de hidrogénio, que por sua vez pode ser encontrado em células tumorais. ^[11]

Alguns danos oxidativos a nível do DNA podem estar envolvidos no desenvolvimento do cancro da mama. O aumento, no estado estacionário, de danos nas bases de DNA devido ao ataque de HO^{*} foi verificado em doenças inflamatórias mamárias onde ocorreu posteriormente progressão maligna. O elevado nível de 8-oxo-2'-deoxiguanosina, o maior produto resultante da oxidação do DNA, exerce um papel fundamental no cancro de mama existindo também evidências da sua progressão para metástases. No caso do carcinoma em células hepáticas, este está associado a infeções crónicas provocadas pela hepatite B ou C, vírus ou ingestão de aflatoxinas. O stress oxidativo induzido por estes vírus representa uma das causas a nível intracelular que leva à formação do carcinoma hepatocelular. A transição de guanina em tirosina foi mostrada como sendo um dos tipos mais comuns de mutações produzidas pelas lesões de aflatoxinas e ROS que danificam o DNA. Neste tipo de carcinoma, ocorre a acumulação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, um biomarcador quer do stress oxidativo quer de carcinogénese. Os níveis elevados de danos no DNA e mutações no fígado humano como persistência de hepatites crónicas podem ser fatores preditivos para o desenvolvimento do cancro no fígado. ^[11]

Um outro tipo de carcinoma bastante associado às ROS é o cancro do pulmão, que cuja principal causa é o fumo do tabaco. Este é bastante rico em carcinogêneos como as nitrosaminas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que causam a acumulação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina. Os pulmões de um fumador contêm duas ou três vezes mais quantidades desta substância que pode levar a mutações muitas vezes induzidas por radicais de oxigénio livres, resultando em processos inflamatórios, fibrose e desenvolvimento de tumores. A urina dos fumadores contêm também entre quatro a dez vezes mais alterações em nucleótidos provocadas pelas ROS. Os níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina na urina podem constituir biomarcadores do stress oxidativo, cancro, arteriosclerose e diabetes. ^[11]

Vários estudos epidemiológicos envolvem a avaliação de várias alterações nas bases do DNA numa grande variedade de tecidos tumorais individuais e no respetivo tecido normal mostrando que o mecanismo da carcinogénese está relacionada com a produção de ROS. As alterações das purinas e pirimidinas derivam assim de lesões no DNA nos vários tecidos e provam que é possível a associação entre a produção de radicais livres produzidos e o risco para desenvolver uma doença oncológica. ^[11]

Apesar de estar demonstrado em animais que a terapia com antioxidantes pode diminuir o risco de desenvolver cancro provocado pelo aumento de ROS, o mesmo não aconteceu com humanos, onde além de tal não se ter verificado com clareza, existem estudos que mostram o aumento do risco em alguns tipos de cancro. ^[14] Em estudos animais, a presença de elevados níveis de antioxidantes exógenos mostrou a proteção do DNA, por impedimento da ação de radicais livres que provocam danos e estão fortemente associados ao desenvolvimento do cancro. Posteriormente, realizaram-se estudos de observação, incluindo estudos caso-controle e estudos de corte, a fim de avaliar se existência uma possível redução do cancro em humanos associada à toma de suplementos contendo antioxidantes. ^[15] Estes estudos mostraram resultados bastante contraditórios devido a vieses que influenciam os resultados deste tipo de estudos. Realizaram-se então ensaios clínicos randomizados que evidenciam com maior segurança o benefício/ risco de intervenções relacionadas com a saúde. Até ao momento, foram realizados nove ensaios clínicos randomizados que abordam a associação do uso de suplementos alimentares contendo antioxidantes com a prevenção do cancro. ^[14] Apesar da realização destes ensaios clínicos ainda não existe evidência de que a toma de suplementos antioxidantes seja benéfica na prevenção primária do cancro. ^[15]

Alguns ensaios randomizados foram realizados durante o tratamento do cancro, a fim de avaliar se os suplementos antioxidantes alteravam a eficácia ou reduziam a toxicidade de terapias específicas, tendo-se obtido resultados variáveis.^[16] São assim necessários ensaios adicionais que comprovem o benefício/risco da toma de antioxidantes durante o tratamento do cancro.^[16] Ainda assim, o estudo de novos antioxidantes quer para aplicação terapêutica em diversas patologias, quer como ferramenta para estudos mecanísticos, é uma área de investigação em grande desenvolvimento.

1.3. Cancro da mama e abordagens terapêuticas emergentes

O cancro da mama constitui o tipo de cancro mais comum entre as mulheres na Europa e corresponde à segunda causa de morte por cancro nestas (A primeira diz respeito ao cancro do pulmão que é fatal em cerca de 87% dos casos).^[17]

A maior parte dos tipos de cancro da mama são adenocarcinomas, desenvolvendo-se no tecido glandular. Cerca de 90% desenvolvem-se nos galactóforos ou canais do leite, correspondendo os restantes 10% ao desenvolvimento nos lóbulos da mama. Geralmente este inicia-se com um pequeno nódulo, que vai alastrando aos gânglios linfáticos da axila, podendo metastizar e atingir diferentes regiões do corpo. Este cancro é geralmente de evolução lenta e pode ser detetado através da mamografia em fases iniciais de desenvolvimento, mesmo antes de ser palpável.^[18] Relativamente aos sintomas mais comuns do cancro da mama, é possível salientar: aparecimento de nódulos ou endurecimento da mama ou debaixo do braço; mudanças no tamanho ou formato da mama; alterações na coloração ou sensibilidade da pele da mama ou da auréola; secreções contínuas por um dos ductos; retração da pele da mama ou do mamilo e inchaço significativo ou retração da pele.^[18]

