

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas  
de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri***

Elisa Corrêa Fornari Baldo

Ribeirão Preto  
2016

## RESUMO

FORNARI-BALDO, E. C. **Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas e genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri***. 2016. 142 folhas. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Toxinas animais podem ser moléculas aplicáveis na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas para a pesquisa básica e aplicada. Recentemente, tem sido provado que medicamentos tradicionais chineses (TCM) compostos por substâncias extraídas de venenos de sapos são efetivos no tratamento de hepatocarcinoma e outros tipos de câncer. Desta forma, os objetivos deste estudo foram isolar toxinas do veneno do sapo *Rhinella schneideri* e avaliar suas ações antineoplásicas em diferentes linhagens celulares tumorais, além de avaliar a capacidade das toxinas em induzir instabilidade genômica (genotoxicidade e mutagenicidade). O veneno de *Rhinella schneideri* foi inicialmente submetido à diálise resultando na fração de baixa massa molecular (VRs), a qual foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 em um sistema FPLC. Avaliou-se a citotoxicidade do VRs em linhagens celulares HL-60, HepG2, PC-12, B16F10, MCF-7, SKBr-3, L292 e em hepatócitos primários isolados de ratos Wistar, através do ensaio do MTT. Analisou-se também a influência do VRs em diversos parâmetros mitocondriais, através de experimentos realizados com mitocôndrias isoladas de fígados de rato. Adicionalmente, foram isoladas três toxinas do VRs, denominadas Rs1, Rs2 e Rs3, com as quais foram realizados ensaios de citotoxicidade com células tumorais HepG2 e hepatócitos primários, análise da dissipação do potencial de membrana mitocondrial, avaliação de indução de fragmentação nuclear, análise da distribuição do ciclo celular, ensaios de avaliação de apoptose/necrose utilizando anexina V (AV) e iodeto de propídeo (PI) e ativação das caspases 3, 8 e 9 por western blot. O VRs (0,01 – 1000 µg/mL) foi citotóxico para quatro das seis linhagens tumorais estudadas (B16F10, HepG2, HL-60 e Skbr-3), demonstrou interferir pouco na viabilidade de células não tumorais L929, e citotóxico para hepatócitos. O VRs não induz efeitos significativos nos parâmetros bioenergéticos e oxidativos das mitocôndrias isoladas de fígado de ratos saudáveis, o que é um indicativo que o VRs não induz efeito citotóxico a estas células através da via mitocondrial. Além disto, o VRs diminuiu o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Através da cromatografia de fase reversa foram isoladas três toxinas do VRs, dentre as quais duas (Rs1 e Rs3 [1-1000 nM]) demonstraram ser mais citotóxicas às células tumorais HepG2. Estas toxinas pouco ou nada interferiram na viabilidade celular de hepatócitos primários, característica extremamente importante para uma possível aplicação como agente antitumoral. Nos experimentos de dissipação do potencial de membrana mitocondrial

e de fragmentação nuclear (características de células em apoptose) em células HepG2 ambas as toxinas se mostraram capazes de induzir a dissipação do potencial de membrana (de maneira concentração-dependente) e também causaram a condensação da cromatina e fragmentação nuclear. A análise da distribuição do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com Rs1 e Rs3 demonstrou que as toxinas induziram aumento da fase G2/M em menores concentrações (10- 50 nM), seguido de uma diminuição de células nesta fase e aumento em fase G0/G1 em maiores concentrações (100 – 1000 nM). A quantidade de células apoptóticas foi maior em concentrações maiores, porém não estabeleceu relação concentração-resposta. Os ensaios realizados com anexina V e PI, demonstram que ambas as toxinas são capazes de induzir as células HepG2 à morte, principalmente pelo processo de apoptose. Os ensaios de caspases 3, 8 e 9 confirmaram a ativação da apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. Os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade revelaram que ambas as toxinas não causaram danos ao DNA das células HepG2. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo indicam a seletividade dos efeitos citotóxicos das toxinas Rs1 e Rs3 pelas células tumorais HepG2, induzindo estas células à morte principalmente por apoptose, justificando o potencial uso destas duas toxinas em terapias antitumorais.

**Palavras-chave:** *Rhinella schneideri*; citotoxicidade; atividade antineoplásica; apoptose.

# *Introdução*

## **1. INTRODUÇÃO**

Os produtos naturais têm demonstrado conter uma série de moléculas biologicamente ativas que podem proporcionar ferramentas importantes para investigar diferentes sistemas fisiológicos e podem ser úteis para o desenvolvimento de novas drogas. Algumas dessas moléculas têm demonstrado potencial terapêutico devido às suas atividades antitumoral, cardiovascular, antimicrobianas, antivirais e antiparasitárias. As fontes mais comuns dessas moléculas são as plantas e animais peçonhentos e venenosos. Animais peçonhentos possuem células especializadas ou estruturas glandulares que produzem venenos e aparatos capazes de inocular estas secreções (por exemplo, ferrões, dentes, arpão). Animais venenosos podem produzir veneno ou adquirir toxinas do ambiente, plantas, outros animais ou microrganismos, e acumulam-se em glândulas ou tecidos, mas estes animais são incapazes de inoculação ativa, visto que eles não possuem aparatos para essa finalidade (MEBS, 2002).

As peçonhas e venenos animais apresentam uma complexa mistura de toxinas, que foram desenvolvidas durante o processo de evolução como estratégia de defesa e/ou captura de presas e causam modificações fisiológicas nos predadores destes animais e em suas presas. Os animais peçonhentos possuem uma capacidade única para paralisar e/ou matar suas presas, ativando estruturas específicas de diversos sistemas orgânicos da presa (MORTARI et al, 2007). Sendo assim, as toxinas têm grande potencial para a produção de novas drogas terapêuticas. Muitas toxinas de diferentes tipos de animais vêm sendo isoladas e muitas delas são consideradas grandes ferramentas para pesquisa básica e alvos farmacológicos (LEWIS; GARCIA, 2003).

### **1.1. Composição dos venenos de anfíbios**

Os anfíbios são uma das mais importantes fontes de moléculas bioativas derivadas de animais. Eles tiveram durante sua evolução ajustes em sua pele, devido à transição entre a água e a terra. A pele destes animais foi modificada de acordo com o seu novo estilo de vida e resultou na sua adaptação à vida na terra (TOLEDO; JARED, 1995). A classe Amphibia possui 7520 espécies catalogadas, que se distribuem em três ordens, as quais são denominadas de Caudata, Gymnophiona e Anura (FROST, 2016). A ordem Anura é a mais populosa, com 6615

espécies, e é constituída por sapos, rãs e pererecas. Os sapos da família Bufonidae (589 espécies) são os mais tóxicos, sendo que no Brasil são encontradas 78 espécies, dentre elas a *Rhinella schneideri* (antigo *Bufo schneideri* ou popular Sapo Cururu) (Fig. 1) (SBH, 2015).



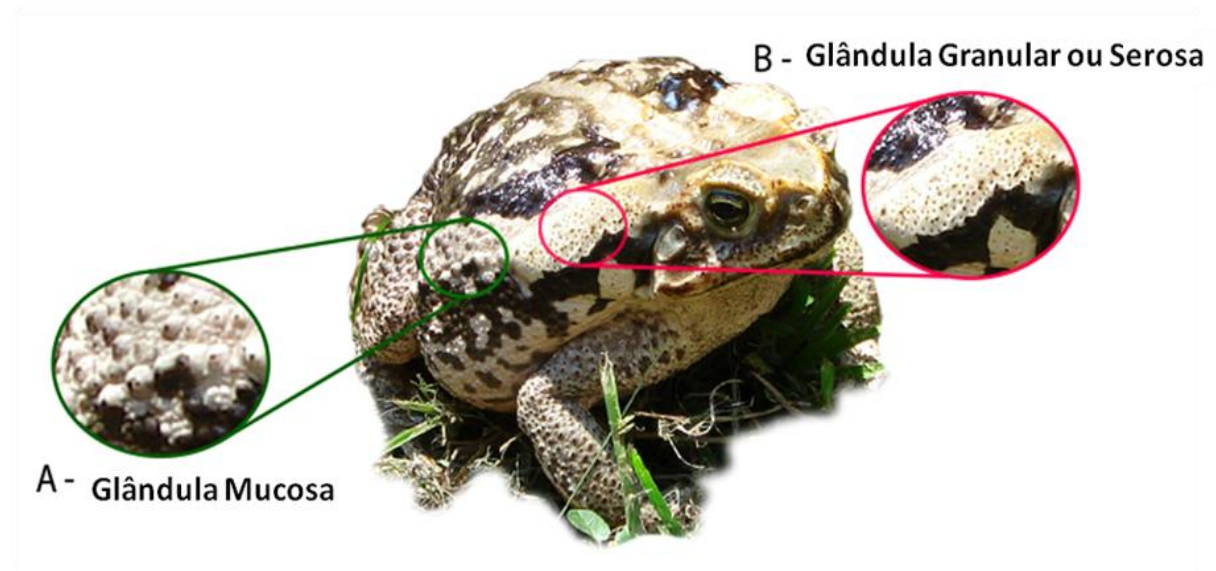
**Figura 1.** *Rhinella schneideri*.

