

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**ATIVIDADE ANTICÂNCER DA BIFLORINA EM  
CÉLULAS TUMORAIS GÁSTRICAS**

**MESTRANDA: GLEYCE DOS SANTOS BARBOSA**

**MANAUS**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DA BIFLORINA EM  
CÉLULAS TUMORAIS GÁSTRICAS**



MESTRANDA: GLEYCE DOS SANTOS BARBOSA

ORIENTADOR: PROF. DRA. MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS

CO-ORIENTADOR: DRA. RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO

MANAUS

2012

**“ATIVIDADE ANTICÂNCER DA BIFLORINA EM CÉLULAS TUMORAIS GÁSTRICAS”**

GLEYCE DOS SANTOS BARBOSA

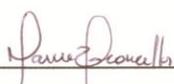
Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa Avaliação da Eficácia e Segurança de Insumos e Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.



---

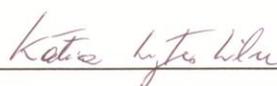
Professor Emerson Silva Lima  
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos professores:



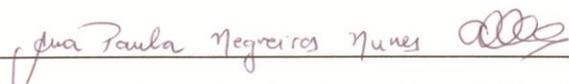
---

Doutora Marne Carvalho de Vasconcellos (UFAM) – Presidente e Orientadora



---

Doutora Kátia Luz Torres Silva (FCECON) – Membro externo



---

Doutora Ana Paula Negreiros Nunes Alves (UFC) – Membro externo

Manaus, 27 de janeiro de 2012.

*“Se o que eu sou é também  
o que eu escolhi ser,  
aceito a condição...”*

*LH*

## RESUMO

No norte do Brasil, sobretudo nos Estados do Amazonas e Pará, há alta incidência de câncer gástrico, cujos tratamentos disponíveis são ineficazes, na maioria dos casos. A biflorina, uma ortonaftoquinona prenilada obtida das raízes de *Capraria biflora* L., demonstrou, em trabalhos prévios, inibir o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro* de várias linhagens celulares, sem induzir mutagenicidade. A ACP02, principal linhagem celular utilizada nesse trabalho, foi estabelecida a partir de um adenocarcinoma gástrico difuso primário, retirado da região cárdia estomacal de um paciente de 66 anos oriundo do Pará. Entre as principais alterações cariotípicas e genéticas dessa linhagem estão a trissomia do cromossomo 8, com amplificação do oncogene *MYC*, e a deleção do braço curto do cromossomo 17, onde estaria localizado o gene supressor de tumor *TP53*. Essas características observadas na linhagem estabelecida correspondem àquelas observadas no tumor que a deu origem, evidenciando que tal linhagem é uma boa alternativa para o estudo da fisiopatologia do câncer gástrico humano e triagem de drogas. Tendo em vista o potencial promissor da biflorina e a necessidade de regionalizar o estudo de novas drogas anticâncer para atender as particularidades genóticas de cada grupo de pacientes, avaliamos a atividade da biflorina sobre ACP02 através da análise morfológica das células, dos ensaios de viabilidade celular, do ensaio clonogênico, do teste de motilidade, do teste de diferenciação celular pelo NBT e da avaliação do status de *MYC* e comprimento dos telômeros por FISH, nas concentrações de 0, 1,0, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , após 24 e 72h de tratamento. As alterações morfológicas indicaram morte celular por necrose, além de sugerirem a ocorrência de processo de diferenciação, devido à alteração no formato da célula aderida. A biflorina apresentou atividade citotóxica ( $\text{CI}_{50}$  1,92  $\mu\text{M}$ ) e atividades citostática, anticlonogênica e inibidora da motilidade *in vitro*, estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) desde a concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Houve redução significativa da taxa de amplificação de *MYC*, nas células tratadas com 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  da droga ( $p < 0,05$ ), o que pode justificar a ocorrência de processo de diferenciação celular, tendo em vista o papel fisiológico desse gene. Essa diferenciação foi confirmada pelos resultados obtidos durante o teste do NBT, no qual as células apresentaram capacidade de metabolizar o sal a partir do tratamento de 1,0  $\mu\text{M}$ . O comprimento do telômero foi reduzido nas células tratadas com 5,0  $\mu\text{M}$  de biflorina ( $p < 0,05$ ). Esses resultados demonstram que a biflorina atua sobre importantes alvos da terapia anticâncer, quando utilizada sobre a linhagem gástrica ACP02 em concentrações em torno de 2,5  $\mu\text{M}$ , o que a torna uma substância promissora para o tratamento desse tipo de tumor.

Palavras-chave: câncer gástrico; *MYC*; biflorina; diferenciação; ACP02.

## ABSTRACT

In the northern Brazil, especially in the states of Amazonas and Pará, there is a high incidence of gastric cancer which available treatments are ineffective in most cases. The biflorin, a prenylated ortanaftoquinona obtained from the roots of *Capraria biflora* L., showed, in previous studies, an inhibition of the tumor growth *in vivo* and *in vitro* in several cell lines, without inducing mutagenicity. The ACP02, main cell line used in this work, was established from a primary diffuse gastric adenocarcinoma, removed from the stomach cardia region of a 66-year-old patient born in Pará. Among the main karyotypes and genetic changes of this lineage are the trisomy of chromosome 8, with amplification of the *MYC* oncogene, and the deletion of the chromosome 17's short arm, where the tumor suppressor gene *TP53* is located. These characteristics observed in the established line correspond to those observed in the original tumor, what indicates that this line is a good alternative to the study of the human gastric cancer pathophysiology and the drug screening. Considering biflorin's promising potencial and the necessity to regionalize the study of new anticancer drugs to answer genotype particularities of each group of patients, we evaluated the activity of biflorin on ACP02 through the morphological cell analysis, the cell viability assays, the clonogenic assay, scratch assay, the cell differentiation test by NBT, the evaluation of the *MYC* status and telomere length by *FISH*, in 0, 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$  concentrations, after 24 and 72 hours of treatment. The morphological changes indicate cell death by necrosis, and suggest the occurrence of the differentiation process, due to change in the format of the attached cell. The biflorin showed a cytotoxic activity ( $\text{IC}_{50}$  1.92  $\mu\text{M}$ ) and cytostatic, anticlonogenic and antimotility activities, statistically significant ( $p < 0,05$ ) since 1  $\mu\text{M}$ . There was a significant reduction in *MYC* amplification rate in cells treated with 2.5 e 5  $\mu\text{M}$  of the drug ( $p < 0,05$ ), which can explain the occurrence of cellular differentiation process, in view of the physiological role of this gene. This differentiation was confirmed by the results obtained during the NBT test, in which the cells showed the ability to metabolize salt from a treatment of 1.0  $\mu\text{M}$ . The telomere length was reduced in cells treated with 5.0  $\mu\text{M}$  of biflorina ( $p < 0,05$ ). These results showed that biflorin acts on important targets of anticancer therapy, when used on the gastric line ACP02, at concentrations around 2.5  $\mu\text{M}$ , which makes it a promising substance for the treatment of this tumor type.

Keywords: gastric cancer, *MYC*; biflorin; differentiation; ACP02

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

5-FU – 5-fluorouracil

ACP02 – Linhagem 02 do Adenocarcinoma do Pará

CF – Cisplatina Infusional

CL50 – concentração letal 50

CONPREV – Coordenação de Prevenção e Vigilância

DMEM – *Dubelcco`s Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECF – 5-fluorouracil + Cisplatina + Epirrubicina

FISH – *fluorescence in situ hybridization*

HER2 – Fator de Crescimento Epidérmico 2

INCA – Instituto Nacional de Câncer

mg - miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

MS – Ministério da Saúde

*MYC* – gene *MYC*

myc – proteína myc

NBT – sal nitro blue tetrazólio

PBS – tampão fosfato

°C – graus célsius

TPA - 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetate

UICC – União Internacional Contra o Câncer

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago)..... - 24 -
- Figura 2:** Representação esquemática do Gene *MYC* e os exons que dão origem à proteína *myc*..... - 29 -
- Figura 3:** Complexo dimérico formado entre as proteínas *Myc* (em vermelho) e *Max* (em azul) interagindo com o DNA..... - 30 -
- Figura 4:** Consequências transcricionais dos possíveis complexos formados entre *Myc*-*Max*-*Mxi1*..... - 31 -
- Figura 5:** *Capraria biflora* L. A) folhas e flor; B) raízes..... - 38 -
- Figura 6:** Estrutura química da biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-bc]-pran-7,8-diona)..... - 39 -
- Figura 7:** Morfologia da linhagem ACP02 (em torno da passagem 55) sob microscopia invertida com contraste de fase..... - 44 -
- Figura 8:** Cariograma metafásico da linhagem ACP02 com setas indicativas das principais alterações cariotípicas observadas..... - 45 -
- Figura 9:** Redução da resazurina em resofurina, base do princípio da técnica do ensaio de viabilidade celular pelo alamar blue ..... - 48 -

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	- 9 -
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	- 13 -
2.2 Objetivos Específicos .....	- 13 -
<b>3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	- 14 -
3.1 Câncer.....	- 14 -
3.1.1 Câncer gástrico.....	- 18 -
3.2 O protooncogene <i>MYC</i> – tumorigênese e diferenciação celular .....	- 28 -
3.3 Telômero .....	- 35 -
3.4 Biflorina .....	- 37 -
3.5 Linhagem celular - ACP02.....	- 42 -
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	- 46 -
4.1 Manipulação e Manutenção da cultura celular.....	- 46 -
4.2 Citotoxicidade Celular pelo Alamar Blue.....	- 47 -
4.3 Exclusão pelo Azul de Tripán .....	- 49 -
4.4 Análise morfológica .....	- 50 -
4.5 Avaliação da sensibilidade celular pelo ensaio clonogênico .....	- 51 -
4.6 Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular <i>in vitro</i> .....	- 52 -
4.7 Ensaio de diferenciação celular pelo NBT .....	- 53 -
4.8 Avaliação do status de amplificação <i>MYC</i> e telômero por FISH .....	- 55 -
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	- 58 -
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	- 59 -
<b>CRONOGRAMA</b> .....	- 75 -
<b>ARTIGO</b> .....	- 76 -
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	- 108 -

# 1 INTRODUÇÃO

A homeostase celular é regulada por mecanismos que controlam o balanço entre proliferação, crescimento e morte celular, distúrbios nesses balanços podem resultar em hiperplasia e malignidade (FOSTER, 2008).