Este tipo de cancro é um dos que causa maior impacto na nossa sociedade, não só pela sua frequência e associação a uma imagem de grande gravidade mas também pela sua agressão a um órgão de grande simbolismo tanto na maternidade como feminilidade. Em Portugal, são detetados anualmente cerca de 4500 novos casos de cancro da mama e cerca de 1500 mulheres morrem com esta doença. É estimado ainda que, o cancro da mama abrange cerca de 1% dos homens.^[19] É igualmente importante saber que se este for detetado e diagnosticado numa fase inicial, a taxa de cura é superior a 90% sendo assim importante a realização de rastreios para um diagnóstico o menos tardio possível.^[19]

Este tipo de cancro tem capacidade de metastização, um processo pouco compreendido e que implica em primeiro lugar a migração das células seguida da invasão para outros tecidos, que por sua vez implica a degradação da matriz extracelular, permitindo a entrada das células na corrente sanguínea ou linfática. O processo de metastização implica ainda que as células se mantenham viáveis quando perdem a interação com a matriz e com outras células, e que tenham capacidade de proliferar, colonizando um órgão secundário.^[20] A primeira fase do fenómeno de metastização consiste na migração, ou seja na aquisição de motilidade por parte das células tumorais, como consequência de alterações na morfologia e adesão celular. Este processo implica as etapas seguintes: alterações na polarização das células envolvendo o citoesqueleto; interações nas proteínas membranares como integrinas e caderinas levando a alterações na adesão células-a-célula e célula-matriz extracelular com formação de complexos de adesão focal; recrutamento de proteínas contrácteis como a miosina II seguida de formação de ligações cruzadas nos filamentos de actina que conduzem à sua contração e estabilização. A última etapa consiste na translocação celular sobre o substrato através da atividade dinâmica dos filamentos de actina, sob regulação de proteínas Rho-GTPases.^[21]

A invasão por sua vez consiste na capacidade das células degradarem a matriz extracelular, entrarem na corrente sanguínea ou linfática e migrarem a outros tecidos. As células tumorais com capacidade invasiva podem movimentar-se coletivamente ou individualmente, quer sob a forma fibroblástica quer ameboide. Quando se dá a transição para o estado invasivo do carcinoma, as células epiteliais sofrem profundas alterações na sua morfologia e adesão celular, que resulta na perda da polarização celular e diferenciação, ganhando uma mobilidade maior.^[19] Esta perda de polaridade nas células tumorais torna-as mais susceptíveis à quimiotaxia uma vez que a resposta a um gradiente química extracelular é facilitada por não ser necessário contrariar a polaridade celular intrínseca, podendo-se mobilizar em qualquer direção.^[22]

Devido à elevada relevância da metastização no prognóstico do cancro da mama, é importante o estudo de novos compostos e fármacos que atuem não só ao nível da proliferação celular, mas também ao nível da migração e invasão. De facto, vários estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver fármacos para alvos terapêuticos relacionados com os processos de adesão, migração e invasão celulares. Entre estes fármacos encontram-se os inibidores das MMPs, que têm sido estudados recentemente em diferentes ensaios clínicos.^[23]

II. OBJETIVO

Neste trabalho o objetivo concentra-se na avaliação da atividade anti-tumoral e antioxidante de dois compostos diterpénicos diferentes, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Compostos utilizados

Os compostos utilizados no estudo Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona foram extraídos respetivamente das espécies *Plectranthus ecklonii* e *Plectranthus grandidentatus*, de acordo com os procedimentos previamente descritos por Rijo *et al.* ^[24,25]

3.2. Ensaio DPPH

O DPPH é considerado um radical livre estável, em virtude da deslocalização do eletrão desemparelhado por toda a estrutura. Esta deslocalização confere a este radical uma cor violeta, que é caracterizada por uma banda de absorção em etanol a 517nm. ^[26]

A atividade antioxidante dos compostos em estudo, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona pode ser avaliada usando um ensaio DPPH, que permite verificar a capacidade dos compostos em sequestrar o radical livre, reduzindo-o a hidrazina. Quando um determinado composto que age como doador de átomos de hidrogénio é adicionado à solução com DPPH, obtém-se hidrazina, resultando numa mudança da cor violeta a amarelo pálido, associada a um decréscimo da absorvância a 517nm. ^[26] Os compostos a testar foram dissolvidas em etanol absoluto. A estas, é adicionada a solução etanólica de DPPH, cuja concentração final é de 75 μ M. A mistura (volume final de 700 μ L) é incubada posteriormente durante 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. De seguida, são lidas as absorvâncias a 517 nm, utilizando como ensaio branco as mesmas concentrações dos compostos em estudo, dissolvidas em etanol absoluto. Como controlo positivo, é utilizado GSH com uma concentração de 250 μ M. Foram realizados dois ensaios independentes, cada um deles contendo duplicados para cada amostra em estudo.

3.3. Ensaio da degradação do peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio apresenta um máximo de absorção a 240 nm. A sua percentagem de sequestro pode ser determinada através da diminuição da absorvância a 240 nm de uma solução de peróxido de hidrogénio em tampão fosfato 5 mM e pH 7.4, na presença de uma determinada amostra. Como controlo positivo, utilizou-se catalase numa concentração fina de 5 U/mL. A Catalase é uma enzima antioxidante, essencial na defesa dos corpos contra

stress oxidativo. É uma enzima heme, presente nos peroxissomas de quase todas as células aeróbicas. Esta enzima converte o peróxido de hidrogénio em água, reduzindo os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio. ^[27] As amostras de Parviflorona D foram testadas em concentrações finais de 5, 10, 15, 25 e 50 μ M. Os ensaios brancos foram preparados de forma igual às amostras, mas substituindo o peróxido de hidrogénio por igual volume de tampão fosfato. As absorvâncias foram lidas a 240 nm utilizando cuvetes de quartzo, aos tempos 0 e 2 minutos. Foram realizados dois a três ensaios independentes para cada amostra em estudo.