Fonte: Acervo de fotos do Laboratório de Toxinas Animais (FCFRP-USP).

Estes vertebrados do grupo Anura ocupam amplos tipos de habitats e, para isto, sofreram adaptações em relação aos seus ancestrais, dentre estas, a mais característica está em sua pele, que apresenta um elaborado sistema de glândulas cutâneas distribuídas por toda superfície corporal. Estas glândulas liberam substâncias com diferentes funções, desde a regulação das funções fisiológicas à proteção contra predadores ou microrganismos. Se esta proteção for removida, sua pele é facilmente infectada por fungos e bactérias em poucos dias (CLARKE, 1996). Os anfíbios anuros utilizam suas toxinas para defesa. Como exemplo, sapos da espécie *Rhinella schneideri*, quando ameaçados, inflam o corpo exibindo suas glândulas parotóides ao predador, de forma que se for abocanhada pela cabeça, liberará o veneno leitoso das glândulas, cujas toxinas podem ser potencialmente mortais (JARED; ANTONIAZZI, 2009).

As glândulas se dividem em dois tipos: as glândulas mucosas e glândulas granulares (serosa ou venenosa), que possuem diferentes posições anatômicas e

diferente constituição de secreção (Fig. 2). As glândulas mucosas estão mais relacionadas com funções fisiológicas, como reprodução, defesa contra fungos e bactérias, respiração e dessecação, e encontram-se espalhadas por toda a pele do animal. Já as glândulas granulares produzem uma secreção repelente ou tóxica, representando uma das principais formas de defesa passiva do animal (TOLEDO; JARED, 1995).



**Figura 2.** Glândulas de sapo do gênero *Bufo* (*Rhinella schneideri*): mucosa (A); granular ou serosa (B). Fonte: BALDO et al., 2015.

Nos anfíbios, as glândulas serosas são divididas em vários grupos, de acordo com a região do corpo em que se localizam, como por exemplo, as parotóides (localizadas no dorso, imediatamente atrás do ouvido), lombares, e as peitorais.

Extraído das glândulas parotóides, o veneno de sapo possui o aspecto de um líquido espesso, leitoso ou cremoso, de cor branca (*Bufo marinus*) ou amarela (*Rhinella schneideri*), de cheiro fortemente alíciio no *Bufo crucifer* e quase inodoro nas outras espécies estudadas (BRAZIL; VELLARD, 1926).

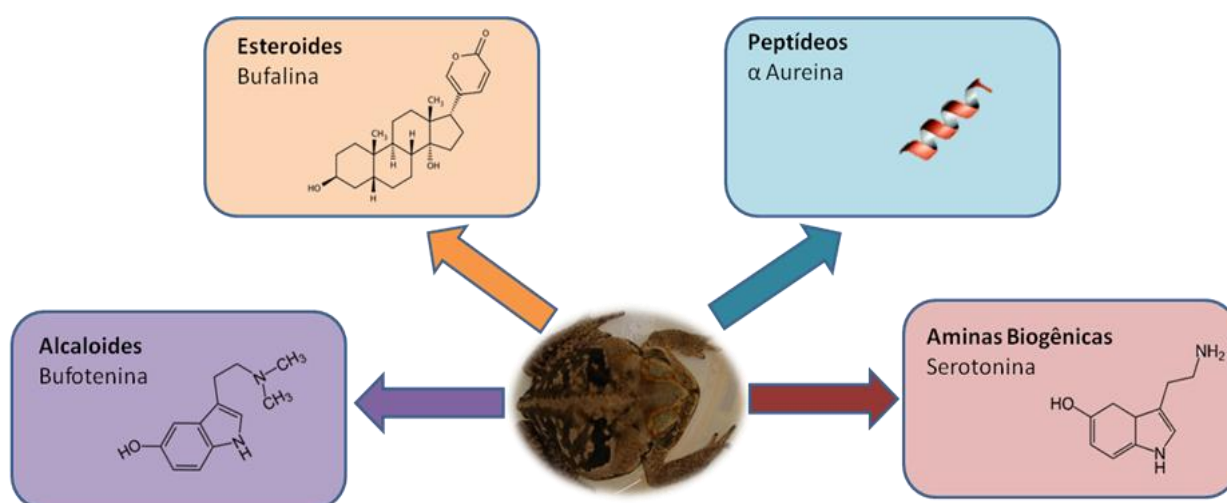
Os venenos dos anfíbios contêm uma variedade de compostos biologicamente ativos, os quais funcionam como ferramentas de defesa contra predação e/ou como agentes antimicrobianos (MEBS et al., 2005). As toxinas são produzidas em glândulas epidérmicas e parótidas, sendo que em mamíferos a ingestão destas substâncias induz intoxicação severa.

A intoxicação por contato com o animal é rara e acontece quando a secreção ou o próprio animal é ingerido, porque ele só tem efeito quando em contato com feridas ou mucosas do agressor, como boca e olhos, considerando que eles só

liberam o seu veneno quando se sentem ameaçados ou provocados. No entanto, a segunda geração de anfíbios mantidos em cativeiro, perde a sua capacidade de produzir toxinas e os animais tornam-se não-tóxicos, já que as toxinas são produzidas por precursores encontrados na dieta do animal, o que explica a variação considerável na toxicidade dos sapos em diferentes localizações geográficas (DALY et al., 1997).

O envenenamento por toxinas de sapos manifesta-se primariamente por sintomas digitálicos-símile, efeitos cardioativos, que resultam em bradicardia, diferentes graus de bloqueio atrioventricular, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular e morte súbita (CHI et al., 1998). Como resposta ao envenenamento, geralmente, o organismo responde de forma a tentar eliminar pelo menos parte do veneno, o que poderia levar a uma diminuição da intoxicação. Dentre os efeitos do envenenamento podem ser citados: irritação da mucosa, vômito, salivação diarreia (KNOWLES, 1968; BEDFORD, 1974).

Dentre os compostos biologicamente ativos, excretados por ambos os tipos de glândulas, podem-se encontrar amins biogênicas, alcaloides, esteroides e peptídeos (Fig. 3), que estão envolvidos na regulação das funções fisiológicas da pele, bem como em mecanismos de defesa contra predadores e microrganismos. Podem ser associados a essas moléculas efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos, hemotóxicos e miotóxicos. Adicionalmente, elas podem provocar anestesia ou apresentar atividade hipotensora e/ou hipertensora (ANJOLETTE et al., 2015).



**Figura 3.** Compostos biologicamente ativos encontrados nos venenos de sapos. Pode-se observar moléculas esteroidais como a bufalina, amins biogênicas como a serotonina, alcaloides como a bufotenina e peptídeos como a α Aureina.



A alimentação é muito importante para a composição do veneno de sapo. O tipo de dieta depende de fatores como o local em que vivem e do tamanho estrutural do seu corpo. Normalmente a sua alimentação é através de pequenos insetos, mas pode variar, incluindo outros invertebrados (BATISTA et al., 2011).

Uma das principais características deste veneno é a sua resistência a diversos agentes físico-químicos, que o difere de outros venenos de origem animal, tais como o das serpentes, aranhas e escorpiões, que são facilmente destruídos ou alterados por agentes externos. O veneno de sapos resiste ao calor, à luz, aos reagentes químicos como os ácidos fortes, álcool, éter, acetona, clorofórmio e mesmo a outros mais comuns, como água oxigenada, tintura de iodo, solução de hipossulfito de sódio a 50%, solução deci-normal de soda e solução de nitrato de prata (BRAZIL; VELLARD, 1926). Porém, o anel lactônico contido nessas moléculas pode se abrir facilmente dependendo do solvente (LAMBERTON et al., 1985). As soluções concentradas ou diluídas do veneno podem ser esterilizadas a 120°C em autoclave sem que sofram diminuição de atividade. O veneno em óleo de oliva resiste, sem modificação de atividade, à temperatura de ebulição de 160°C. Sob a influência da luz, as soluções aquosas escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, entretanto, sem que haja modificação das suas propriedades tóxicas (BRAZIL ; VELLARD, 1926).