Câncer é uma designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda do controle da proliferação celular, transformação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástase para tecidos distantes, trata-se de células inicialmente normais que adquirem mudanças moleculares tornando-se cancerosas (HANAHAN. & WEINBERG,2011).

Desde o final dos anos 50, quando as primeiras curas reais do câncer foram obtidas com as terapias de combinação, o progresso no tratamento do câncer tem sido dolorosamente lento, com poucas e notáveis exceções. Durante os primeiros 25 anos de estudo sobre o tema, descobriu-se que o câncer é, em grande parte, causado por mutações em genes, sobretudo oncogenes e genes supressores de tumor, que controlam a proliferação, crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (CANTLEY & BASELGA, 2011).

Apesar das melhorias significativas no diagnóstico e de inovações no tratamento de tumores, o câncer continua a representar uma grande preocupação médica, delimitando a longevidade e a qualidade de vida humana, motivo pelo qual a busca incessante por novas alternativas de tratamento se faz necessária (LESZCZYNIECKA et al, 2003).

Com a evolução ocorrida no campo da genética, tem se tornado cada vez mais notório que os cânceres historicamente definidos com base no tecido de origem podem ser divididos em dezenas de subtipos quando analisados em nível molecular. Esse conhecimento começa a explicar por que dois pacientes com o diagnóstico da mesma doença muitas vezes respondem de forma tão diferente à mesma terapia (CANTLEY & BASELGA, 2011).

Dentro desse panorama está se tornando cada vez mais imprescindível a determinação, não só do poder citotóxico dos novos candidatos a drogas antitumorais, mas também a definição de seu mecanismo de ação, sobretudo no que se diz respeito a interação com alvos moleculares específicos. Sendo assim, todos os esforços que visam lançar luz sobre esse aspecto são essenciais para a aceleração nas descobertas de novas opções de tratamento (CERVANTES *et al*, 2008; YASUI, 2011).

O câncer gástrico, altamente prevalente no Brasil, destacando-se os Estados do Amazonas e Pará, constitui-se num mal prognóstico, haja visto a agressividade desse tipo de tumor, o diagnóstico geralmente tardio e as poucas chances de evolução para cura mediante os tratamentos disponíveis, motivo pelo qual a busca de novas alternativas é essencial (MEYERHARDT & FUCHS, 2002; RESENDE *et al*, 2006; RIVERA *et al*, 2007; INCA, 2010).

Tem-se demonstrado solidamente a relação entre a carcinogênese gástrica, hábitos alimentares, infecção por *Helicobacter pylori* e alterações genéticas, nas quais a superexpressão do oncogene *MYC* e a deleção ou mutação do gene supressor de

tumor *TP53*, são as mais evidentes e, aparentemente, as que conferem pior prognóstico (GREENBLATT *et al*, 1994; KOO *et al*, 2000; PANANI, 2008).

Somando-se a essas alterações mais freqüentes, há ainda a detecção de atividade da telomerase na maioria dos tumores humanos, incluindo o câncer gástrico, a qual promove e mantém o alongamento dos telômeros, colaborando para que essas células possuam capacidade replicativa indefinida (LICHTSTEINER *et al*, 2011).

Em 2009, foi estabelecida e caracterizada uma linhagem celular oriunda de adenocarcinoma gástrico de um paciente paraense de 66 anos, a ACP02. Tal linhagem compartilha de características genéticas muito semelhantes ao tumor que lhe deu origem, configurando-se numa excelente alternativa de estudo da fisiopatologia de tal tumor bem como de sua sensibilidade farmacológica (LEAL *et al*, 2009). No entanto, até o presente momento não há dados publicados a respeito da sensibilidade dessa linhagem a drogas conhecidamente antitumorais nem a novas entidades bioativas.

Nas últimas décadas a maioria dos fármacos antitumorais introduzidos na terapêutica teve sua origem nos produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007; CRAGG *et al*, 2009).

A biflorina, uma *o*-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-bc]-*pran*-7,8-diona) obtida de raízes de *Capraria biflora* L, tem demonstrado, em trabalhos prévios, alto poder de inibição de crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro*, na ausência de mutagenicidade (VASCONCELLOS *et al*, 2005; VASCONCELLOS *et al*, 2007; VASCONCELLOS *et al*, 2010; VASCONCELOS *et al*, 2011).

Considerando-se a necessidade de busca de novas alternativas de tratamento para o câncer, destacando-se o câncer gástrico cujas opções disponíveis parecem ter um papel paliativo e não curativo na maioria dos casos, e a importância de se explorar os possíveis mecanismos de ação de novas entidades bioativas, o presente trabalho visa avaliar a atividade da biflorina sobre a viabilidade celular, a atividade clonogênica, a motilidade, a diferenciação celular, o comprimento do telômero e o status de amplificação de *MYC* em células da linhagem ACP02.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial anticâncer da biflorina sobre células tumorais gástricas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da biflorina em células tumorais gástricas humanas;
- Avaliar a morfologia de células tumorais gástricas humanas tratadas com biflorina;
- Avaliar a atividade citostática da biflorina sobre células tumorais gástricas humanas;
- Avaliar a sensibilidade das células tumorais gástricas mediante tratamento com biflorina;
- Avaliar a atividade da biflorina sobre a motilidade de células tumorais gástricas humanas;
- Avaliar a indução de diferenciação celular da biflorina em células tumorais gástricas ;
- Avaliar o *status* da amplificação de *MYC* e o comprimento telomérico de células tumorais gástricas humanas após tratamento com biflorina.

### 3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

#### 3.1 Câncer

A carcinogênese é um processo complexo cuja iniciação e progressão envolvem passos em que o DNA acumula uma série de alterações, sendo muito freqüentes as metilações aberrantes e as mutações (USHIJIMA, 2007).

Essas alterações sequenciais frequentemente ocorrem em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Dentre as evidências experimentais que corroboram esta teoria está o fato da célula cancerosa ser capaz de transmitir as suas características genóticas às células “filhas” (BALMIAN *et al.*, 2003).

O processo de oncogênese resultante destas alterações culmina com o crescimento de sucessivas populações ou clones celulares nos quais as mutações se acumularam em um processo denominado expansão clonal (SILVA, 2004).

As características do câncer compreendem seis capacidades biológicas distintas e complementares adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos, a sustentação de sinais pró-proliferativos, redução dos supressores de crescimento, resistência ao processo de morte celular, imortalidade, indução de angiogênese e ativação da invasão e metástase. Sua designação tem origem latina significando “caranguejo”, em analogia ao modo de crescimento infiltrante que pode ser comparado às pernas do crustáceo, atualmente a definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, exclusivo dos tumores malignos (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Durante as duas últimas décadas houve grande avanço na compreensão das causas do câncer, em particular, sobre os genes que afetam o seu desenvolvimento. Essas conquistas possibilitam melhorias nas ferramentas para a detecção e tratamento do câncer, o que é imprescindível, uma vez que um fator importante para o êxito da terapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (ALMEIDA *et al*, 2005; MYC PROTEIN, 2011).

No entanto, em detrimento dos avanços até hoje alcançados, o câncer se mantém como uma das doenças que mais causa temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor (ALMEIDA *et al*, 2005).

Os tumores são classificados levando-se em consideração a célula normal que os originou, além de serem estadiados para facilitar a compreensão do comportamento daquele tumor (ALMEIDA *et al*, 2005).

Estadiar um caso de neoplasia maligna significa avaliar o seu grau de disseminação. Para tal, há regras internacionalmente estabelecidas, as quais estão em constante aperfeiçoamento. O estágio de um tumor reflete não apenas a taxa de crescimento e a extensão da doença, mas também o tipo de tumor e sua relação com o hospedeiro (DENOIX *apud* MÉNORE, 2002).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2009), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o

tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente.

Os fatores de risco para o câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditário, sendo os fatores ambientais, representados pelo meio em geral (água, terra e ar), o ocupacional, o sócio-cultural e o de consumo, responsáveis por cerca de 80% dos casos (BALMAIN *et al*, 2003; ALMEIDA *et al*, 2005).