3.4. Mecanismo lesão/proteção do DNA

O ataque ao DNA plasmídico, que está na forma superenrolada, produz uma outra forma de DNA caracterizada por ser circular e relaxada. Esta forma migra mais lentamente que a forma superenrolada durante a eletroforese.

Testaram-se concentrações finais de Parviflorona D de 1, 5, 25 e 50 μ M. O controlo positivo consistiu numa solução de peróxido de hidrogénio 1 mM e Sulfato Ferroso 10 μ M cuja reação gera radical hidroxilo, responsável pela lesão do DNA. O DNA plasmídico foi incubado com as misturas de reação em tampão fosfato 5 mM e pH 7,4 (Volume final 20 μ L) a 37 °C, no escuro durante 2 h. Após este tempo, adicionou-se *Loading Buffer* com o objetivo de parar a reação e amostras foram analisadas por eletroforese a 135 V em 0,8% agarose em tampão TBE, durante 30 minutos. Os géis foram corados com Gel Red e as imagens captadas utilizando o software AlphaEase FC (AlphaDigidoc1000). Foram realizados sete ensaios independentes, cada um deles em duplicado para a amostra em estudo.

A realização desta técnica permitiu também avaliar a capacidade antioxidante da Parviflorona D no que respeita à proteção do DNA da lesão oxidativa. Foram testadas duas concentrações deste composto, 1 e 50 μ M e tal como no ensaio anterior, o controlo positivo consistiu numa solução de peróxido de hidrogénio 1 mM e Sulfato Ferroso 10 μ M. A realização deste ensaio envolveu ainda a preparação de um controlo de proteção antioxidante composto por peróxido de hidrogénio 1 mM, Sulfato Ferroso 10 μ M e Catalase 5 U/mL. Este ensaio foi preparado nas mesmas condições que o ensaio anterior e foram realizados cinco ensaios independentes cada um deles em duplicado para a amostra em estudo.

3.5. Cultura e manutenção das células MDA-MB-231

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10% FBS e 1% de uma solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina), sendo designado por meio completo. Foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera de ar com 5% de CO₂. De acordo com a confluência celular, este meio de cultura era renovado com regularidade. As células MDA-MB-231 foram mantidas regularmente em frascos de cultura T75 cm² até atingirem uma confluência entre 60 a 80%. Acima deste limite, estas devem ser passadas. A passagem das células é iniciada com a decantação do meio de cultura celular e lavagem das mesmas com uma solução de Verseno (diluída 10 vezes a partir da solução de 80 g/L de NaCl, 4 g/L KCl, 2 g/L EDTA, 0,2 g/L vermelho de fenol e água milipore até 1L), previamente aquecida a 37°C. Após verter o Verseno, adiciona-se uma solução de Tripsina também previamente aquecida a 37°C e incuba-se a 37°C durante cerca de 4 minutos até que se observe o destacamento das células aderidas. A tripsinização é interrompida pela adição de meio de cultura completo e posterior centrifugação a 1000 RPM durante 5 min. Findo este tempo, os sobrenadantes são rejeitados e o pellet composto pelos sedimentos celulares é reconstituído em meio de cultura completo e as células são distribuídas por novos frascos de cultura.

3.6. Ensaio Cristal Violeta

O ensaio de Cristal Violeta consiste num ensaio simples, bastante útil para obter informação sobre a densidade relativa de células aderidas em placas de cultura, sendo um indicador da biomassa celular, uma vez que cora as células essencialmente ao nível dos núcleos. As placas utilizadas continham 96 poços, sendo que em cada um foram inoculados 200 μ L de meio de cultura, contendo 5×10^3 células. Após 24h de incubação na incubadora a 37°C e 5% de CO₂, os compostos foram colocados nas culturas. Após nova incubação durante 48 h, o meio é removido e as placas são lavadas com algumas gotas de PBS a 37°C para remover as células não aderentes. Após a remoção do PBS, as células aderentes são fixadas com 100 μ L de etanol a 96%. Este processo demora 10 minutos e, no final desse tempo, após a remoção do etanol 96%, as células fixadas são coradas com 100 μ L de uma solução de Cristal Violeta a 0,1% em água Milli-Q com 10% etanol durante 5 minutos. Posteriormente, o corante extracelular é removido por lavagem das monocamadas celulares com água. Por último, procede-se à dissolução do corante que se fixou às células, com 200 μ L de uma solução de 1% de ácido acético em etanol 96%. Os poços são todos homogeneizados e as

absorvâncias lidas a 595 nm no espectrofotômetro de microplacas Multiskan FC, Thermo Scientific®. [28] Foram realizados dois a três ensaios independentes, cada um contendo quatro culturas em replicado.

3.7. Ensaios quimiotaxia e quimioinvasão

Este ensaio tem como objetivo avaliar a capacidade de determinados compostos exercerem efeito redutor ou inibitório na quimiotaxia e/ou na quimioinvasão de células que são possuidoras destas características como exemplo as MDA-MB-231, em estudo. Neste caso, foi testada esta propriedade na Parviflorona D.