As principais toxinas do veneno bruto de sapos são classificadas em dois grupos: derivados esteróides e compostos básicos. No primeiro estão os bufadienólídeos e as bufotoxinas; no segundo, as aminas biogênicas e as bufoteninas. Os derivados esteróides são os responsáveis pelos efeitos cardiotoxicos, com ação digitálicos-símile, e os compostos básicos agem no sistema nervoso autônomo simpático e no sistema nervoso central (BICUDO, 2003). Diversos bufadienólídeos já foram extraídos do veneno de *Rhinella schneideri* (ZELNIK et al., 1963).

Os glicosídeos cardíacos têm sido utilizados há séculos como agentes terapêuticos. Estes compostos possuem um núcleo esteroidal contendo lactona insaturada na posição C17 e um ou mais resíduos em C3 e são encontrados em muitas plantas e em várias espécies de sapos, em geral atuando para a proteção contra predadores. Todos glicosídeos cardíacos são inibidores potentes e altamente seletivos do transporte ativo de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através de membranas celulares, ligando-

se a um local específico na superfície extracitoplasmática da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (KELLY; SMITH, 1996).

Bufadienólídeos e outras moléculas que apresentam estruturas derivadas ou semelhantes foram objetos de bioensaios, os quais demonstraram efeitos biológicos importantes, que estão relacionados à estrutura da molécula. Dentre esses ensaios estão os que avaliaram suas atividades antivirais (CUNHA-FILHO et al., 2010). Outros ensaios demonstraram uma atividade muito relevante em células cancerosas incluindo as de leucemia humana HL-60 e HCT-8 (NOGAWA et al., 2001; YE et al., 2005; WU et al., 2006), de câncer de mama (MCF-7), hepatocarcinoma humano (HepG2 e Bel-7402), de pulmão (NCI-H460), renal (TK10), melanoma (UACC62), gástrico (BGC-823), entre outras linhagens tumorais (GAO et al., 2011). As atividades anticancerígenas são amplamente estudadas devido ao relevante efeito que essa classe de moléculas produz em baixas concentrações, sendo observada a indução de apoptose em células tumorais (QI et al., 2011; FORNARI-BALDO et al., 2012).

Outra ação de interesse biotecnológico observada com componentes encontrados no veneno de sapo foi sobre os protozoários *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*. Os parasitas apresentaram inibições de crescimento e até mesmo morte ao serem expostos a estas moléculas (TEMPONE et al., 2008).

Bufadienólídeos isolados do veneno de *Rhinella schneideri* demonstraram ações sobre o sistema nervoso central com potencial de inibição de crises convulsivas induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (BALDO et al., 2012).

Alguns bufadienólídeos isolados de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Toxinas extraídas de glândulas da pele de sapos da família Bufonidae.

<i>Toxinas</i>	
Arenobufagenina	Cinobufotalitoxina
Arenobufagenina hemisuberata	Desacetilcinobufotalina
Arenobufatoxina	Gamabufotalina
Argentinogenina	Gamabufotalitoxina
Bufalina	Hellebrigenina
Bufalina hemisuberata	Hellebritoxina
Bufalitoxina	Marinobufagina
Bufotalina	Ácido Marinóico
Bufotalinina	Marinosina
Bufotalona	Resibufagina
Cinobufagenina	Resibufagenol
Cinobufagenina hemisuberata	Resibufagenina
Cinobufagina	Resibufotoxina
Cinobufotoxina	Telocinobufagenina
Cinobufotalina	Vulgarobufotoxina

*Baseado em Steyn e Heerden, 1998.*

O veneno de sapo, antes utilizado por indígenas como alucinógeno durante seus rituais, ou mesmo para a caça, ainda hoje é utilizado tradicionalmente por chineses em drogas como o Chansu (medicamento preparado a partir da pele seca de sapos), no tratamento de doenças cardíacas, como expectorante, diurético e até mesmo como remédio para dor de dente. Recentemente, pesquisadores têm observado o potencial antitumoral de produtos naturais usados na medicina tradicional chinesa (TCM). *Bufo bufo gargarizans* Cantor é uma espécie de sapo e mostrou ser fonte de alguns medicamentos chineses, como o Chansu e o Huachansu, (também conhecido como Cinobufacini), que é o extrato estéril solúvel em água contendo o Chansu. O uso do Huachansu foi aprovado pela Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) (ISO9002) e tem sido amplamente utilizado para tratar pacientes com vários tipos de câncer em clínicas oncológicas na China (Qi et al., 2011). Os seus principais componentes químicos biologicamente ativos são glicosídeos cardíacos esteroidais, tais como bufalina, resibufogenina, cinobufagina, cinobufotalina, marinobufagina, bufotalin, e alcalóides indólicos (bufotenina, bufotenidina, cinobufotenina e serotonina) (SU et al, 2003). Vários

estudos *in vitro* demonstraram que o Huachansu exerce atividade antitumoral em várias linhagens de células tumorais e que é capaz de inibir a proliferação celular, induz a diferenciação das células, a apoptose e interfere no ciclo celular. Estudos *in vivo* demonstraram a sua capacidade para inibir a angiogênese do tumor, reverter a resistência a múltiplas drogas e regular a resposta imune (ZHU, 2006).

Outros estudos *in vitro* demonstraram que o Huachansu inibiu a proliferação celular em hepatocarcinoma humano (SMMC-7721), gástrico (MKN45) e células de câncer do cólon (Lovo) e induziu apoptose em células de carcinoma gástrico MGC-80-3 (ZUO et al., 2003a). Huachansu inibiu o crescimento das linhagens de células humanas MGC-80-3 e SMMC-7721 através da parada da fase S do ciclo celular e inibição da expressão de Bcl-2 (ZUO et al., 2003b). Também inibiu a biossíntese de DNA e de RNA em células de hepatoma de ascite (H22 HA) de modo dose-dependente (GUAN et al., 1993). Além disso, quando células de câncer de mama humano (FBC-7) e células de câncer de pulmão (A549) foram tratadas com Huachansu, a droga inibiu significativamente o crescimento das células A549, mas não as células BCF-7, o que sugere que a atividade antiproliferativa de Huachansu pode ser específica para cada tipo celular (LIU et al., 2002).

A toxicidade de Huachansu foi avaliada em um estudo clínico de Fase I, realizado por Meng e colaboradores (2009). A dose típica usada na China é de aproximadamente 15 mililitros de drogas por metro quadrado de massa corporal ( $\text{mL/m}^2$ ). Neste estudo, 15 pacientes com estágio III ou IV de carcinoma hepatocelular (fígado), câncer de pulmão ou câncer pancreático receberam uma das cinco doses que variavam de 10 até  $90 \text{ mL/m}^2$  por 18 meses. Os resultados mostraram que seis doentes com carcinoma hepatocelular tinham estabilizado a doença por um período médio de seis meses e em um paciente houve uma redução de 20 por cento na massa tumoral, que durou mais de 11 meses, e nenhuma toxicidade cardíaca significativa foi observada. Assim, este estudo mostrou que o Huachansu tem níveis de toxicidade toleráveis, mesmo em doses seis vezes superiores às normalmente administradas, e pode retardar a progressão da doença em alguns pacientes com câncer.

Outro estudo avaliou 15 estudos clínicos randomizados, usando medidas de resultados clinicamente relevantes, e focado em comparações diretas da eficiência e segurança do Huachansu combinado com quimioterapia para simples quimioterapia no câncer gástrico avançado (XIE et al., 2013). Os resultados mostraram que o

Huachansu combinado com a quimioterapia é melhor do que o tratamento de quimioterapia simples por aumentar a taxa de resposta total e a pontuação de Karnofsky, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais gastrointestinais e leucocitopenia em doentes com câncer gástrico em estágio avançado.

Pesquisadores também avaliaram a eficácia e segurança do uso de gemcitabina-oxaliplatina (GEMOX) combinado com Huachansu em pacientes com carcinoma da vesícula biliar avançado e avaliaram a qualidade de vida dos pacientes (QIN et al., 2008). Este câncer tem um prognóstico muito ruim. Não há um padrão geralmente aceito e o tempo médio de sobrevivência de pacientes com câncer avançado que recebem os melhores cuidados de suporte é de aproximadamente 6 meses. Os resultados deste estudo indicaram que a quimioterapia usando GEMOX combinado com o Huachansu é um regime eficaz para o carcinoma da vesícula biliar metastático. Os pacientes conseguem tolerá-lo bem, e as toxicidades são principalmente hematológicas e facilmente tratáveis. Se este regime combinado pudesse ser aplicado na prática clínica, os pacientes teriam um tempo de sobrevida mais longo.

Bufalina, resibufogenina, e cinobufagina são os três principais glicosídeos cardíacos dos quais a atividade antitumoral do Huachansu podem ser atribuídos (SU et al., 2003).