Tendo em vista a importância da influência de fatores comportamentais e ambientais na tumorigênese de algumas neoplasias a questão da prevenção do câncer envolve o processo de informação da população a respeito dos comportamentos de risco e sinais de alerta. Nesse sentido as políticas de atenção básica tem papel de destaque (CESTARI, 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Ministério da Saúde/MS, através de sua Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev), é a instituição responsável pelo desenvolvimento das ações nacionais orientadas à prevenção e ao controle do câncer (INCA, 2010).

A despeito dos esforços realizados, sobretudo nos últimos 25 anos, o câncer ainda configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos, nos quais ele é a segunda principal causa de morte, como nos países em desenvolvimento, onde ele é a principal causa de morte (JEMAL *et al*, 2011).

As estatísticas mundiais mostram que no ano 2000, ocorreram 5,3 milhões de casos novos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres, e que 6,2 milhões de pessoas morreram por essa causa (INCA, 2010; JEMAL *et al*, 2011).

Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões), cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos) (INCA, 2010).

### 3.1.1 Câncer gástrico

A carcinogênese gástrica é um processo multifatorial e gradativo e inicia-se por alterações na mucosa gástrica, que adquire um fenótipo progressivamente regressivo, com substituição de células normais por aquelas que existem naturalmente no intestino (delgado e, posteriormente, grosso), no sentido inverso ao que ocorre durante o desenvolvimento fetal. Esse processo de transmutação da mucosa gástrica, em parte conhecido, ocorre a longo prazo e sugere que os fatores de risco para o câncer gástrico atuam desde a mais tenra idade e por muito tempo (BRITO *et al*, 1997).

Os tumores gástricos podem ser de quatro tipos: adenocarcinomas; linfomas; tumores do estoma gastrintestinal (GISTs) e tumores carcinóides (HALL *in* GORE, 2009).

Cerca de 90% dos tumores de estômago são adenocarcinomas, que são subdivididos em dois tipos histológicos principais: o tipo bem diferenciado, também chamado de tipo intestinal; e o tipo indiferenciado, também chamado de difuso. O tipo intestinal é descrito como sendo originado principalmente a partir de gastrites de corpo estomacal com atrofia gástrica e metaplasia intestinal, enquanto o tipo difuso geralmente se origina em pangastrites sem atrofia (CREW & NEUGU, 2006).

Tem-se observado um declínio da incidência de tumores do tipo intestinal, enquanto ocorre o contrário com o adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (KANEKO & YOSHIMURA, 2001).

O carcinoma gástrico pode se desenvolver de maneira localizada, envolver estruturas adjacentes ou ainda desenvolver metástases linfáticas, peritoneais e hematogênicas. Tanto os fatores anatômicos quanto biológicos determinam grandes variações nos padrões de metástase. Em casos de recorrências, metástases locais/regionais são identificadas em cerca de 50% dos casos, enquanto 30% dos casos apresentam metástase peritoneal. Metástases distantes também ocorrem em proporção significativa em função do estágio do tumor gástrico primário (KHANDEKAR & KHANDEKAR in GORE, 2009).

Os principais fatores de risco para o câncer gástrico incluem a infecção por *Helicobacter pylori*, hábitos alimentares, hábitos socioculturais, fatores hereditários e genéticos, além de fatores ocupacionais (CREW & NEUGU, 2006).

A infecção por *Helicobacter pylori*, um microaerófilo gram-negativo espiralado flagelado, foi pela primeira vez associada com o desenvolvimento de câncer gástrico por Marshal em 1983 (MARSHAL, 1984). Logo em seguida muitos estudos demonstraram que tal infecção era a principal causa de adenocarcinoma gástrico, podendo ser a principal responsável por até 63% dos casos (INCA, 2011). No entanto, até o presente momento, não se conhece completamente os mecanismos pelos quais o *H. pylori* induz carcinogênese estomacal. Aparentemente vários fatores podem agir em diferentes estágios, como a virulência da cepa, o dano ao DNA, interferência no balanço entre proliferação e apoptose, fatores relacionados ao hospedeiro e resposta inflamatória (ZUN-WU & FARTHING, 1999; QIU *et al*, 2010).

Pesquisas sugerem que há relação entre a infecção por esse microorganismo e a detecção de deficiência de p53 e reativação da atividade da telomerase em tecidos gástricos nos quais detecta-se processo carcinogênico instalado (ZUN-WU & FARTHING, 1999).

A prevalência mundial calculada de infecção pelo *H. pylori* é de 50%, sendo que chega a 90% nos países em desenvolvimento. Na maioria das populações em que a prevalência da infecção é alta, geralmente, ela é adquirida na infância, persistindo ao longo da vida, e está intimamente relacionada a fatores sócio-econômicos, como baixa renda, baixo índice educacional, condições de moradia inadequadas durante a infância (GOODMAN & CORREA, 2000; INCA, 2011).

Em 1994, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou o *H. pylori* como um carcinógeno tipo I para seres humanos, ou seja, de acordo com a agência, há evidências suficientes para afirmar a correlação entre tal infecção e sua carcinogenicidade em humanos.

A infecção por *H. pylori* induz ainda resposta inflamatória capaz de provocar a superexpressão da cicloxigenase 2, presente naturalmente na mucosa gástrica. Essa superexpressão está envolvida em vários processos que levam a progressão do tumor, como a angiogênese, sobrevivência da massa tumoral, proliferação, invasão e imunossupressão (RESENDE *et al*, 2011). Mesmo após a erradicação da infecção observa-se uma alta incidência de carcinogênese entre os indivíduos afetados, fenômeno cujas características clínicas e biológicas necessitam de melhor

compreensão para que se determine se a via carcinogênica nesses casos é similar à observada em indivíduos com infecção ativa (MATSUO *et al*, 2012)

No que tange aos fatores alimentares, estudos sugerem que eles tanto podem ser indutores como protetores de carcinogênese gástrica. A ingestão de frutas e verduras, está associada a um baixo risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. A hipótese de que a alimentação saudável possa ser um fator protetor deve-se ao fato de as frutas e legumes frescos possuírem vitaminas com propriedades antioxidantes, como as vitaminas C e E e o betacaroteno (INCA, 2011).

Em contrapartida, o consumo de aditivos alimentares e de elevados teores de sal de nitrito, que ocasionam inflamação da mucosa gástrica, está associado à facilitação da instalação da tumorigênese (GUERRA *et al*, 2005).

Os sais de nitrito, sofrem catálise ácida endógena na presença de amins e amidas, dando origem à nitrosaminas, que desde a década de 70 vem sendo descritas como um potente grupo de carcinógenos. As nitrosaminas também podem ser encontradas em alimentos com cerveja, peixes e derivados, derivados de carnes e queijos, e alimentos em conserva (MAGEE & BARNES, 1976; TRICKER & PREUSSMAN, 1991).

Fatores sociais como o hábito de fumar e ingerir bebida alcoólica são importantes fatores de risco, sobretudo, em pacientes que já apresentam infecção pelo *H. pylori* (TRAMACERE *et al*, 2011; SJÖDAHL, *et al*, 2007).

Outro fator de risco para neoplasias gástricas malignas é o perfil genético do indivíduo, sendo as principais alterações observadas a superexpressão ou aneuploidia com ganhos nos cromossomos 2q, 7pq, 8pq, 13q, 17q, 18q, e 20pq e perdas no cromossomo 17p. O padrão de alterações genéticas foi diferente, dependendo da existência de metástase nodal e tipos histológicos. Ganhos em 8q e perdas em 17p foram as características mais comumente observadas (KOO *et al*, 2000; PANANI, 2008).

Estudos demonstram a existência de trinta e três polimorfismos significativamente relacionados ao risco de desenvolvimento dessa neoplasia, entre eles o gene *MYC* tem papel de destaque. Alguns desses polimorfismos podem tornar-se biomarcadores do risco de câncer gástrico no futuro. Polimorfismos que determinam a produção de altos níveis de fatores de crescimento, que são importantes no processo de reparação tecidual, foram recentemente associados à redução do risco de desenvolvimento de câncer gástrico (GAO *et al*, 2009; CALCAGNO, 2008).

A amplificação de *MYC* parece estar presente em cerca de 30% dos casos e a perda alélica de *TP53* foi encontrada em 50%, no entanto os dados para *MYC* podem estar sendo subestimados devido limitações nas técnicas de detecção que não permite detectar amplificação de sequências rearranjadas (KOO *et al*, 2000; PANANI, 2008).

Mudanças genéticas que levam ao desenvolvimento de câncer gástrico permanecem sendo elucidadas através de estudos que visam identificar as regiões cromossômicas que contêm genes importantes para o desenvolvimento de carcinomas

gástricos e marcadores genéticos associados com a progressão do tumor (KOO *et al*, 2000; PANANI, 2008).