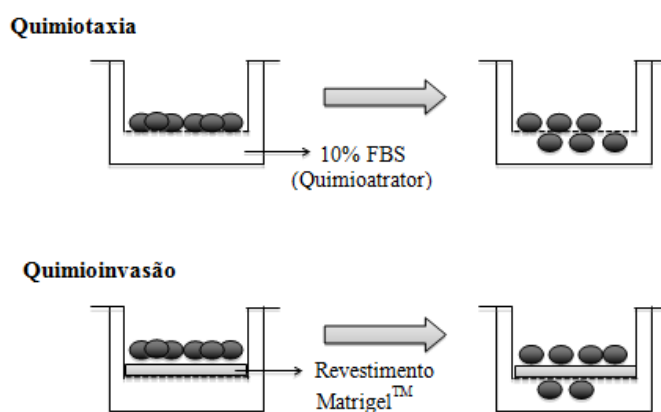


Fig.4- Representação do ensaio de quimiotaxia e quimioinvasão

Neste ensaio foram utilizadas placas de 24 poços contendo *transwells* com membranas contendo poros de 8 μ M. Nos poços destinados à migração, os *transwells* são utilizados diretamente, sem Matrigel uma vez que o objetivo é apenas verificar se este composto possuiu alguma ação ao nível da migração celular. Nos ensaios de invasão, é utilizada uma camada de Matrigel para avaliar a capacidade do composto reduzir ou até mesmo inibir a degradação da matriz extracelular (fig.4). A placa é colocada na incubadora a 37°C, durante 30 minutos, de modo a que ocorra a gelificação do Matrigel.

As células foram inoculadas no compartimento superior do *insert*, em 200 μ L de meio sem soro. O inóculo utilizado para este ensaio foi de 1×10^5 células. No compartimento inferior foram colocados 500 μ L de meio de cultura com 10% de soro. O soro colocado é quimioatratante, sendo utilizado para “chamar” as células com a finalidade de verificar se estas

possuem ou não atividade migratória e/ou invasiva. Neste ensaio, foi utilizada uma solução de Parviflorona D em meio sem soro, sendo a concentração final do composto 1 μ M em ambos os compartimentos. A placa é incubada a 37°C durante 16 h. Findo este tempo, os sobrenadantes são aspirados, centrifugados a 1160 *g* durante 12 minutos a 4°C e armazenado a -80°C para a realização de ensaios futuros. A parte superior dos transwells é limpa e as células depositadas na fase inferior da membrana são fixas com 700 μ L de etanol a 96% durante 15 minutos. Posteriormente procede-se a coloração com Cristal Violeta a 0,1% em água Milli-Q com 10% etanol, durante 7 minutos, cuja finalidade é corar as células que foram fixadas. O corante extracelular é então removido, por lavagem das monocamadas celulares com água. Os transwells voltam a ser colocados nos respectivos poços e a placa é guardada, até à sua total secagem, que dura cerca de 24 horas. São captadas imagens representativas num microscópio de contraste de fase Olympus CKX41 acoplado a câmara digital Olympus SC20. São obtidas 15 imagens para cada amostra, sendo cada 5 das ampliações 100x; 400x e 1000x. A quantificação realizou-se por contagem manual das células em 5 campos representativos. Foram realizados três ensaios independentes.

4. RESULTADOS OBTIDOS

4.1. Atividade antioxidante

4.1.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

A capacidade antioxidante dos dois compostos em estudo, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, foi avaliada com base na capacidade de redução do radical DPPH.

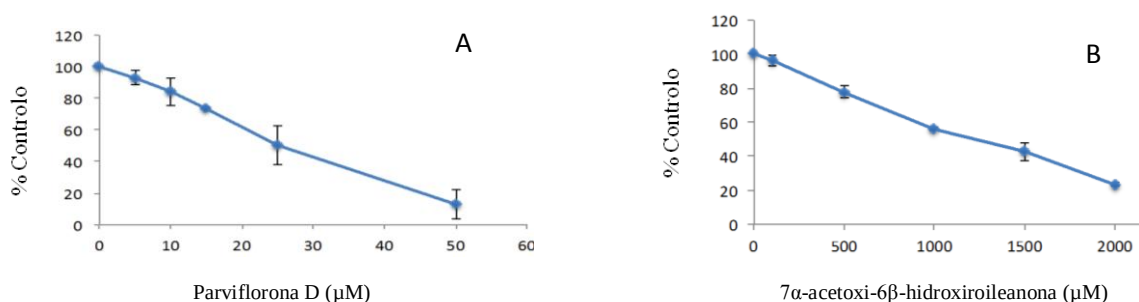


Fig.5 Capacidade antioxidante da Parviflorona (A) e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (B) na inibição do DPPH. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ DP (n=2-3) e foram calculados considerando como 100% a absorbância do controlo negativo (DPPH 75 μ M em etanol absoluto).

A figura 5 mostra que de facto existe um decréscimo na quantidade do radical livre, o que significa que este é reduzido pelos compostos. Isto leva a concluir que os dois compostos apresentam atividade antioxidante que pode ser explicada pela redução e estabilização do radical. É de notar que apesar dos dois possuírem esta característica em comum, no caso da Parviflorona D esta é bastante mais acentuada pois são necessárias concentrações muito mais baixas desta relativamente à 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona para obter descoloração do radical DPPH. Esta diferença no potencial antioxidante pode confirmar-se pelos valores de IC₅₀ obtidos neste ensaio que foram de $28,16 \pm 4,28 \mu$ M para a Parviflorona e de $1,27 \pm 0,07$ mM para a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona.

4.1.2. Degradação do Peróxido de Hidrogénio

Neste ensaio foi averiguada a capacidade do composto Parviflorona D degradar o peróxido de hidrogénio. Como controlo positivo foi utilizada a catalase, um enzima que degrada o peróxido de hidrogénio, tal como pode ser observado na figura 6.