Bufalina é o principal componente imunorreativo digoxina-like do Chansu e demonstrou ser capaz de inibir o crescimento, a parada do ciclo celular e a apoptose em células tumorais. Bufalina inibiu a proliferação celular *in vitro* de células de câncer do endométrio e de câncer de ovário por parada em G0/G1 do ciclo celular e induzindo a apoptose. Demonstrou pouco efeito sobre as células epiteliais endometriais normais humanas, o que sugere que os efeitos da bufalina podem ser específicos para cada tipo de célula e poderia ser menor sobre o endométrio normal (TAKAI et al., 2012). A bufalina também inibiu a proliferação de células MGC803 de câncer gástrico, de modo que em concentrações mais baixas induziu a parada do ciclo celular em fase M, e em concentrações mais elevadas induziu apoptose (LI et al., 2009). A bufalina apresentou atividade antitumoral significativa *in vitro* em carcinoma hepatocelular, leucemia, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de cólon, osteossarcoma e câncer de bexiga, induzindo a apoptose nas células por diferentes vias (TAKAI et al., 2012). Vários estudos pré-clínicos indicaram que a bufalina exerce a inibição do crescimento, a parada do ciclo celular e induz apoptose

em cânceres ginecológicos, gástrico, próstata, fígado, leucemia, melanoma, câncer de pulmão, câncer da mama, cólon e osteosarcoma (MIAO et al., 2013).

A cinobufagina representa de seis a sete por cento do Chansu e é capaz de inibir o crescimento de células tumorais por indução de apoptose através de vias diferentes em linhagens celulares tumorais humanas: HCT 116 (cólon), HT29 (cólon), A431 (pele), PC3 (próstata), A549 (pulmão), Spc-A1 (pulmão) e MCF-7 (mama) (LI et al., 2013).

A resibufogenina inibiu a proliferação de células cancerígenas do fígado SMMC-7721 e BEL-7402 de modo dependente do tempo, e induziu parada do ciclo celular em fase G2/M em células SMMC-7721 (XIE et al., 2012).

Levando-se em conta os estudos realizados até o momento utilizando venenos de sapos, pode se concluir que os compostos presentes nas secreções possuem atividade antitumoral potente, exercendo funções pró-apoptóticas e um efeito inibidor sobre uma ampla variedade de células cancerosas. Huachansu e seus bufadienólídeos ativos devem ser estudados mais profundamente, e são excelentes candidatos para se tornar uma nova terapia clínica para tratar o câncer e pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## **1.2. Fisiopatologia do Câncer**

O câncer é uma doença complexa multifatorial da célula. As células transformadas não são limitadas por controles de crescimento, que regulam a proliferação de células normais. Hoje em dia, a quimioterapia é uma das ferramentas mais importantes e fundamentais para o tratamento do tumor. No entanto, os atuais agentes quimioterápicos têm se mostrado ineficazes para certos tipos de câncer e têm causado muitos efeitos secundários para pacientes (LU et al., 2010).

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento de células transformadas. Existem quase 200 tipos que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (INCA, 2002).

A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos), sendo que em ambos os casos verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não-mutagênicas

(epigenéticas) nas células. O tempo para a carcinogênese ser completada é indeterminável, em alguns casos são necessários muitos anos para que se verifique o aparecimento do tumor. A carcinogênese pode ser interrompida em qualquer uma das etapas, se o organismo for capaz de reprimir a proliferação celular e de reparar o dano causado ao genoma (INCA, 2002).

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogenes. Quando sofrem mutações, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais (ALMEIDA et al., 2005). Do mesmo modo, mutações em genes supressores de tumor, que impediriam a progressão do ciclo celular, acabam por facilitar o crescimento de células anormais (FOSTER, 2008). O processo de carcinogênese, em geral, se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor (ALMEIDA et al, 2005).

As alterações essenciais que levam à carcinogênese são: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da apoptose, defeitos no reparo do DNA, potencial infinito de replicação, angiogênese mantida e capacidade de invadir e metastatizar (KUMAR et al., 2005).

As células alteradas se comportam de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos. Elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (SPENCE; JONHSTON, 2001).

O câncer é a segunda causa de morte por doença, no Brasil. Os motivos que levam ao grande número de casos são o aumento da expectativa de vida da população em geral, associada à maior exposição a fatores de risco. O tipo de câncer que mais cresce é o de pulmão, em consequência da propagação do hábito

de fumar e da poluição ambiental (IBGE, 2014). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2016, o surgimento de 596 mil novos casos no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente para ambos os sexos, seguido de câncer de próstata e mama, para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2016).

Existem três tipos principais de tratamento para o câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase. No caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso de outros tipos conjuntos de terapia (MURAD; KATZ, 1996), incluindo o transplante de medula. O tratamento por radiação é sujeito a severas limitações (MURAD; KATZ, 1996) e a quimioterapia possui muitos efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade às infecções (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A carcinogênese e o estudo do comportamento das células tumorais podem ajudar no desenvolvimento de novas terapias na luta contra o câncer. Substâncias capazes de induzir apoptose preferencialmente em células neoplásicas são promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos.

Desta forma, torna-se necessária a busca por novos compostos com ação anticancerígena, de forma que atuem em células tumorais com mais especificidade do que em células saudáveis, de forma a diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia dos tratamentos antitumorais.

### **1.3. Carcinoma Hepatocelular**

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o tumor primário maligno hepático mais comum. Sua incidência e prevalência são globalmente heterogêneas, com taxas mais elevadas no Sudeste da Ásia e África Subsaariana. Em nações industrializadas do Ocidente sua incidência tem aumentado significativamente ao longo das últimas três décadas. Sua heterogeneidade global é, em parte, um reflexo da distribuição global de seus fatores de risco. Seu prognóstico é muito ruim com uma sobrevida de 11% em 5 anos. O único tratamento potencialmente curativo é cirúrgico, com ressecção ou transplante hepático. No entanto, a maioria dos pacientes com HCC são diagnosticados em estágio avançado em que terapias cirúrgicas não são viáveis. O HCC é considerado um tumor resistente à quimioterapia (BLECHACZ; MISHRA, 2013).



O HCC é refratário à quimioterapia citotóxica convencional, à quimioterapia adjuvante usando doxorrubicina, cisplatina, fluorouracilo, interferon, epirubicina, ou taxol, como agentes únicos ou em combinação, e, portanto, não produz nenhum benefício decisivo de sobrevivência. Acredita-se que o desenvolvimento e progressão de HCC se correlacionam com a perda de controle da proliferação de células cancerosas e da morte celular programada (apoptose). Manipular esse equilíbrio poderia, portanto, fornecer benefícios clínicos significativos (ARAVALLI; STEER; CRESSMAN, 2008). Por exemplo, o sorafenib, um inibidor de receptor tirosina quinase, foi aprovado pela FDA para pacientes com carcinoma hepatocelular avançado. Um grande estudo randomizado de fase III de pacientes com HCC avançado comprovado por biópsia, demonstrou que o sorafenib melhorou tanto a sobrevivência quanto o tempo total de progressão em comparação com o placebo (LLOVET, 2008; RIMASSA; SANTORO, 2009). O mecanismo de ação deve-se à capacidade do sorafenib em inibir o crescimento de células tumorais e aumentar a apoptose (KELLEY; VENOOK, 2008).

Nos últimos anos, tem sido provado que alguns medicamentos chineses tradicionais (TCMs) têm um efeito acentuado sobre o tratamento de carcinoma hepatocelular, com vantagens únicas, e ganharam aceitação generalizada como um tratamento seguro, eficaz e paliativo na China. O Delisheng, um medicamento da Medicina Tradicional Chinesa (TCM), composto principalmente de toxinas derivadas do veneno de sapos do gênero *Bufo*, exerce atividades anti-proliferativas, citotóxicas e pró-apoptóticas em células HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), e tem sido utilizado no tratamento contra o câncer de fígado, obtendo resultados promissores (LU et al., 2010). Para este fim, a identificação de novos agentes com atividades farmacológicas semelhantes poderia promover o desenvolvimento de novos regimes terapêuticos para o HCC.