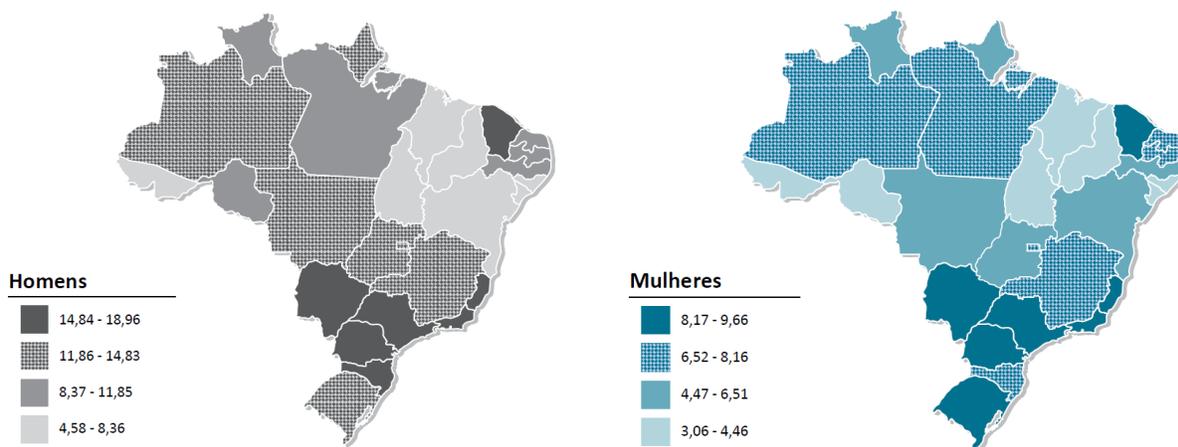
Alterações hereditárias relacionadas à carcinogênese gástrica são raras, sendo relatadas na literatura em cerca de apenas 5% dos casos de câncer gástrico, em sua maioria do tipo difuso (BARBER *et al*, 2006). Nesses casos, a mutação identificada tem sido no gene da *e-caderina*, o *CDH1*, e a gastrectomia profilática é citada como a melhor alternativa terapêutica disponível, uma vez que o câncer gástrico tem sido identificado em 76,5 – 100% dos estômagos retirados profilaticamente (HUNTSMAN *et al*, 2001; SURIANO *et al*, 2005).

São enumerados também como fatores de risco menos comuns para o câncer gástrico a exposição à radiação, obesidade, anemia perniciosa, tipo sanguíneo (maior frequência no tipo A) e infecção pelo vírus Epstein-Baar (CREW & NEUGU, 2006; INCA, 2011).

A mais recente estimativa mundial apontou a ocorrência de cerca de um milhão de casos novos de câncer do estômago para o ano de 2008, configurando-se como o quarto colocado em incidência e o terceiro em taxa de mortalidade (IARC, 2008). Mais de 70% dos casos ocorrem em países de baixo e médio recurso financeiro. A taxa de incidência é cerca de duas vezes mais alta no sexo masculino do que no feminino. No mundo, o local que concentra a mais alta incidência dessa neoplasia maligna é a Ásia Oriental (INCA, 2011).

No Brasil as estimativas para 2012/2013 apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, dos quais 20.090 serão de estômago (12.670 em homens e 7.420 em mulheres) (figura 1) (INCA, 2011).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (11/100 mil) e Nordeste (9/100 mil) e o quarto nas regiões Sul (16/100 mil), Sudeste (15/100 mil) e Centro-Oeste (14/100 mil). Para as mulheres, ocupa a quarta posição na região Norte (6/100 mil), a quinta na região Centro-Oeste (7/100 mil) e a sexta nas regiões Sudeste (9/100 mil), Sul (8/100 mil) e Nordeste (6/100mil) (INCA, 2011).



**Figura 1:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do estômago).

**Fonte:** INCA, 2011.

No Amazonas, considerando-se a população masculina no período entre 1979-1983, o câncer de estômago foi o primeiro no ranking de mortalidade por câncer e, entre 1995-1999, ele foi o segundo, entre a população feminina ele foi o segundo e terceiro mais agressivo, respectivamente (INCA, 2011).

Para o biênio 2012/13 estima-se que ocorrerão 693,61 novos casos a cada 100 mil habitantes do Estado do Amazonas. Dos quais 6,5% serão de estômago, configurando esse tipo de tumor como o terceiro mais frequente. Em Manaus, estima-se que ele será o segundo tipo mais freqüente de câncer em homens e o quarto em mulheres. Apesar das mulheres serem menos acometidas, são elas que apresentam a forma mais agressiva do tumor (INCA, 2011).

Apesar de ser a segunda causa de morte por câncer no mundo, em ambos os sexos, sua série histórica mostra declínio em vários países. As taxas de incidência também mostram uma redução substancial na maioria dos países. Parte da explicação para esse declínio deve-se a identificação de seus fatores de risco e a tomada de medidas de prevenção, sobretudo no que se diz respeito à melhora da qualidade de vida e alimentação, além do controle da infecção por *H. pylori* (IARC, 2008; INCA, 2011).

O câncer do estômago é um tipo de tumor que não possui um bom prognóstico, sendo a razão mortalidade/incidência considerada alta em todas as partes do mundo. Sua sobrevida relativa em cinco anos é considerada baixa, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (INCA, 2011).

Essa baixa sobrevida relaciona-se ao fato de que, na maioria dos pacientes, o câncer gástrico é diagnosticado em estágio avançado, quando as opções de tratamento curativo são limitadas (BORNSCHEIN & MALFERTHEINER, 2011).

Esse diagnóstico tardio ocorre porque os pacientes só se tornam sintomáticos quando já desenvolveram lesões avançadas com metástase local ou distante. Alguns dos sintomas apresentados são dor epigástrica, inchaço ou massa epigástrica palpável. Alguns pacientes podem apresentar náuseas e vômitos devido à obstrução gástrica, assim como sensação de saciedade precoce e disfagia. Também se observa a ocorrência de sangramento, em caso de ulcerações do tumor. Em casos mais avançados da doença sintomas como anorexia, perda de peso, icterícia, ascite e hepatomegalia podem estar presentes (OLEARCHYK, 1978).

A quimioterapia clássica do câncer gástrico baseia-se principalmente nos regimes de 5-fluorouracil (5-FU) cisplatina infusional (CF) e 5-fluorouracil+cisplatina+epirrubicina (ECF). Com esses esquemas obtém-se resposta em 20-40% dos pacientes, no entanto a duração dessas respostas é curta e incompleta e a sobrevivência média não excede 7-10 meses. Buscando-se a melhora desses resultados novas combinações incluindo docetaxel, oxaliplatina, capecitabina e irinotecan tem sido testadas (MEYERHARDT & FUCHS, 2011; RIVERA *et al*, 2007).

Mais recentemente foi adicionado ao arsenal terapêutico do câncer gástrico o trastuzumab, um anticorpo monoclonal que atinge seletivamente o domínio extracelular da proteína do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (BANG *et al*, 2010).

Esses novos regimes podem ter algum papel no auxílio do tratamento desses pacientes, mas a sobrevivência continua sendo rara e a toxicidade permanece alta (RIVERA *et al*, 2007; MEYERHARDT & FUCHS, 2011). Por isso a busca de novas alternativas de combinação e incorporação de drogas direcionadas a novos alvos terapêuticos é de vital importância.

### 3.2 O protooncogene *MYC* – tumorigênese e diferenciação celular

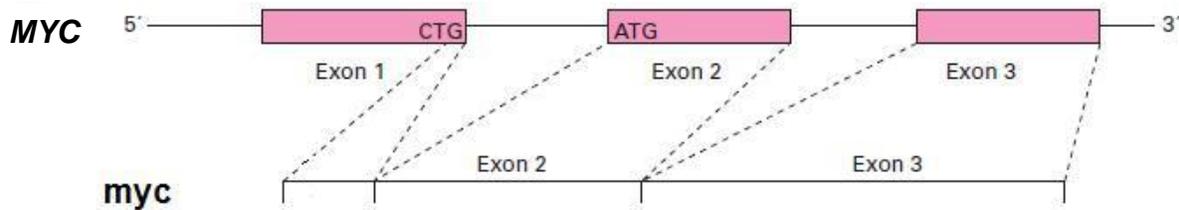
*MYC* é um oncogene envolvido na regulação do ciclo celular, parada no crescimento celular, adesão celular, metabolismo, biogênese dos ribossomos, síntese protéica e função mitocondrial (CALCAGNO, 2008; CROCE, 2008)

O gene *MYC* tem sido objeto de muitos estudos, nos quais ele vem demonstrando ser um duradouro enigma. A família de proteínas *myc* promove proliferação, crescimento e apoptose, além de inibir diferenciação terminal e, quando desreguladas, estão profundamente envolvidas na gênese de uma extraordinária lista de tipos de câncer (EISENMAN, 2001; VITA & HENRIKSSON, 2006).

O primeiro gene *MYC* foi identificado como um oncogene do retrovirus MC29 (*v-MYC*), que induz mielocitomatose em aves, em seguida sequências similares foram identificadas em células não infectadas. Subsequentemente o gene *c-MYC* foi identificado como o homólogo celular desse oncogene retroviral, sendo sua superexpressão e/ou translocação demonstrada em vários tumores humanos e animais (HEMERKING, 2003; FARIA, 2006).

Logo depois da descoberta de *c-MYC* dois outros genes foram encontrados amplificados em cânceres humanos: o *N-MYC* (nos neuroblastomas) e o *L-MYC* (nos carcinomas pulmonares). Adicionalmente, dois novos genes foram identificados, contudo somente em roedores, o *B-Myc* e o *S-Myc*. O conjunto desses genes é denominado genericamente como família de oncogenes *MYC* (FARIA, 2006).