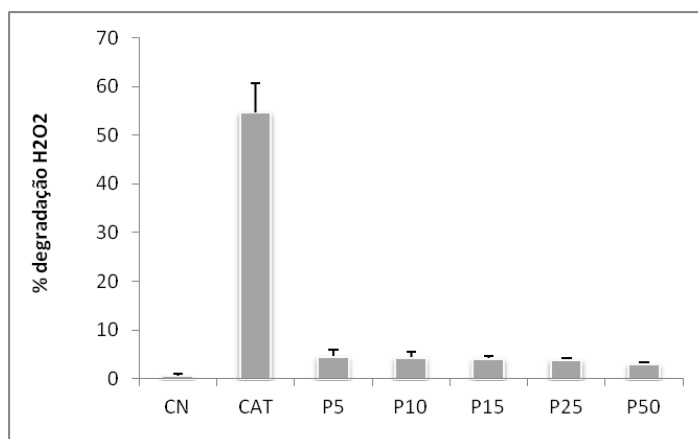


Fig.6. Estudo da capacidade de degradação do Peróxido de Hidrogénio pela Parviflorona D. As barras representam as percentagens de degradação do peróxido de hidrogénio obtidos após incubação com catalase (controlo positivo) e com diferentes concentrações de Parviflorona D. Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ DP (n=2-3)

Foram testadas diferentes concentrações de Parviflorona, nomeadamente entre 5 e 50 μ M, cujas percentagens de sequestro foram muito baixas (inferiores a 5%). Pelo contrário, o controlo positivo apresentou um valor de 54,77% $\pm$ 5,97.

Observando estes resultados, é possível concluir que o composto Parviflorona D não exerce qualquer efeito significativo na degradação do peróxido de hidrogénio sendo que, a sua capacidade antioxidante não ocorre em termos de degradação desta espécie reativa de oxigénio.

4.1.3. Proteção da lesão oxidativa do DNA

A realização deste ensaio teve como objetivo verificar se a Parviflorona D teria efeito protetor ao nível do DNA, o que poderia ser vantajoso em termos do seu efeito antioxidante.

Foram testadas duas concentrações diferentes do composto, nomeadamente 1 e 50 μ M cujos resultados estão representados na figura 7.

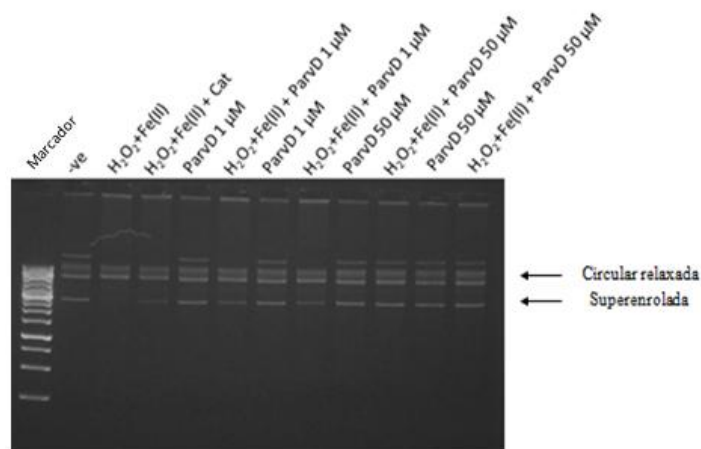


Fig. 7. Avaliação dos danos no DNA através da análise da quebra de ligações do DNA. O gel de eletroforese mostra as clivagens no plasmídeo pUC18 após o tratamento com os agentes referidos.

Como controlo positivo utilizou-se uma solução de peróxido de hidrogénio 1 mM e Sulfato Ferroso 10 μ M, a qual, após a incubação com PuC18, originou lesões na cadeia de DNA, provocadas pelo aumento do radical hidroxilo proveniente desta reação (linha 3, figura 7). No poço correspondente ao controlo positivo apenas se verifica a presença de uma banda, correspondente à forma relaxada de DNA e que como tal, vai migrar mais devagar situando-se mais acima no gel que a forma superenrolada. Para a realização deste ensaio, foi adicionado também um controlo de proteção (linha 4, figura 7), cujo agente antioxidante era a catalase. A adição da catalase provocou a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio diminuindo assim os seus efeitos nocivos ao nível do DNA. A introdução deste controlo serviu para verificar se os resultados obtidos aquando da incubação do PuC18 com Parviflorona D, peróxido de hidrogénio e sulfato ferroso são ou não semelhantes com o controlo, podendo retirar-se conclusões acerca da proteção do DNA com este composto. Através da observação da figura 7 verifica-se que utilizando um controlo de proteção, a forma superenrolada se mantém o que significa que não se está a gerar radical hidroxilo com capacidade de lesionar o DNA. É possível verificar também que, na presença de H₂O₂, ferro e Parviflorona D, esta forma superenrolada se mantém também, o que significa que este composto terá um papel protetor face à lesão oxidativa do DNA. Estes resultados verificam-se em ambas as concentrações testadas no entanto verifica-se que a forma superenrolada é mais acentuada quando usada a concentração 50 μ M.

4.2. Atividade Anti-tumoral

4.2.1. Viabilidade celular

Através do ensaio Cristal Violeta, foram caracterizados os perfis de citotoxicidade dos compostos em estudo, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona em células MDA-MB-231. Para além disso, foi avaliado também o efeito do composto Parviflorona D, quando em conjunto com um citotóxico já utilizado na terapia do cancro da mama, a Doxorrubicina.

Os compostos Parviflorona e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona foram testados em concentrações até 100 μ M por um período de incubação de 48 h. Observou-se uma relação concentração - resposta em ambos os casos, sendo possível verificar-se que à medida que a concentração deste composto aumenta, a viabilidade celular diminui (fig.8). Verifica-se também que a Parviflorona D apresenta uma atividade citotóxica mais notória que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, quando comparadas as percentagens de viabilidade celular nas mesmas concentrações de cada um dos compostos em estudo.