#### **1.4. Ciclo Celular**

A proliferação celular é um fenômeno altamente sofisticado que envolve proteínas reguladoras, incluindo as ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK), as suas proteínas substratos, e os inibidores de CDK (CKI) (GOLIAS et al., 2004). Em neoplasias, os genes que regulam a proliferação celular, apoptose e diferenciação são alterados e os mecanismos de controle são perdidos. As ciclinas ligam-se às CDKs formando o complexo ciclina-CDK, que ativa o ciclo celular

através da fosforilação do subconjunto de genes alvo. Em particular, a ciclina D (D1, D2 e D3) modula a transição de fase G1/S através da ativação das quinases dependentes de ciclina levando à fosforilação da proteína retinoblastoma. Complexos ciclina D - CDK4/6 ativam ciclina E /CDK2 através de titulação dos inibidores de CDK p21Cip1 e p27Kip1, resultando na progressão do ciclo celular da fase G0-G1 para a fase S (MASSAGUE, 2004). A amplificação ou superexpressão de ciclina D tem sido frequentemente observada na ocorrência de diferentes tipos de câncer (DIEHL, 2002). Além disso, p27, um membro da família Kip / Cip de CKIs, liga-se e impede a ativação da ciclina E-CDK2, controlando deste modo a progressão do ciclo celular na fase G1 (SHERR; ROBERTS, 1999). Portanto, o p27 tem sido considerado como um gene supressor de tumor. A disfunção de p27 provoca sobreativação do ciclo celular e contribui para o desenvolvimento de diversos tumores (FERO et al., 1996). A proliferação da célula cancerosa pode também ser regulada por apoptose, bem como através do controle do ciclo celular.

Ao contrário das células normais, as tumorais mostram fácil adaptação às condições de cultivo em garrafas de plástico, mantendo um ritmo de divisão celular constante e por tempo indefinido. Isto se deve ao fato de que a grande maioria das células neoplásicas apresentam a telomerase na forma ativa, o que resulta na divisão celular infinita (imortalização). As células somáticas normais, após um número limitado de divisões celulares, deixam de se dividir e entram em estado de repouso ou senescência, devido ao encurtamento dos telômeros (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A periodicidade do ciclo celular pode ser visto como uma sequência de eventos ativados conforme a necessidade do organismo. A atividade do ciclo celular pode ser tão curta como 10 minutos por ciclo ou tão longa como 48 horas, dependendo da espécie e da fase de desenvolvimento. Um componente crítico do ciclo celular é a capacidade para cessar a atividade replicativa e ficar em repouso. As células podem, em seguida, reentrar no ciclo celular se for estimulada. As células cancerígenas perdem a capacidade de ficar na fase de repouso (G0) (DOUGLAS; HADDAD, 2003). O ciclo celular pode ser dividido basicamente em duas fases: interfase e mitose. A interfase é subdividida em G1, S e G2. Em G1, os genes necessários para a replicação do DNA são ativados e as proteínas agentes de progressão para a fase S são acumuladas. Na subfase S, ocorre a replicação do DNA e em G2 há o acúmulo das proteínas necessárias para a mitose (DOUGLAS;

HADDAD, 2003). Durante a progressão do ciclo celular, ocorrem os pontos de checagem (*checkpoints*), onde o material genético é verificado e caso sejam detectadas alterações, são responsáveis por revertê-las. Os *checkpoints* são agentes que funcionam como supressores de crescimento e a perda ou mutação destes agentes induzem ao câncer (DOUGLAS; HADDAD, 2003). A progressão do ciclo celular é regulada essencialmente por quinases ciclina-dependentes (CDK). Cada CDK geralmente existe na forma fosforilada, associado a uma ciclina e inativa na célula. No tempo adequado do ciclo celular, o complexo ciclina/CDK é desfosforilado por Cdc25 e ativado. Cdc25A atua em ciclina E/CDK2 e é responsável pela progressão para a fase S, enquanto Cdc25C atua em ciclina B/CDK1 e é responsável pela progressão G2/M. As proteínas reguladoras dos checkpoints Chk1 e Chk2 exercem suas funções por fosforilação e inibindo estes homólogos Cdc25 (EASTMAN, 2004). Caso não seja possível reparar o DNA defeituoso, a célula é induzida à morte, por mecanismo de apoptose, ou prossegue para a fase mitose, em que as células filhas carregarão a falha genética, podendo levar ao desenvolvimento do câncer.

### **1.5. Mecanismos de morte celular: Necrose e Apoptose**

As vias de morte celular foram estudadas isoladas durante muito tempo, já que se pensava que elas representavam estados celulares exclusivos. No entanto, na década passada, muitos estudos foram realizados sugerindo que a apoptose, necrose e autofagia são frequentemente regulados por vias similares, participam de locais sub-celulares e organelas comuns, e até mesmo compartilham moléculas iniciadoras e efetoras (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose tem sido intensamente estudada nas últimas duas décadas e é amplamente reconhecida como o principal mecanismo de morte regulamentado, devido não somente a um dano celular ou stress, mas também durante o desenvolvimento normal e morfogênese (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos

maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (MAURILLO et al., 2001).

A resistência anormal à apoptose pode conduzir ao aparecimento de neoplasias e doenças autoimunes, devido a persistência de células mutantes ou transformadas (RAMENGGHI et al., 2000), enquanto que sua exacerbação acarreta o surgimento de doenças agudas neurodegenerativas e neuromusculares.

A apoptose pode ser desencadeada tanto por estímulos extrínsecos, através de receptores de morte da superfície celular, tais como TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ), Fas (CD95 / APO1) e receptores TRAIL, ou por estímulos intrínsecos através da sinalização via mitocondrial (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Em ambos os casos, a ativação de aspartil proteases de cisteína, denominadas caspases, resulta em permeabilização da membrana mitocondrial, condensação de cromatina e fragmentação do DNA, conduzindo assim à destruição da célula (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Estes eventos conferem à célula apoptótica uma morfologia distinta e característica, que inclui o arredondamento da célula de modo que o núcleo aparece picnótico, a cromatina condensa, ocorre a fragmentação do núcleo e o desprendimento de corpos apoptóticos, e a presença de vacúolos contendo citoplasma e organelas intactas.

O fenômeno da apoptose celular, quando iniciado, promove a ativação de eventos moleculares, que culminam na ativação de certas proteases, denominadas caspases, as quais são responsáveis pelo desmantelamento e morte celular (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999). As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*), pois esses domínios também existem nas caspases e a presença deles permite essa interação (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN et al., 2004). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53, que se transloca para o núcleo,

ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *Bax* (SCHULER et al., 2003).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose, que participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER HEIDEN et al., 1999). A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz à apoptose (PETROS et al., 2004). Entre as proteínas mais estudadas desta família estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula. Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (PETROS et al., 2004).

A superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (*tumor necrosis factor receptor*, rTNF) inclui diversos receptores, entre eles o rTNFR-1, Fas/CD95 e o TRAIL. Os membros da família do rTNF têm por principal característica um domínio extracelular rico em cisteína (ASHKENAZI, 2002). A inativação funcional dos rTNF com domínios de morte pode participar dos processos de tumorigênese, através da via extrínseca da apoptose, ou como elemento regulador do sistema imune. O receptor e ligante CD95 desempenham um papel importante na apoptose durante a morte de células T maduras no final da resposta imune e na morte de células infectadas por vírus. Foi observada uma correlação entre os níveis séricos de Fas/CD-95 solúvel e a incidência de linfomas. A explicação para este achado é de que o Fas/CD-95 solúvel compete com o ligante natural inibindo a apoptose (KRAMMER, 2000). Também foi demonstrado que mutações que afetam a

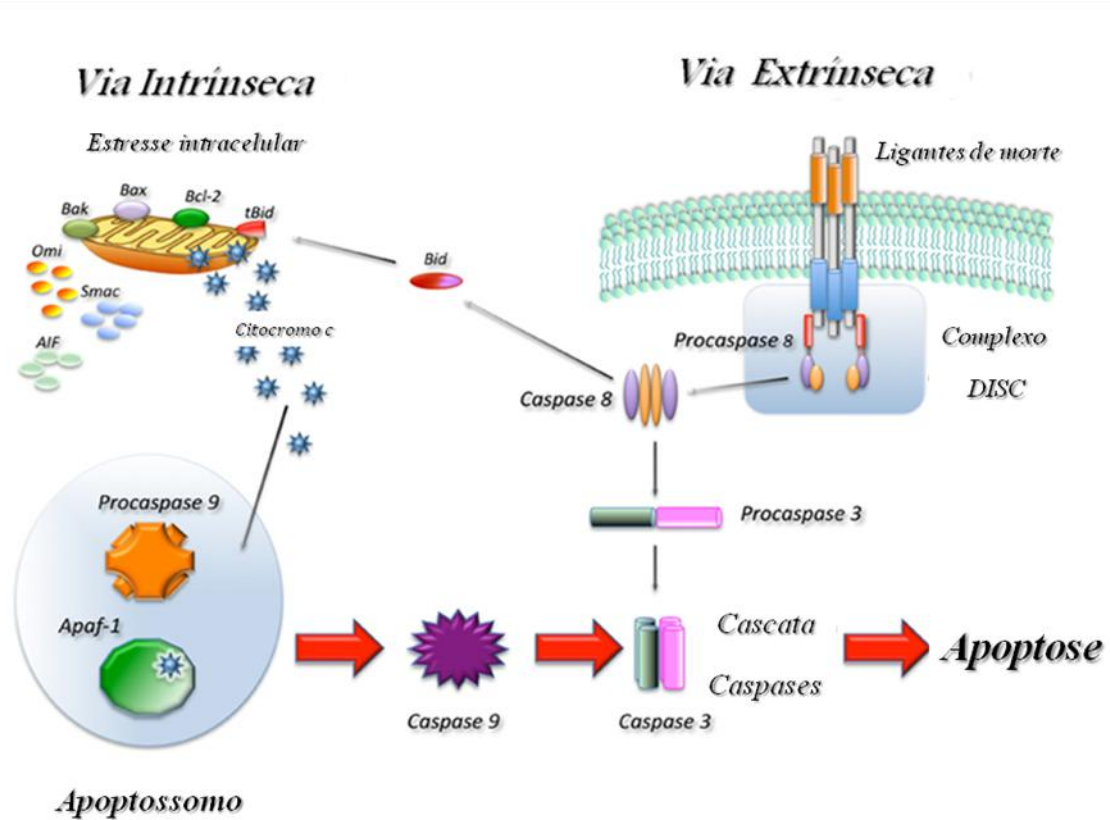
funcionalidade do Fas/CD-95 estão associadas a um efeito protetor da tumorigênese (FULDA; DEBATIN, 2006).