O gene *MYC* está localizado na região cromossômica 8q24.21 compreendendo 3 exons cujos produtos consistem em fosfoproteínas nucleares altamente conservadas (TAUB *et al*, 1982; LUSCHER & EISENMAN, 1990; FACCHINI, 1998; MYC, 2012) (figura 2).

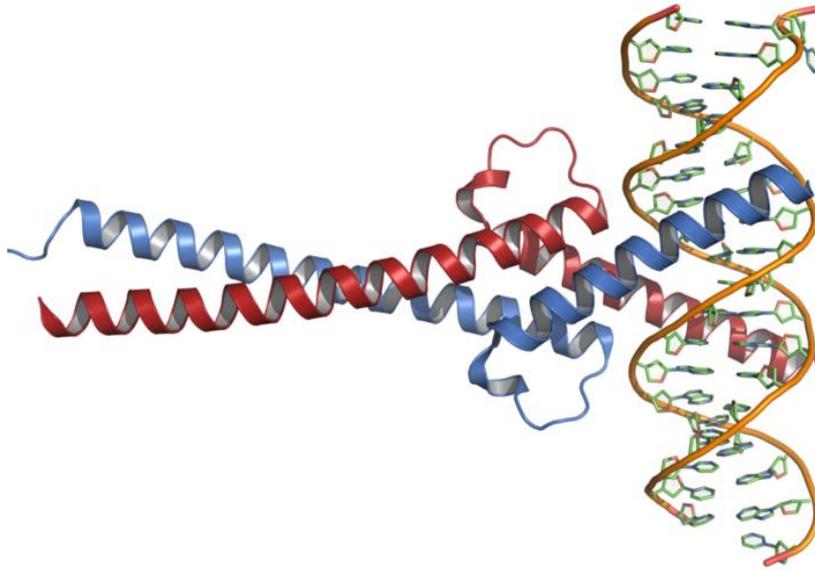


**Figura 2:** Representação esquemática do Gene *MYC* e os exons que dão origem à proteína *myc*.

Fonte: Adaptado de RYAN & BIRNIE, 1996.

A proteína Myc, de fórmula molecular  $C_{2186}H_{3447}N_{625}O_{725}S_{15}$ , é composta de 454 aminoácidos e possui com meia vida de 10-30 horas, sendo classificada como instável (THE MYC, 2011; MYC PROTEIN, 2012). Trata-se de um fator de transcrição formado basicamente de uma hélice–alça–hélice leucina zipper (bHLH-Zip), capaz de interagir com o DNA, e um domínio adjacente rico em aminoácidos básicos (RYAN & BIRNIE, 1996; NILSON, 2003).

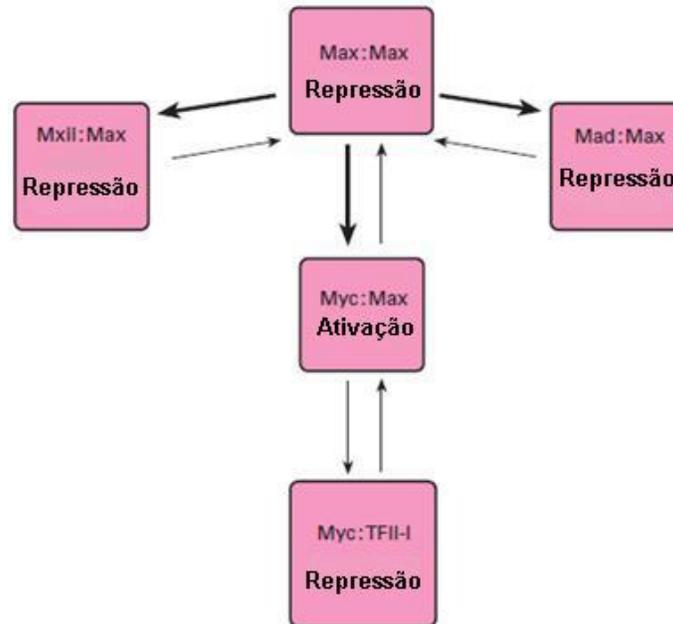
Ela forma um complexo dimérico com uma proteína complementar, denominada Max, essa complexação é necessária à maioria das atividades biológicas do Myc. Essencialmente toda proteína Myc encontrada nas células está complexada com Max, que é ubiquitária (BLACKWOOD, 1992; LUTZ *et al*, 2002) (figura 3).



**Figura 3:** Complexo dimérico formado entre as proteínas Myc (em vermelho) e Max (em azul) interagindo com o DNA.

Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:C-Myc-DNA\\_complex.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:C-Myc-DNA_complex.png).

A proteína Max pode ainda formar complexos com outras duas proteínas, Mad e Mxi1, além de formar dímeros, mediando a repressão da transcrição. A expressão de Max não é altamente regulada e ela possui alta estabilidade enquanto a expressão de Mad sofre uma regulação mais intensa e ela parece ter uma meia vida mais curta (figura 4) (BLACKWOOD, 1992; HOFFMAN & LIEBERMANN, 1998) .



**Figura 4:** Consequências transcricionais dos possíveis complexos formados entre Myc-Max-Mxi1.

Fonte: adaptado de RYAN & BIRNIE, 1996.

O papel do gene *MYC* no câncer foi inicialmente apontado por Varmus e Bishop, ganhadores do prêmio Nobel em 1989 (FARIA, 2006).

O protooncogene *MYC* é o oncogene mais frequentemente ativado e estima-se que ele esteja envolvido em 20% de todos os cânceres humanos (DANG *et al*, 2006). Existe uma base de dados que relaciona 1.697 genes alvos do *MYC* e 93 estudos indicando correlação o gene *MYC* com diferentes tipos de tumores, dos quais 8 referem-se a relação entre amplificação e/ou superexpressão de *MYC* e câncer gástrico (MYC PROTEIN, 2011).

O oncogene *MYC* pode ser ativado através de uma variedade de alterações genéticas incluindo translocação cromossomal, inserção viral, transdução retroviral e amplificação genética. A desregulação de sua expressão causa imortalização celular, mas não é suficiente para induzir transformação nas células primárias (RYAN & BIRNIE, 1997; HOFFMAN & LIEBERMANN, 1998).

A desregulação da expressão de *myc* promove não apenas proliferação, quando em *up-regulation*, mas também pode induzir ou sensibilizar a célula para apoptose, quando em *down-regulation*. O protooncogene *MYC* desempenha um papel em ambas vias de crescimento, positiva e negativa, devido sua influência sobre a diferenciação e apoptose. É importante entender como *myc* desempenha suas múltiplas funções na manutenção do desenvolvimento normal, na formação e manutenção tumoral e na resposta a diferentes terapias anti-câncer (HOFFMAN & LIEBERMANN, 1998; THOMPSON, 1998; PENDERGAST, 1999).

A apoptose associada à expressão inapropriada de *MYC* limita seu efeito tumorigênico isolado, portanto mecanismos inibidores da apoptose tem de ser somados a essas alterações para que se promova a tumorigênese, como ocorre durante a tumorigênese de precursores de células B em que a alteração em *MYC* se associa à alteração em *BCL-2*, outro protooncogene localizado no cromossomo 18q21 que se ativa ao translocar-se no cromossomo 14 (HOFFMAN & LIEBERMANN, 1998; PENDERGAST, 1999; NILSON, 2003).

A apoptose mediada por *MYC* é dependente de p53 em alguns tipos celulares. Sendo assim, nessas células o status de *TP53*, gene supressor de tumor localizado no

braço curto do cromossomo 17, e p53 determinará se o tumor responderá ou não a determinados tratamentos (THOMPSON, 1998; PENDERGAST, 1999).

Apesar de não ser capaz de induzir isoladamente o processo de tumorigênese, a expressão ectópica da oncoproteína myc evita parada do ciclo celular em resposta aos sinais de inibição do crescimento, estímulos de diferenciação ou retirada do agente mitógeno. Além disso, a ativação de *MYC* em células quiescentes é suficiente para induzir a entrada do ciclo celular na ausência de fatores de crescimento. Assim, *MYC* transduz um potente estímulo mitogênico (EISENMAN, 2001).

As alterações em *MYC* tem sido muito descritas em casos de neoplasias gástricas. Xu e colaboradores (2001) e Yang e colaboradores (2004) descreveram uma significativa elevação da expressão de *MYC* no câncer gástrico do tipo difuso. Yang e colaboradores (2004) reportaram ainda sua associação com a incidência de metástase. Han e colaboradores (1999) descreveram que pacientes com altos níveis de expressão de *MYC* raramente evoluem para cura. Dessa forma a expressão de *MYC* pode representar um fenótipo agressivo quando se trata de câncer gástrico.

Tem-se demonstrado que a redução da amplificação de *MYC* possibilita a diferenciação terminal de células neoplásicas, sobretudo de linhagens hematopoiéticas, mas também em outras linhagens, como linhagens de adipócitos, células pancreáticas endócrinas, queratinócitos, melanócitos, células nervosas e teratocarcinomas. Outras alterações na expressão de *MYC* também tem sido relacionadas com a inibição da diferenciação dessas células (GRIEP, 1988; DEMETERCO *et al*, 2002; GEBHARDT *et*

*al*, 2006; BUSCHBECK *et al*, 2007; MONTENEGRO *et al*, 2007; TAKAHASHI *et al*, 2008).