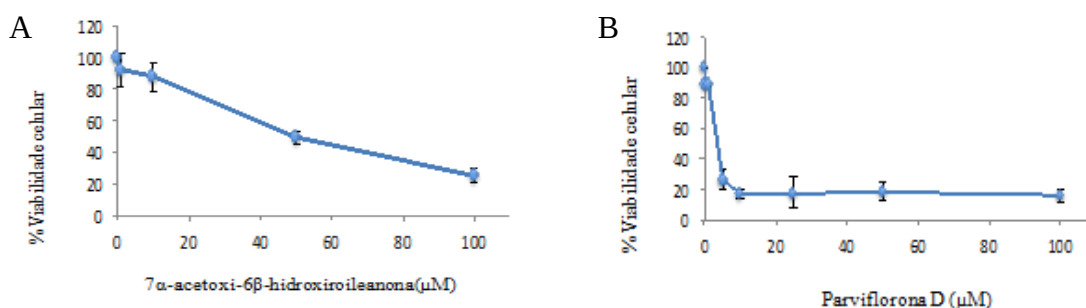


Fig 8. 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (A) e Parviflorona (B) reduzem a viabilidade de MDA-MB-231 (48 h de exposição; ensaio de Cristal Violeta). Os resultados são apresentados como médias $\pm$ DP (n=2-3) e foram calculados considerando como 100% a viabilidade celular de culturas não tratadas

Foi também efetuado um estudo de viabilidade celular utilizando Parviflorona D 1 μ M e Doxorrubicina 5 μ M. O objetivo deste ensaio consistia em verificar se o composto era sinergista ou não da atividade deste fármaco. Quando utilizada Doxorrubicina numa concentração de 5 μ M a viabilidade celular é de 34% $\pm$ 15,3 enquanto que, quando utilizada na mesma concentração com Parviflorona D 1 μ M, a viabilidade celular é de 26,7% $\pm$ 12,3 o que significa que quando utilizados em conjunto a viabilidade celular é 7,3% menor que

quando utilizada unicamente o citotóxico. Apesar do valor ser relativamente mais baixo, não é considerado significativo, o que significa que a Parviflorona D não possui efeitos sinérgicos significativos quando usado com este citotóxico.

4.2.2. Quimiotaxia e quimioinvasão

Foram realizados ensaios cujo objetivo foi avaliar a capacidade da Parviflorona D reduzir a migração e/ou invasão das células tumorais MDA-MB-231. Observando a figura 9 representada abaixo, verifica-se que na presença de Parviflorona D, quando utilizada numa concentração de 1 μ M, a percentagem de migração reduz para 42,5% e a de invasão para 49,81%. Estes resultados sugerem que este composto exerce assim efeito quer no fenómeno de migração quer no de invasão, o que será vantajoso a nível da sua atividade anti-tumoral.

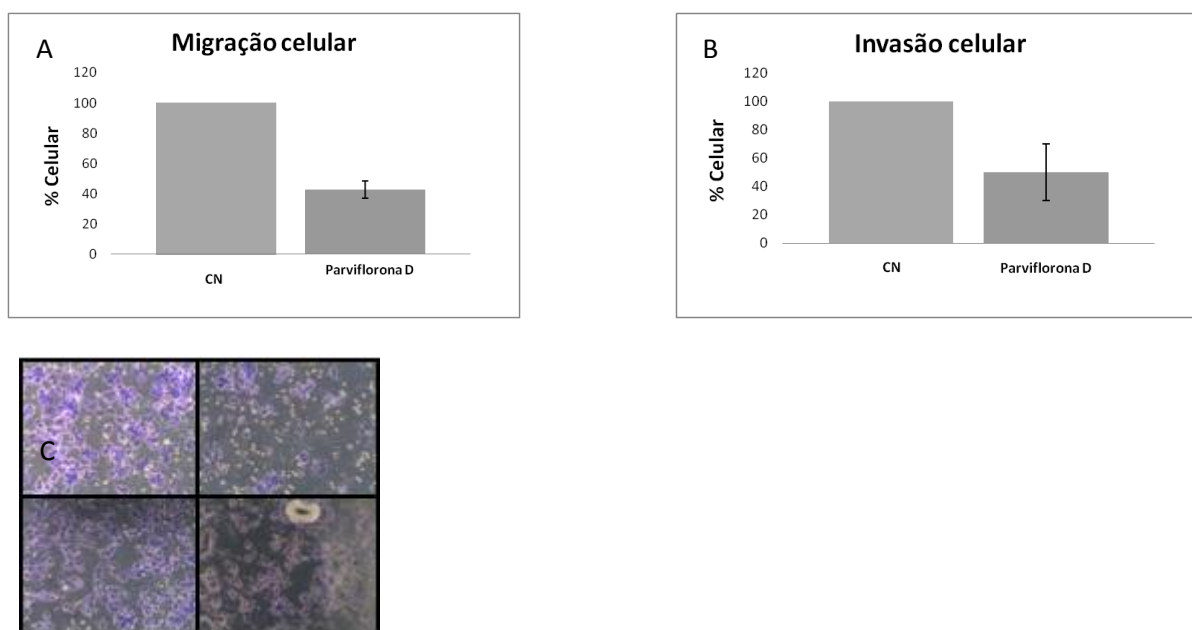


Fig 9. Efeito da Parviflorona D nos fenómenos de migração (A) e invasão (B) celulares. Os resultados são apresentados como médias $\pm$ DP (n=3). Imagens captadas com apiação de 100x (C) representam os ensaios de migração e invasão. Em cima, esquerda- Controlo negativo migração; Em cima, direita -Parviflorona migração; Em baixo, esquerda- Controlo negativo invasão; Em baixo, direita- Parviflorona D invasão.