Ao entrar em apoptose, podem-se observar características muito marcantes do processo de morte programada como: redução do tamanho da célula (retração da célula), citoplasma denso, organelas fortemente compactadas, condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear, formação de *blebs* (prolongamentos da membrana celular), externalização da fosfatidilserina na membrana, aumento de número e tamanho dos *blebs* que se rompem formando assim os corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos sem causar inflamação (GRIVICICH et al., 2007; ELMORE, 2007; McHUGH; TURINA, 2006). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 (ou 185) pares de base.

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial).

A via extrínseca (Fig. 4) é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIARDJO et al., 1999). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular". Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8, que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (NAISMITH; SPRANG, 1998).

A via intrínseca (Fig. 4) é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000).



**Figura 4.** Vias de ativação da apoptose. *Adaptado de FAVALORO et al., 2012.*

Os sinais de morte, quando alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\psi$ ), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). A água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GUPTA, 2003). Além disto, a indução do  $\Delta\psi$  e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER; REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do  $\Delta\psi$ . A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, sabe-se que as EROS induzem a ativação das caspases 9 e 3 (GOTTLIEB, 2001). Alguns estudos indicam que durante o processo apoptótico ocorre a formação de um megaporo que abrange as membranas interna e externa da mitocôndria, ocorrendo

a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose (WETZEL; GREEN, 1999). Estes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003). No citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai resultar na apoptose (PETROS, 2004; RUPNARAIN et al., 2004).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer.

Considerando os estudos realizados até o momento que demonstraram que venenos de sapos podem induzir apoptose em uma ampla variedade de células cancerosas, o presente trabalho visa isolar toxinas presentes no veneno de *Rhinella schneideri* e avaliar suas ações sobre diversas linhagens tumorais, visando a identificação e caracterização de moléculas com uso potencial em terapias antitumorais.



# *Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

A fração de baixa massa molecular do veneno de *Rhinella schneideri* (VRs) foi citotóxica para quatro das seis linhagens tumorais estudadas (B16F10, HepG2, HL-60 e Skbr-3) e para hepatócitos primários. A maioria dos resultados não demonstrou relação concentração-resposta, já que se trata de uma mistura complexa de toxinas, que podem interagir com as células de diferentes maneiras, e até opostas, gerando efeitos diversos.

Os experimentos mitocondriais realizados com o VRs, demonstrou que ele não interfere nos parâmetros bioenergéticos de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos saudáveis, e também não alterou negativamente os parâmetros oxidativos. Ao contrário, o VRs demonstrou característica antioxidante ao diminuir o acúmulo de EROs quando induzidos por t-butil hidroperóxido, por mecanismo ainda desconhecido.

Por demonstrar citotoxicidade em hepatócitos primários e não interferir nos principais parâmetros mitocondriais, sugere-se que o VRs não atue diretamente sobre a mitocôndria, e a sinalização inicial para morte nestas células não acontece via mitocondrial. Não existem estudos publicados analisando os efeitos diretos sobre mitocôndrias de secreções de venenos de sapos ou toxinas isoladas, portanto não foi possível comparar os resultados obtidos com dados da literatura.

As toxinas Rs1 e Rs3, isoladas por cromatografia de fase reversa demonstraram ser citotóxicas às células tumorais HepG2 e pouco interferiram na viabilidade celular de hepatócitos primários, característica extremamente importante para uma possível ação antitumoral.

Estas toxinas foram capazes de induzir a dissipação do potencial de membrana, e também causaram a condensação da cromatina e fragmentação nuclear, características de células em apoptose. A análise da distribuição do ciclo celular em células HepG2 após o tratamento com Rs1 e Rs3, demonstrou que estas toxinas interferem na progressão do ciclo celular. Os ensaios realizados com anexina V e PI, demonstram que ambas as toxinas são capazes de induzir as células HepG2 à morte, principalmente pelo processo de apoptose. E os ensaios de ativação de caspases 3, 8 e 9 confirmaram a ativação da apoptose, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca.

Os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade revelaram que ambas as toxinas não causaram danos ao DNA das células HepG2.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo indicam a seletividade dos efeitos citotóxicos das toxinas Rs1 e Rs3 pelas células tumorais HepG2, induzindo estas células à morte principalmente por apoptose, evidenciando o potencial uso destas duas toxinas em terapias antitumorais.

# *Referências*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **Febs Lett.**, v.68, p.191-197, 1976.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, no. 1, 118-129, 2005.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R.. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.32, n.9, p.1053-61, 1999.

AMES, B.N. et al., Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 134, p.111-116, 1983.

ANJOLETTE, F.A.P.; LEITE, F.P.; BORDON, K.C.F.; AZZOLINI, A.E.C.S.; PEREIRA, J.C.; PEREIRA-CROTT, L.S.; ARANTES, E.C. Biological characterization of compounds from *Rhinella schneideri* poison that act on the complement system. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (Online), v. 21, 1-12, 2015.

ARAVALLI, R.N.; STEER, C.J.; CRESSMAN, E.N. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 48, p. 2047–2063, 2008.

ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, 420-30, 2002.

BALDO, E.C.F.; ANJOLETTE, F.A.P.; ARANTES, E.C.; BALDO, M.A. Toad poison and drug Discovery. *In: Toxins and Drug Discovery*, 1<sup>a</sup> ed., editora Springer, p. 1-22, 2015.

BALDO, M.A. Caracterização estrutural e estudo do perfil neurofarmacológico de substâncias isoladas do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae). Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 2015.

BALDO, M.A.; LIBERATO, J.L.; GODOY, L.D.; SANTOS, W.F.; ARANTES, E.C. New perspective for therapy against seizures using molecules from *Rhinella schneideri* toad poison. **Toxicon**, v. 60, 95-248, 2012.

BATISTA, R.C.; DE-CARVALHO, C.B.; FREITAS, E.B.; CUNHA FRANCO, S.C.; BATISTA, C.C.; COELHO, W.A.; FARIA, R.G. Diet of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) (Anura: Bufonidae) in the Cerrado, Central Brazil. **Herpetology Notes**, v. 4, p. 017-021, 2011.

BEDFORD, P.G.C. Toad venom toxicity and its clinical occurrence in small animals in the United Kingdom. **Vet. Rec.**, v.94, n.26, p.613-614, 1974.

BERS, D. M. Digitalis and Na/Ca exchange: old dog learns new mitochondrial tricks. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 5, p. 713-4, 2010.

BICUDO, P. L. Envenenamentos em animais domésticos sobre causados por serpentes, artrópodes e sapos. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo, Sarvier, p.437-449, 2003.

BLECHACZ, B.; MISHRA, L. Hepatocellular carcinoma biology. **Recent Results Cancer Res.**, 190, p. 1-20, 2013.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**,v. 15, 725-31,2003.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.39, n.11, p.615-647, 2003.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E. L. I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Métodos de laboratório em bioquímica. 1ª Ed, Manole, São Paulo, 2003, cap. 9, p. 227-246, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, pp.248-54, 1976.

BRAYLAN, R.C.; BENSON, N.A.; NORSE, V.; KRUTH, H.S. Correlated analysis of cellular DNA membrane antigens, and light scatter of human lymphoid cells. **Cytometry**. 2(5), p. 337-343, 1982.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo dos Batrachios. **Memórias do Instituto de Butantan**, v. 3, p. 7-70, 1926.

BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**,15:269-90, 1999.