Sachs (1978) e Waxman (1986) já relatavam a grande importância dessa evidência uma vez que a indução de diferenciação terminal, necessária à morte da célula, é uma potencial alternativa de tratamento menos tóxica para o câncer (*apud* LESZCZYNIECKA *et al*, 2003). Esse tipo de terapia, quando utilizada em associação a drogas puramente citotóxicas podem reduzir a toxicidade das mesmas devido a redução da dosagem requerida para o alcance do efeito desejado (FISCHER *et al*, 1985).

Esta abordagem é baseada na suposição tácita de que muitos tipos de células neoplásicas apresentam defeitos reversíveis na diferenciação, que após tratamento adequado, resulta na reprogramação do tumor e uma perda concomitante da capacidade proliferativa e indução de diferenciação terminal ou apoptose. Estudos laboratoriais que se concentram na elucidação de mecanismos de ação tem demonstrado a eficácia da "terapia de diferenciação", que está começando a alcançar o contexto clínico (JIANG *et al*, 1994 *apud* LESZCZYNIECKA *et al*, 2003).

### 3.3 Telômero

Telômeros, o complexo DNA-proteína presente na extremidade dos cromossomos eucarióticos, são protetores contra os eventos que promovem a instabilidade do genoma, como degradações das regiões terminais do cromossomo, fusões e recombinações inapropriadas (BLACKBURN, 2005).

O DNA telomérico consiste em sequências repetitivas simples, não codificante, muitas vezes ricas em guanina, complexadas com proteínas teloméricas (BLACKBURN, 2005).

Os telômeros dos vertebrados consistem em repetições da sequência de bases TTAGGG com terminal poli-G. Nos mamíferos o complexo multiproteico associado a sequência de bases do telômero é conhecido como shelterina ou telossomo, e compreende as proteínas: tankyrase, TRF1 (*telomeric repeat-binding factor 1*), TRF2 (*telomeric repeat-binding factor 2*), TIN2 (*TRF1-interacting protein 2*), Rap1 (*repressor-activator protein 1*), POT1 (*protection of telomeres 1*) e TPP1 (formalmente chamada de PTOP/PIP1/TINT1) (GREIDER, 1999).

Essas regiões cromossômicas são específicas para a ação da telomerase, enzima responsável por seu alongamento (BLACKBURN, 2005). Trata-se de uma ribonucleoproteína grande, do tipo transcriptase reversa, que atua adicionando sequências repetitivas de DNA telomérico nas extremidades do cromossomo (TIAN *et al*, 2010). Ela apresenta-se sob duas isoformas, a 1 contém 1.132 aminoácidos e a 2, 1.069 (TELOMERASE1, 2012; TELOMERASE2, 2012).

A atividade da telomerase é suprimida na maioria das células somáticas humanas normais, essas células perdem progressivamente porções teloméricas ao longo de sua vida, a cada ciclo celular, devido a falta de atividade da telomerase. Muitos estudos correlacionam essa perda com o processo de envelhecimento e morte. Em contrapartida, a maioria das linhagens celulares imortalizadas e as células que compõem os tumores malignos humanos parecem manter o comprimento dos telômeros através da ativação da telomerase, o que destaca o papel do telômero como um importante passo na carcinogênese humana (REDDEL, 1998; MEYERSON, 1998).

Tem-se demonstrado que a disfunção do telômero e a ativação da telomerase são achados comuns também em casos de câncer gástrico, motivo pelo qual eles se tornaram importantes itens no estudo de novos alvos para a terapia anticâncer, sobretudo porque essas alterações ocorrem especificamente no tecido afetado pelo processo carcinogênico, o que leva a crer que os efeitos desse tipo de terapia sobre os demais tecidos seria pequeno, minimizando assim o aparecimento de efeitos colaterais (LICHTSTEINER *et al*, 1999; TIAN *et al*, 2010).

### 3.4 Biflorina

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia, especialmente oriundos de plantas e microorganismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (NEWMAN & CRAGG, 2007; CRAGG *et al*, 2009).

A maioria (60%) dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®) (NEWMAN & CRAGG, 2007; CRAGG *et al*, 2009).

A *Capraria biflora* L. é uma espécie de arbusto perene pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, que habita zonas temperadas e áreas de clima tropical (CORREA, 1984; MATOS, 2002) (figura 5).

A espécie é amplamente distribuída pelo continente americano. Na América do Sul é encontrada em países como Venezuela, Peru, Guiana Francesa e Brasil (encontra-se nos estados de Goiás, Minas Gerais e na faixa litorânea entre o Piauí, até o Espírito Santo) (CORREA, 1994; MATOS, 2002).

Na América Central pode ser encontrada em El Salvador, Trinidad-Tobago, Bahamas, Panamá, Curaçao, Guatemala e Porto Rico; na América do Norte: Estados Unidos e México, na Ásia: Índia e China. No continente Europeu é muito usada como ornamento (CORREA, 1994; MATOS, 2002).



**Figura 5:** *Capraria biflora* L. A) folhas e flor; B) raízes

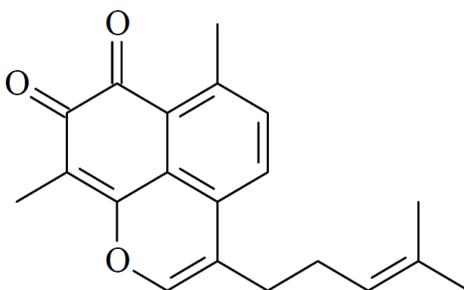
Fonte: VASCONCELLOS *et al*, 2007.

Esta planta é conhecida no Brasil como: Balsaminha, cá-da-balsaminha, chá-do-méxico, chá-da-martinica, chá-de-goteira, chá-do-rio, chá-das-antilhas, chá-de-lima, chá-do-maranhão, chá preto, chá-de-boi, chá-bravo, chá-de-calçada, chá-de-terra, chá-da-américa, chá-de-marajó (CORRÊA, 1984; LORENZI & MATOS, 2002).

Folhas secas e raízes são usadas na medicina popular para tratar dores, febre, gripe, vômito, diarreia, hemorróideia, reumatismo, enquanto as raízes possuem

propriedades antimicrobianas e anti-sépticas. O extrato aquoso das folhas de *C. biflora* demonstra potente citotoxicidade, atividade analgésica e anti-inflamatória em estudos farmacológicos (AYENSU, 1981; HONYCHURCH, 1986; MORAIS *et al*, 1995; SCOFIELD, 2002; LORENZI & MATOS, 2002).

A biflorina, objeto desse estudo (figura 6), é uma *o*-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-pran-7,8-diona) prenilada de origem natural que pode ser facilmente obtida das raízes da *Capraria biflora* L., foi isolada pela primeira vez em 1953 por Gonçalves de Lima e colaboradores e seus dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registrados pela primeira vez por Fonseca e colaboradores (2002), que nos forneceram a alíquota de substância utilizada nesse estudo.



**Figura 6:** Estrutura química da biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-pran-7,8-diona).

Dentre as propriedades comprovadas da biflorina destaca-se a atividade contra bactérias gram-positivas e álcool-ácido-resistentes e alguns fungos (GONÇALVES *et al*, 1962; SERPA, 1958).

Somado a isso, a biflorina possui citotoxicidade contra várias linhagens de melanoma, tanto murino quanto humano, leucemia mieloblástica humana, carcinoma de mama humano, carcinoma de pulmão humano, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de próstata, glioblastoma, além de mais 13 outras linhagens celulares, tais como de próstata, cólon e sistema nervoso central (VASCONCELLOS *et al*, 2005; VASCONCELLOS *et al*, 2010; VASCONCELLOS *et al*, 2011).

De acordo com testes realizados por Vasconcellos e colaboradores (2011), a biflorina causa supressão significativa no crescimento celular na forma dose dependente, também diminui a inibição da síntese de DNA além de causar morte celular por apoptose em melanoma.

A biflorina causa também um aumento nas figuras mitóticas em diferentes estágios do processo mitótico pela sua propriedade de diminuir o número de divisões celulares, além de reduzir o número de células viáveis sem aumentar o número de células inviáveis (VASCONCELLOS *et al*, 2011). Ela demonstra ainda possuir atividade antioxidante e não causa ruptura da membrana plasmática de eritrócitos (VASCONCELLOS *et al*, 2005).

Essa substância mostrou-se ativa também *in vivo* sobre o tratamento de tumores de Erlich, Sarcoma 180, além de melhorar a resposta ao tratamento com 5-fluorouracil em camundongos acometidos desses mesmos tumores (VASCONCELLOS *et al*, 2007) e de não induzir mutagenicidade e genotoxicidade em diversos modelos biológicos (VASCONCELLOS *et al*, 2010). Avaliando-se sua atividade sobre melanoma induzido

em ratos observou-se inibição do processo carcinogênico e aumento da média de sobrevivência dos animais (VASCONCELLOS *et al*, 2011).

Considerando-se a necessidade de busca de novas alternativas de tratamento para o câncer, destacando-se o câncer gástrico cujas opções disponíveis parecem ter um papel paliativo e não curativo na maioria dos casos, e a importância de se explorar os possíveis mecanismos de ação de novas entidades bioativas, acreditamos que as análises propostas fornecerão dados preliminares esclarecedores capazes de nortear a compreensão da utilidade da aplicação da biflorina nesse tipo de neoplasia.