4.2.3. Lesão do DNA

A realização deste ensaio teve como objetivo avaliar se a citotoxicidade da Parviflorona D poderá estar associada à lesão direta do DNA. Foram testadas concentrações

finais entre 1 e 50 μ M deste composto no entanto não se verificou a formação de DNA na forma circular relaxada, que seria indicativo de rutura nas ligações fosfodiéster e consequente lesão no DNA. Tal como se pode observar na figura 10, o DNA permanece na forma superenrolada quer no controlo negativo quer nas diferentes concentrações testadas. O controlo positivo constituiu numa solução de peróxido de hidrogénio 1 mM e Sulfato Ferroso 10 μ M e mostrou após a incubação com PuC18, lesões na cadeia de DNA, provocadas pelo aumento do radical hidroxilo proveniente desta reação. No poço correspondente ao controlo positivo apenas se verifica a presença de uma banda, correspondente à forma relaxada de DNA e que como tal, vai migrar mais devagar situando-se mais acima no gel que a forma superenrolada.

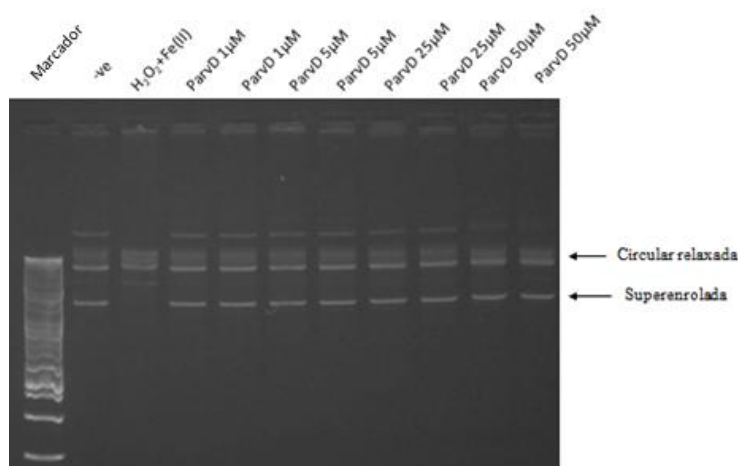


Fig. 10. O potencial efeito da Parviflorona D em provocar lesões no DNA foi avaliado utilizando o ensaio de lesão em DNA plasmidico. Após incubação do plasmídeo pUC18 com Parviflorona D (1-50 μ M), a percentagem de DNA na forma superenrolada mantém-se (linhas 4-11) o que sugere a inexistência de quebras diretas no DNA.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho experimental, foram realizados vários estudos para os compostos diterpénicos, Parviflorona D e 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona com o objetivo de avaliar a sua atividade antioxidante, bem como o efeito anti-tumoral em células humanas de cancro da mama MDA-MB-231.

Primeiramente foram realizados três ensaios *in vitro*, que avaliavam a capacidade antioxidante: O primeiro avaliava a capacidade de sequestro do radical DPPH e o outro a capacidade de degradação do peróxido de hidrogénio. No primeiro, foram testados os dois compostos, onde se verificou que ambos apresentavam atividade antioxidante, no entanto esta é bastante mais notória na Parviflorona D que na 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona pois no primeiro verificaram-se reduções na absorvância em concentrações muito menores que as utilizadas no segundo composto o que leva a concluir que a Parviflorona D, em concentrações mais baixas que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, tem capacidade de redução do radical DPPH, possuindo assim melhor atividade antioxidante. Pelo facto da Parviflorona D ser muito mais eficaz que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, os estudos de atividade antioxidante prosseguiram apenas com este composto. Relativamente ao ensaio do Peróxido de Hidrogénio, após testadas várias concentrações de Parviflorona D, verificou-se que este composto não exercia efeitos significativos na degradação do oxidante em causa, o que significa que a sua capacidade antioxidante não pode ser explicada por este processo.

Por último, utilizando a técnica de eletroforese, foi testada a capacidade da Parviflorona D proteger o DNA quando sujeito a efeitos provocados pelo radical hidroxilo, uma ROS altamente tóxica e reativa. Este ensaio revelou que na presença de peróxido de hidrogénio e Sulfato Ferroso, a Parviflorona D exerce um efeito protetor do DNA, uma vez que não se originou a forma circular relaxada provocada pelos efeitos do radical hidroxilo, proveniente da reação do peróxido de hidrogénio com o ferro. Este ensaio sugere assim que a Parviflorona D exerce efeito ao nível desta ROS, o que poderá ser bastante vantajoso no seu papel como antioxidante. A ação protetora observada pode acontecer por vários mecanismos. Dada a ausência de capacidade para degradar o peróxido de hidrogénio, o efeito sequestrador de HO $\cdot$ ou a quelatação do ferro parecem ser os mecanismos mais prováveis.

Nos estudos de avaliação da capacidade citotóxica dos diterpenos em estudo, verificou-se que ambos os compostos possuíam esta propriedade, no entanto a Parviflorona D apresenta uma atividade citotóxica bastante mais eficaz que a 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, pois comparando iguais concentrações dos dois compostos, verifica-se que a primeira apresenta percentagens de viabilidade celular menores que as de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona. A atividade citotóxica poderá estar associada aos efeitos promotores da apoptose da Parviflorona D, já descritos noutras linhas celulares. (*Rijo et al*; resultados não publicados).

De acordo com os critérios do *National Cancer Institute* ^[29] apenas a Parviflorona D possui atividade anti-tumoral (IC50 < 10 μ M), pelo que se prosseguiram com estudos apenas com este composto.