CAIN, K.; SKILLETER., D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.

CÂMARA, R.L.B.; ROSELINO, J.E.S.; COLLI, B.O. *Swelling* mitocondrial em amostras teciduais de gatos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. **Acta Cir. Bras.**, vol.16, suppl.1 São Paulo, 2001.

CARLOTTI JUNIOR, C.G.; COLLI, B.O.; KAZUO, J.Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial: modelo experimental. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**,vol.59, n.2B, pp. 365-371, 2001.

ÇAVAS, T. C.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, 22, 263–268, 2007.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv.Enzymol.**, New York, v.17, p.65-134, 1956.

CHI, H. T; HUNG M D.Z.; HU, W.H.; YANG, D.Y. Prognostic implications of hyperkalemia in toad toxin intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v.17, p.343-346, 1998.

CHOI, J. Y.; CHO, H.-J.; HWANG, S.-G.; KIM, W.-J.; KIM, J.-I.; UM, H.-D.; PARK, J. K. Podophyllotoxin acetate enhances g-ionizing radiation-induced apoptotic cell death by stimulating the ROS/p38/caspase pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 111-118, 2015.

CIANCIO, G.; POLLACK, A.; TAUPIER, M.A. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. **J. Histochem. Cytochem.**, 36(9):1147-52, 1988.

CLARKE, B.T. The Natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol. Rev.**, United Kingdom, v.72, p. 366-379, 1996.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, p. 647-656, 2002.

CRISMAN, H.A.; STEINKAMP, J.A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cell from large mammalian cell populations. **J. Cell Biol.**, 59: 766, 1973.

CUNHA-FILHO, G. A., et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 338-49, 2010.

DAVID, J. A. O. Estudo de *Mytella falcata* (mollusca, bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de Santos, SP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, 2007.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, 89(2):271-7, 1986.

DIEHL, J.A. Cycling to cancer with cyclinD1. **Cancer Biol. Ther.**, 1, 226–231, 2002.

DOUGLAS, R.M.; HADDAD, G.G. Invited Review: Effect of oxygen deprivation on cell cycle activity: a profile of delay and arrest. **J. Appl. Physiol.**, 94: 2068–2083, 2003.

EASTMAN, A. Cell Cycle Checkpoints and Their Impact on Anticancer Therapeutic Strategies. **Journal of Cellular Biochemistry**, 91:223–231, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, 35, p.495–516, 2007.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.850, p.436-448, 1986.

FAN, L.; MA, Y.; LIU, Y.; ZHENG, D.; HUANG, G. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 743, p. 79-88, 2014.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**, 4(5), 330-49, 2012.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERO, M.L.; RIVKIN, M.; TASCH, M.; PORTER, P.; CAROW, C.E.; FIRPO, E.; POLYAK, K.; TSAI, L.H.; BROUDY, V.; PERLMUTTER, R.M.; KAUSHANSKY, K.; ROBERTS, J.M. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. **Cell**, 85,733–744, 1996.

FORNARI-BALDO, E.C.; ANJOLETTE, F.A.P.; ARANTES, E.C.; BALDO, M.A. Toad poison and drug Discovery. *In: Toxins and Drug Discovery*. Springer Netherlands. No prelo.

FORNARI-BALDO, E.C.; SILVA, C.P.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Evaluation of the cytotoxic activity of *Rhinella schneideri* toad poison on tumor cells and on healthy mononuclear cells. **Toxicol**, v. 60, 103-103, 2012.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**,14, 144-149,2008.

FROST, Darrel R. 2016. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (1 July 2016). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, 25:4798-811, 2006.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPPB, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Nat. Prod. Rep.**, 28, 953, 2011.

GHAVAMI, S. et. al. Brevinin 2R(1) Semi-selectively Kills Cancer Cells By A Distinct Mechanism, Witch Involves Lysosomal-mitochondrial Death Pathway. **J. Cell. Mol. Med.**, 12, 1005, 2005.

GOLIAS, C.H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. **Int. J. Clin. Pract.**, 58, 1134–1141, 2004.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**,10:147-61, 2001.



GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3), p.335-343, 2007.

GUAN, J.; ZHAO, X.H.; JIANG, B.S.; CHEN, Z.W.; QIN, Q.Y. Preliminary study on the antitumor mechanism of cinobufacini injection. **Journal of Bengbu Medical College**, v. 18, p. 78–81, 1993.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int. J. Oncol.**, 22:15-20, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York., 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p. 57, 2000.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407:770-76, 2000.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.74, p.214-226, 1976.

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA-IEAJ/a-celula-apoptotica-aula-13-biologia-celular-ii-cederj> (acessado em 20/11/2014)

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR> (acessado em 20/11/2014)

HUANG, W. W. et al. Bufalin induces G(0)/G(1) phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. **Mutat. Res.**, v. 732, n. 1-2, p. 26-33, 2012.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death And Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277-288, 2002.

IMBERTI, R.; NIEMINEM, A. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide:protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 265, 392-400, 1993.

INCA, 2016. *Incidência de câncer no Brasil*. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. **Instituto Nacional de Câncer** (acessado em 20/06/2016).

INCA. Fisiopatologia do câncer. In: Políticas Públicas de Saúde. 2. ed. Rio de Janeiro. p. 49-77, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil, 2014. Disponível em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) (acessado em 10/06/2016).

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, 2014. Disponível em [www.inca.gov.br/estimativa](http://www.inca.gov.br/estimativa). Acessado em 15/02/2014.

JARED, C.; ANTONIAZZI, MM. Anfíbios: biologia e seus venenos. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad, Jr. V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, 498: 61-77, 2001.

KELLEY, R.K.; VENOOK, A.P. Sorafenib in hepatocellular carcinoma: Separating the hype from the hope. **J. Clin. Oncol.**, v.26, p.5845–5848, 2008.

KELLY, R.A.; SMITH, T.W. Tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição, MacGraw-Hill, 1996.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, 26, 239, 1972.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-57, 1972.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 27–45, 2002.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology** 198 (1–3), 315–328. 2004.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUD, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, 402:185-202. 1998.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, 209: 497–499. 1980.

KNOWLES, R.P. Toad poisoning in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.163, p.1202, 1968.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, 407:789-95, 2000.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**,6:513-16, 2000.

- KUMAR V.; ABBAS A.K.; FAUSTO N. "In: Patologia – Bases patológicas das doenças". 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier;. 281-356, 2005.
- LAMBERTON, J.A.; MORTON, T.C. The epoxy lactone ring of the coumarin micromelin: Formation of a new epimer. **Aust. J. Chem.**, 38, 1025,1985.
- LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y.J.; HAN, K.S.; CHUNG, H.W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of ChanSu, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 372–376, 2014.
- LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *The American Journal of Physiology*, Washington, v. 276, n. 1, p. G1-G6, 1999.
- LEMASTERS, J.J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B.B. Free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, v.325, p.78-81, 1987.
- LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Review Drug Discovery**. v. 2, 790-802, 2003.
- LI, C.; HASHIMI, S.M.; CAO, S.; MELLICK, A.S.; DUAN, W.; GOOD, D.; WEI, M.Q. The Mechanisms of Chansu in Inducing Efficient Apoptosis in Colon Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-11, 2013.
- LI, D.; QU, X.; HOU, K. PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 20, p. 59-64, 2009.
- LIU, B.R.; XU, X.L.; LIU, W.C.; MENG, X.Z. Effects of four extracts of traditional Chinese medicinal materials on the proliferation of human lung cancer A549 cell line. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 18, p. 94–96, 2002.
- LIU, T.; BROWN, D. A.; O'ROURKE, B. Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 49, n. 5, p. 728-36, 2010.
- LLOVET, J.M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J.-F.; DE OLIVEIRA, A.C.; SANTORO, A.; RAOUL, J.-L.; FORNER, A. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N. Engl. J. Med**, 359, p.378–390, 2008.
- LU, C; NAN, K.; NIE, Y.; HAI, Y.; JIAO, M. Delisheng, a Chinese medicinal compound, exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HepG2 cells trough extrinsic and intrinsic pathway. **Mol. Biol. Rep.**, 37:3407-3412, 2010.
- MACHADO, A. E. D. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, 23, 237, 2000.
- MAMELAK, A. N. et. al. Phase I single dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. **J. Clin. Oncol.**, 24, 3644, 2006.
- MASSAGUE, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, 432, 298–306, 2004.