### 3.5 Linhagem celular - ACP02

A cultura de células humanas tem gerado importantes elucidações a respeito da biologia celular, processos patológicos e suas potenciais terapias. No entanto, o processo de cultura celular *in vitro* está cercado de diversos desafios, o ambiente de cultura celular é ideal para o crescimento de numerosos microorganismos, as células são passíveis a mudanças genéticas durante a manipulação laboratorial e a contaminações cruzadas entre as linhagens (FRESHNEY *et al*, 2007).

O estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de câncer gástrico tem sido usado para obter informações sobre a evolução da malignidade e um vasto banco de linhagens celulares bem caracterizadas pode refletir a diversidade de fenótipos tumorais, fornecendo modelos úteis para o estudo de neoplasias (RIBEIRO *et al*, 2010).

No entanto poucas linhagens celulares de tumores gástricos estão disponíveis e, em sua maioria, são oriundas de pacientes Asiáticos, onde epidemiologicamente ocorre a maioria dos casos desse tipo de neoplasia (LIMA *et al*, 2004).

Em 2004, a ACP-01 foi a primeira linha celular de adenocarcinoma gástrico desenvolvido no Brasil, a partir de células neoplásicas de uma paciente residente no Estado do Pará (LIMA *et al*, 2004). Em seguida, em 2009, o mesmo grupo de pesquisa estabeleceu e caracterizou geneticamente outros 3 linhagens de células oriundas de câncer gástrico, a ACP02 e ACP03, obtidas de adenocarcinoma gástrico primário e AGP01, oriunda de fluido ascítico (LEAL *et al*, 2009).

Mais recentemente, em 2010, outro grupo caracterizou geneticamente a primeira linhagem celular de câncer gástrico brasileira disponível comercialmente, a PG100 (RIBEIRO *et al*, 2010).

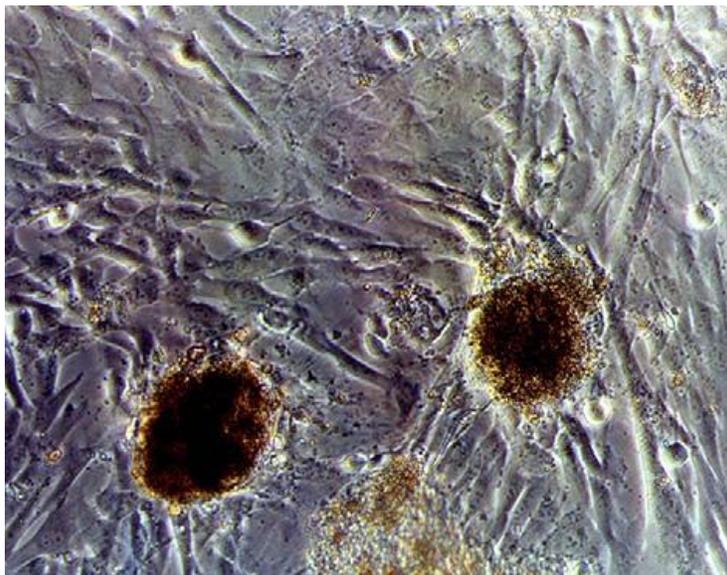
A ACP02 (figura 6) foi estabelecida de um adenocarcinoma gástrico primário oriundo de um homem de 66 anos. O tumor foi removido da região da cárdia estomacal, classificado como sendo do tipo difuso e estadiado como T3N2M0. Após o estabelecimento da cultura a partir de fragmentos do tumor tratados com 0,1% de colagenase e sua imortalização *in vitro*, através de transformação espontânea, análises morfológicas e citogenéticas foram realizadas com o intuito de correlacionar as características das células estabelecidas com as células originárias do tumor (LEAL *et al*, 2009).

Durante o acompanhamento do desenvolvimento dessa cultura celular observou-se que elas crescem de maneira desorganizada com aglomerações (figura 7), divisões heterogêneas e ciclo celular flutuando em torno de 30 horas (LEAL *et al*, 2009).

Apesar de serem comuns alterações cromossômicas devido ao processo de cultura celular, essa linhagem demonstrou compartilhar alterações com o tumor de origem, entre elas a principal alteração cariotípica foi a trissomia do cromossomo 8, onde *MYC* se localiza, a trissomia do cromossomo 21 e a deleção do 17p, que inclui o locus de *TP53* (figura 8) (LEAL *et al*, 2011). Essas evidências indicam que tal linhagem celular representa uma boa alternativa para o estudo de câncer gástrico humano,

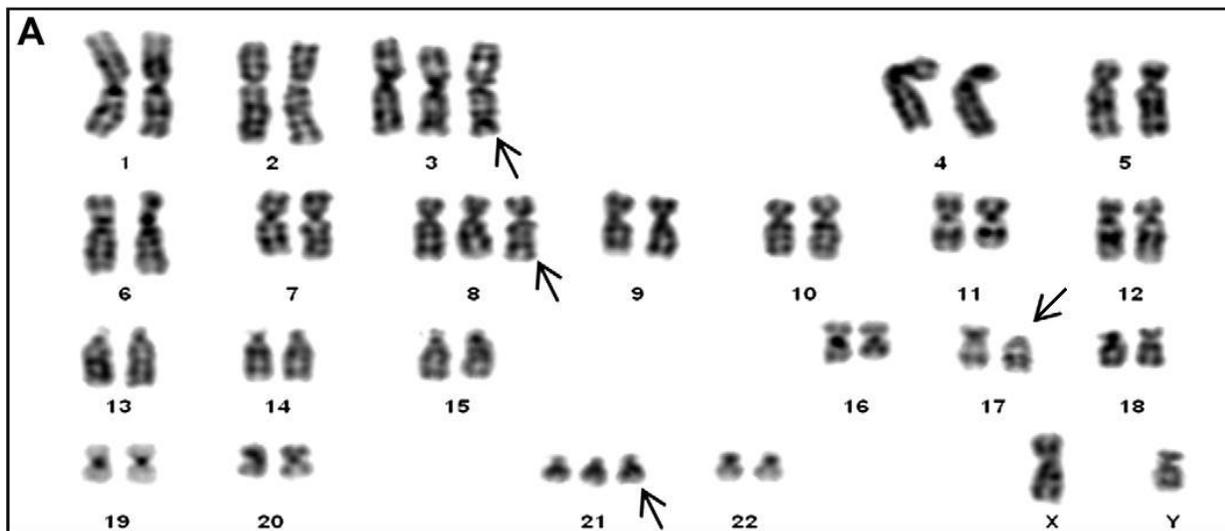
incluindo-se a triagem de novas opções de drogas (LEAL *et al*, 2009), como é o caso da biflorina.

Sendo assim a ACP02 foi a linhagem celular eleita para o desenvolvimento dos estudos do presente trabalho. Além das linhagens AGP01, PG100, supracitadas, e MRC-5, um fibroblasto pulmonar fetal humano normal, utilizado como controle não neoplásico (JACOBS *et al*, 1970).



**Figura 7:** Morfologia da linhagem ACP02 (em torno da passagem 55) sob microscopia invertida com contraste de fase.

Fonte: LEAL ET al, 2009.



**Figura 8:** Cariograma metafásico da linhagem ACP02 com setas indicativas das principais alterações cariotípicas observadas.

FONTE: LEAL *et al*, 2009.

## **4 METODOLOGIA**

Os protocolos experimentais abaixo descritos foram realizados no Laboratório de Atividades Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas e Laboratórios parceiros da Universidade Federal do Pará.

### **4.1 Manipulação e Manutenção da cultura celular**

A manutenção e manipulação da linhagem ao longo de todo trabalho experimental obedeceu os critérios estabelecidos pelos guias de cultura celular, que indicam o uso de garrafas e placas plásticas de cultura celular estéreis, uso meio de cultura RPMI 1640 acrescido de bicarbonato de sódio (5,6%), HEPES (25 mM), estreptomicina (0,005 mg/L), penicilina (0,001 U/L) e soro fetal bovino (10-20%) também estéril, além de incubação a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e outros reagentes complementares, como tripsina e tampão fosfato (FRESHNEY, 2007; PROTEOMICS, 2007; CURRENT, 2010, ABCAM, 2011).

Também foram seguidas as orientações do grupo que estabeleceu e caracterizou a linhagem, que indica observação diária do crescimento celular em microscópio invertido, além de realização de repiques sempre que necessário para meio de cultura novo em uma concentração de 0,5 – 1,0 x 10<sup>6</sup> células por mililitro (LEAL *et al*, 2009).

## 4.2 Citotoxicidade Celular pelo Alamar Blue

Nesse ensaio determinou-se a concentração inibitória capaz de provocar a morte ou a inativação metabólica de 50% das células cultivadas em análise.

Esse parâmetro inicial forneceu dados a respeito do perfil citotóxico da referida droga sobre as linhagens ACP02, AGP01, PG100 e MCR5, assim como norteou a determinação da concentração de biflorina e drogas-padrão que foram utilizadas nos demais subsequentes.