Após a realização deste ensaio, foram efetuados ensaios utilizando Parviflorona D e Doxorrubicina, um citotóxico utilizado hoje em dia no tratamento de cancro da mama. Verificou-se que o co-tratamento do composto com o Doxorrubicina resultava numa diminuição de viabilidade de 7,3% face ao tratamento apenas com Doxorrubicina, um valor considerado pouco significativo e sem grande interesse, que leva a concluir que a Parviflorona D não apresenta uma atividade sinergista significativa com este citotóxico. Foram também realizados ensaios cuja finalidade seria observar os efeitos da Parviflorona D na migração e invasão das células MDA-MB-231. Verifica-se que na presença do composto tanto as percentagens de migração como invasão são consideravelmente inferiores às do controlo negativo, o que leva a concluir que este composto exerce efeitos significativos ao nível destes fenómenos. Por último, realizou-se um ensaio utilizando a técnica de eletroforese que tinha como objetivo avaliar se a Parviflorona D provocava ou não lesões na cadeia de DNA. Foram testadas várias concentrações deste composto que revelaram que o mesmo não exercia efeitos lesivos na sua estrutura, conservando-se assim a sua forma superenrolada e compacta o que leva a concluir que o mecanismo de ação anti-tumoral da Parviflorona D não pode ser explicada por este processo.

Como perspetivas futuras no âmbito deste trabalho, prevê-se a realização de ensaios que estudem mecanismos de apoptose e que avaliem a inibição de metaloproteinases, enzimas que funcionam no ambiente extracelular e degradam proteínas que podem ou não pertencer à matriz, que estão fortemente ligadas ao desenvolvimento de tumores.^[30] É também necessário avaliar a ação deste composto em células não tumorais a fim de avaliar se este

exerce toxicidade seletiva para as células tumorais. Em caso afirmativo, a Parviflorona D1 poderá vir a ser desenvolvida como fármaco antitumoral. Caso exerça toxicidade também nas células tumorais, a Parviflorona D1 poderá ser utilizada como composto de partida para a síntese de novos compostos bioativos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Harley, R. M.; Reynolds, T. (1992). Advances in Labiatae Science, *Royal Botanic Gardens Kew: Great Britain*
- [2]Nyila M.A., Leonard C., Hussein A.A.; Lall N. (2009); Bioactivities of *Plectranthus ecklonii* constituents. *Natural Product Communications* 4(9):1177-1180
- [3]Valente, I. (2007); Terpenóides de *Euphorbia Meliifera* AIT - Pesquisa de moduladores do fenómeno de multirresistência em células tumorais; Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre.
- [4]San Jose G., Fortuno A., Beloqui O., Diez J., Zalba G.(2008). NADPH oxidase CYBA polymorphisms,oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 114:173-82.
- [5]Fernandes, A.S. (2010), Modulation of Oxidative Stress by Superoxide Dismutase Mimetics; Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa: Lisboa; dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor.
- [6]Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J. (2013); Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications; *Nature Reviews Microbiology*, 11, 371-384;
- [7] Droge, W. (2002); Free radicals in the physiological control of cell function; *Physiol Rev*, .82(1): p. 47-95
- [8]Limon-Pacheco, J. and M.E. Gonsebatt (2009); The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 674(1-2): p. 137-147
- [9]Vaziri N.D. (2008); Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran J Kidney Dis* 2:1-10.
- [10]Fernandes, A. S.; Castro, M.; O., Oliveira, N. (2011); Stress oxidativo e defesas antioxidantes-Revisão pedagógica ;*Biomedical and Biopharmaceutical Research*; (8) 1:97-108
- [11]Gulam, W.; Ahsan, H.(2006); Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic condition; *Journal of Carcinogenesis*; 5:14

- [12] Collins, A. R., Oscoz, A. A., et al. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143-151.
- [13] Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003); Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*,17:1195–214.
- [14]Antioxidants and cancer prevention; disponível em <http://www.cancer.gov/>; acessado a 09/11/2014
- [15]Patterson R.E., White E., Kristal A.R., et al. (1997); Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiologic evidence. *Cancer Causes and Control* ; 8(5):786-802.
- [16]Blot W.J., Li J.Y., Taylor P.R., et al (1993); Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population; *Journal of the National Cancer Institute* ,85:1483–91.
- [17]Portal de cancro da mama, disponível em www.cancrodamama.com, acessado a 1/10/2014
- [18]Portal da organização cancro da mama, disponível em www.breastcancer.org, acessado a 1/10/2014
- [19]Liga contra o cancro, disponível em www.ligacontracancro.pt, acessado a 01/10/2014
- [20] Yamaguchi, H., J. Wyckoff, and J. Condeelis.(2005) Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 17(5): 559-64.
- [21]Decaestecker, C., et al. (2007) Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Med Res Rev.*27(2): 149-76.
- [22]Mori, K., M. Shibamura, and K. Nose (2004). Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 64(20): 7464-72.
- [23]Radsky, E.S., Radsky, D.C. (2010);Matrix Metalloproteinase- Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer; *J mammary Gland Biol Neoplasia.* 15:201-212
- [24]Rijo P., Duarte A., Francisco A. P., Semedo-Lemsaddek T., Simões M.F. (2014), “In vitro antimicrobial activity of royleanone derivatives against Gram positive bacterial pathogens”; *Phytotherapy Research*; 28, 76-81.

[25]M. F. Simões, Patricia Rijo, Aida Duarte, Diogo Matias, Benjamín Rodríguez (2010); An easy and stereoselective rearrangement of an abietane diterpenoid into a bioactive microstegiol derivative; *Phytochemistry Letters*, 3, 234-237.

[26]Rufino, M.; Alves, R.; Brito, E.; Moraes, S.; Sampaio, C.; Jiménez, J.; Calixto, F.; (2007) Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado técnico* 127

[27]Catalase gene, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/847>, acessado a 3/10/2014

[28]Fernandes, A. S.; Serejo, J.; Gaspar, ; Cabral, F.; Bettencourt, A. F.; Rueff, J.; Castro, M.; Costa, J.; Oliveira, N. G. (2010) "Oxidative injury un V79 Chinese hamster cells; protective role of the superoxide dismutase mimetic MnTM-4-PyP" ; *Cell Biol Toxicology* 26:91-101.

[29]NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screen, disponível em <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>, acessado a 18/11/2014

[30]Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. (2006);Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 69(3):562-573