- MATSUMOTO, S. T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.
- MAURILLO, L.; POETA, G. D. ; VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; BATTAGLIA, A.; SANTINELLI, S. Quantitative analysis of FAS and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**, Pavia, v.86, n.3, p.237-243, 2001.
- MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.
- McHUGH, P.; TURINA, M. Apoptosis and Necrosis: A Review for Surgeons. **Surgical Infections (Larchmt)**, 7(1), p.53-68, 2006.
- MEBS, D. Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002.
- MEBS, D., et al. Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. **Toxicon**, v. 46, p. 641-650, 2005.
- MELO, J. U. S. et al. O estresse oxidativo na regeneração hepática em ratos. **Ver. Col. Bras. Cir.**, v.35, n.6, 2008.
- MENG, Z.; YANG, P.; SHEN, Y.; BEI, W.; ZHANG, Y.; GE, Y.; NEWMAN, R.A.; COHEN, L.; LIU, L.; THORNTON, B.; CHANG, D.Z.; LIAO, Z.; KURZROCK, R. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, 115(22), p. 5309–5318, 2009.
- MIAO, Q. et al. Anticancer Effects of Bufalin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells: Roles of Apoptosis and Autophagy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 1370-82, 2013.
- MINGATTO, F.E., et al. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 303, n.2, p. 601-607, 2002.
- MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.S.; FERREIRA, L.B.; SANTOS, W.F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics**, 114, p. 171-183, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MURAD, A.M.; KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento. Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41, 1996.
- NAHLE, Z.; POLAKOFF, J.; DAVULURI, R. V.; MCCURRACH, M. E.; JACOBSON, M. D.; NARITA, M.; ZHANG, M. Q.; LAZEBNIK, Y.; BAR-SAGI, D.; LOWE, S. W.

Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 859-864, 2002.

NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem. Sci.**, 23:74-79, 1998.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1833, 3448–3459, 2013.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTITL, G. R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Chan Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148–1152, 2001.

OLIVEIRA, H. C., et al., Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, p.278-280, 2005.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Quim. Nova**, 25, 976, 2002.

PABLA, N.; DONG, Z. Curtailing side effects in chemotherapy: a tale of PKC $\delta$  in cisplatin treatment. **Oncotarget**, v. 3, 107-111, 2012.

PARK, J.W.; LEE, S.Y.; YANG, J.Y.; RHO, H.W.; PARK, B.H.; LIM, S.N.; KIM, J.S.; KIM, H.R. Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the dimerization of lipoprotein lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1344 (2): 132–8, 1997.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1451-1461, 2003.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Meth. Cell. Biol.**, v. 20, p.411- 481, 1978.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, 1644:83-94, 2004.

PIETENPOL, J.A.; STEWART, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. **Toxicology**, 181/182, p. 475-481, 2002.

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

QIN, T.J.; ZHAO, X.H.; YUN, J.; ZHANG, L.X.; RUAN, Z.P.; PAN, B.R. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced

gallbladder carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, 14(33), p. 5210-5216, 2008.

RAJDEV, S.; REYNOLDS, I. J. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. **Neuroscience Letters**. Amsterdam, v. 162, p. 149–152, 1993.

RAMENGI, U.; BONISSONI, S.; MIGLIARETTI, G.; DEFRANCO, S.; BOTTAREL, F.; GAMBARUTO, C. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. **Blood**, Washington, v.95, n.10, p.3176-82, 2000.

REED, J.C.; GREEN, D.R. Apoptosis: Physiology and Pathology. Cambridge University Press, p.37-40, 2011.

RIMASSA, L.; SANTORO, A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: The SHARP trial. **Expert Rev. Anticancer Ther**, v. 9, p.739–745, 2009.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol. Chem.**, 385:449-64, 2004.

RUSSEL, F.E.; SOUNDERS, P.R. Animal Toxins: A collection of papers presented at the First International Symposium on Animal Toxins. New Jersey, p. 393, 1966.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. . In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220, 2003.

SBH. 2015. *Brazilian amphibians – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Captured on 22 de novembro de 2015.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J. C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell. Death. Differ.**, 10:451-60, 2003.

SCHULTZ, D. R., HARRINGTON W. J. JR. Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 32(6), p.345-369, 2003.

SCIANI, J.M.; DE-SA-JUNIOR, P.L.; FERREIRA, A.K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M.M.; JARED, C.; PIMENTA, D.C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition** 3, 10–18, 2013.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, 13, 1501–1512, 1999.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. **Braz J Med Biol Res.**,(6):733-47, 1998.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132, 2001.

SU, Y.H.; HUANG, X.Q.; ZHANG, D.Z.; ZHANG, Y.N.; XIE, J.M.; LINH, C.Q. HPLC separation and determination of bufadienolide in cinobufacini injection. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 25, p.24–27, 2003.

SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; GLODTEIN, P.; NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell.**, Cambridge, v.75, n.6, p.1169-78, 1993.

SUN, C et. al. Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles. **Nanomed**, 3, 495, 2008.

TAKAI, N.; KIRA, N.; ISHII, T.; YOSHIDA, T.; NISHIDA, M.; NISHIDA, Y.; NASU, K.; NARAHARA, H. Bufalin, a Traditional Oriental Medicine, Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 399-402, 2012.

TEMPONE, A. G., et al. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13-21, 2008.

TENNANT, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v.2, p. 685-694, 1964.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, 267,p.1456-62, 1995.

THORE, A. The technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, Stockholm, v. 26, n. 2, p. 30- 34, 1979.

TIAN, H. Y. et al. New bufadienolides and C(23) steroids from the venom of *Bufo bufo gargarizans*. **Steroids**, v. 75, n. 12, p. 884-90, 2010.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: Phillips, D. H.; Vennit, S.(Eds.). **Environmental Mutagenesis**, 315- 339, 1995.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

TOLEDO, R. C; JARED, C.; Review: Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Biochem. Physiol.**, v.111A, n.1, p.1-29, 1995.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 327-344, 2003.

VAN HEERDE, W. L.; ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA, L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A.P.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Marques of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 549-559, 2000.

VANDER HEIDEN, M. G. V.; THOMPSON, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nat. Cell. Biol.**,1:E 209-16, 1999.

VASCONCELOS, S.M.L.; SILVA, M.A.M.; GOULART, M.O.F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, p. 245-54, 1999.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 40, p.353-388, 2000.

WANG, J. K. et al. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 27, p. 10461-6, 2006.

WETZEL, E.B.; GREEN, D.R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondria frontier. **Mut. Res.**,434:243-51, 1999.

WU, P.L., et al. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *kalanchoe gracilis*. **Organic Letters**, v. 8, p. 5207–5210, 2006.

[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br) (acessado em 20/11/2014)

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** 68, 251–305. 1980.

XIE, X.; HUANG, X.; LI, J.; LV, X.; HUANG, J.; TANG, S.; SUN, Y. Efficacy and safety of Huachansu combined with chemotherapy in advanced gastric cancer: A meta-analysis. **Medical Hypotheses**, 81(2), p. 243–250, 2013.

XIE, X.B. et al. Critical role of heat shock protein 27 in bufalin-induced apoptosis in human osteosarcomas: a proteomic-based research. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 47375, 2012.

XU, Z. W. et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 125, n. 3-5, p. 181-91, 2011.

YE, M., et al. Microbial Hydroxylation of Bufalin by *Cunninghamella blakesleana* and *Mucor spinosus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 626–628, 2005.

ZELNIK, R.; ZITI, L.M.; GUIMARÃES, C.V. A Chromatographic study of the bufadienolides from the venom of the parotid glands of *Bufo Paracnemis* Lutz. **J. Chromatography**, v.16, p.9-14, 1963.



ZHANG, D. M. et al. Bufotalin from Venenum Bufonis inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 692, n. 1-3, p. 19-28, 2012.

ZHANG, D. M.; LIU, J. S.; DENG, L.J.; CHEN, M.F.; YIU, A.; CAO, H.H.; TIAN, H.Y.; FUNG, K.P.; KURIHARA, H.; PAN, J.X.; YE, W.C. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway: **Carcinogenesis**, v. 34, p. 1331-42, 2013.

ZHANG, L.S.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Res.**, v. 52, p. 4634-41, 1992.

ZHIVOTOVSKY, B.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death Differ.**, v 6(7), p. 644-651, 1999.

ZHOU, D.; WEI, A.; CAO, C.; RUAN, J. DICO, a novel nonaromatic B-ring flavonoid, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 322-329, 2013.

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

ZORATTI, M; SZABO, I, The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.

ZUO, X.; CUI, Y.; QIN, S.; CHEN, H.; WANG, J. Effect of cinobufacini on tumor cell cycle and expression of bcl-2 protein. **Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and West Medicine**, v. 6, p. 567-568, 2003b.

ZUO, X.; QIN, S.; WANG, J.; CUI, Y.; CHEN, H.Y. Research on the effect of cinobufacini on human gastric neoplasm cell line MGC-80-3. **Chinese Clinical Oncology**, v. 1, p. 33-37, 2003a.