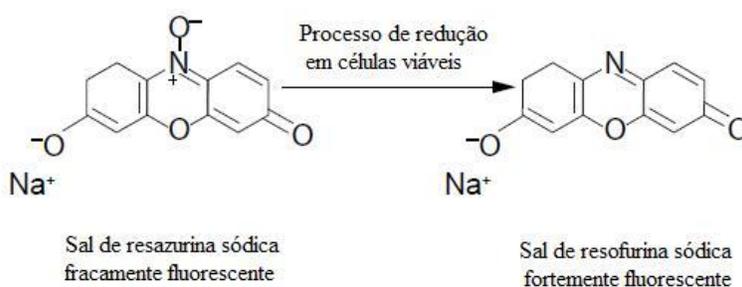
Muitos ensaios biológicos já foram descritos para a medida de sobrevivência e proliferação celular. Fields e Lancaster (1993) *apud* Nakayama e colaboradores (1997) e Ahmed e colaboradores (1994) descreveram o ensaio do Alamar Blue, um sensível, reprodutível e não radioativo ensaio possível de se realizar em placa de 96 poços.

Esse ensaio envolve a adição de um composto fluorogênico redox, o alamar blue, ao meio de cultura das células cultivadas. A forma oxidada do alamar blue, a rezasurina, possui cor azul escura e fluorescência intrínseca limitada. Após algum tempo de exposição à célula, a rezasurina é reduzida e transforma-se em resofurina, uma substância que emite cor rosa, altamente fluorescente. Acredita-se que esse processo de redução seja mediado por enzimas mitocondriais, citosólicas e microsomais. A extensão dessa conversão reflete a viabilidade celular e pode ser quantificada pela leitura da fluorescência emitida em leitor de microplaca com filtro de excitação de 465 nm e emissão de 540 nm (NAKAYAMA *et al*, 1997).

Para a realização desse teste as células foram cultivadas em uma densidade de  $0,5 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{L}$  em placas com 96 cavidades, essas placas foram mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h para que ocorresse a adesão das células. Após esse período as células foram tratadas em triplicata com 7 concentrações seriadas de biflorina e doxorubicina (controle positivo), iniciando-se em 25  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O diluente das drogas, DMSO (10  $\mu\text{L/mL}$ ), foi usado como controle negativo.

Após o tempo de tratamento estipulado, adicionamos 10  $\mu\text{L}$  do reagente Alamar Blue 0,02% em cada poço da placa e, após duas horas exposição, a leitura da fluorescência das placas foi processada em leitor de microplaca nos comprimentos de onda em 465 nm e 540 nm.

A concentração letal 50 foi então calculada através de regressão não linear tipo sigmoidal utilizando-se o software graphpad prism 5.



**Figura 9:** Redução da resazurina em resofurina, base do princípio da técnica do ensaio de viabilidade celular pelo alamar blue

### 4.3 Exclusão pelo Azul de Tripam

Com o intuito de avaliar viabilidade celular realizamos o ensaio de exclusão pelo Azul de Tripam (RENZI *et al*, 1993 *apud* MONTENEGRO *et al*, 2007), no qual as células foram cultivadas em placas de 12 poços e, posteriormente, tratadas com três diferentes concentrações de biflorina (1,0, 2,5 e 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), além do controle negativo, tratado apenas com DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), todos em triplicata.

Após 24 3 72h de tratamento, o sobrenadante dos poços foi coletado em um eppendorf, assim como as células, soltas por tripsinização. Essa solução resultante foi cuidadosamente homogeneizada e uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  foi coletada e misturada a 10  $\mu\text{L}$  de corante azul de tripam<sup>®</sup>. Após 2 minutos de repouso, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da solução de células expostas ao tripam foi transferida para uma câmara de Neubauer para a realização da contagem das células contidas nos 4 quadrantes externos. Durante essa contagem é possível diferenciar células viáveis e não viáveis, uma vez que elas se apresentam transparentes ou coloradas em azul, respectivamente.

Após a contagem foi calculado o percentual de células viáveis e não viáveis para a triplicata de cada tratamento e a comparação entre esses valores foi realizada por análise de variância com pós teste de Tukey, para determinar se houve diferença estatística na viabilidade celular frente aos tratamentos nos diferentes tempos de exposição.

#### 4.4 Análise morfológica

Com o intuito de avaliar a ocorrência de alterações morfológicas nas células da linhagem ACP02 causadas pela droga em estudo, cultivamos a referida célula numa densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 12 poços e tratamos com 1, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  de biflorina, além do controle negativo, tratado apenas com DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), e do controle positivo tratado com 0,16  $\mu\text{M}$  TPA.

Em seguida, após 72h, o sobrenadante dos poços foi coletado em um eppendorf, assim como as células, soltas por tripsinização. Centrifugamos essa solução resultante a 3000 rpm por 5 minutos, desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet em 200  $\mu\text{L}$  de PBS, retiramos uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e centrifugamos por 5 minutos a 1000 rpm em citocentrífuga.

Após a centrifugação as células aderidas nas lâminas foram fixadas e coradas com kit corante panótico rápido LaborClin<sup>®</sup>. As lâminas foram então analisadas em microscópio óptico, para avaliação das alterações morfológicas comparando-se as células tratadas e não tratadas. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia (VASCONCELLOS *et al*, 2007).

## 4.5 Avaliação da sensibilidade celular pelo ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi primeiramente descrito na década de 60 por radiologistas que desejavam avaliar a radiosensibilidade de linhagens tumorais *in vitro*. Posteriormente foi adaptado para a avaliação de drogas para fornecer dados a respeito da integridade estrutural e funcional das células tratadas, podendo evidenciar algum efeito citotóxico/citostático através da avaliação do tempo de recuperação da célula pós-tratamento medido em função do número de colônias formadas e do número de células em cada colônia celular (PLUMB, 2004).

Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 6 poços, na concentração de 400 células/mL. Após 24h do plaqueamento, elas foram tratadas com DMSO (10  $\mu$ L/mL) e 1, 2,5 e 5  $\mu$ M de biflorina em triplicata e o crescimento das colônias foi observado durante 7-10 dias, período no qual a placa permaneceu sob condições de cultivo (PLUMB, 2004).

Após esse período as células foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta. O número de colônias foi quantificado e os resultados das triplicatas comparados por análise de variância *1way* com pós teste de Dunnett. Nesse ensaio o efeito citotóxico resulta na redução no número de colônias e o efeito citostático resulta na redução no número de células em cada colônia (PLUMB, 2004).

## 4.6 Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro*

O ensaio de raspagem celular *in vitro*, descrito por Liang e colaboradores (2007), é um ensaio simples, bem desenvolvido e de baixo custo capaz de fornecer dados a respeito da migração celular *in vitro* de células que crescem aderidas.

Os passos básicos desse ensaio envolvem: a raspagem de uma região da monocamada celular criando um “arranhão”, provocando então uma descontinuidade na camada de células antes homogênea ( $\cong$  70% de confluência), e o acompanhamento do comportamento e captura de imagens da região “arranhada” a intervalos regulares (LIANG *et al*, 2007).

Para tanto as células foram cultivadas em triplicata em placas de 12 poços numa densidade de  $10 \times 10^4$ /mL, tratadas com 1,0, 2,5 e 5,0  $\mu$ M de biflorina e DMSO (10  $\mu$ L/mL) por 24h. Após esse período foi feito o “arranhão” e o comportamento das células foi observado e fotografado nos tempos de 0, 24 e 48 horas. Nas imagens obtidas mediu-se distância das bordas do arranhão e essas medidas foram tratadas estatisticamente por análise de variância 1 way e pós teste de Dunett.

A inibição da migração das células em direção a região raspada *in vitro* mimetiza a inibição do processo de migração *in vivo* e fornece dados iniciais sobre a interferência da droga no processo metastático típico de tumores malignos (LIANG *et al*, 2007).

## 4.7 Ensaio de diferenciação celular pelo NBT

O NBT (nitro blue tetrazolium) é um sal que nas células diferenciadas é reduzido a formazan, um composto insolúvel de coloração arroxeada (KOHROKI *et al.*, 1998).

No teste do NBT as células são ativadas por estímulos apropriados na presença do corante, que age como receptor de elétrons, e se reduz quando em contato com os intermediários reativos de oxigênio mudando da cor amarela para a cor azul, podendo ser quantificado no citoplasma das células diferenciadas, facilmente visualizados no microscópio comum (BAEHNER & NATHAN, 1968).

Para a realização desse teste as células foram cultivadas em placas de 12 poços, na concentração de  $2,5 \times 10^4$ , e tratadas, após 24 h, com 1, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  de biflorina, DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) e TPA (0,16 10  $\mu\text{M}$ ) por 24 e 72h. Posteriormente o sobrenadante e as células tripsinizadas foram coletados em tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos.

O pellet resultante dessa centrifugação foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (PBS) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de NBT (2 mg/mL em PBS + 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TPA) e incubado a 37 °C em banho maria por uma hora protegido da luz.

Em seguida a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de PBS gelado, a suspensão foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Foram então preparadas lâminas em citocentrífuga com 50  $\mu\text{L}$  dessa suspensão submetidos a centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos.

As células aderidas nas lâminas foram fixadas em metanol PA por um minuto, lavadas em água corrente e, em seguida, contracoradas com safranina 0,5%. Após a secagem as lamínulas foram montadas com xilol e as lâminas analisadas ao microscópio óptico, quando foram contadas duzentas células diferenciando-se aquelas com coloração rosa (indiferenciadas – negativas) e das com coloração roxa (diferenciadas – positivas).

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando-se o software graphpad prism5<sup>®</sup> por ANOVA 2way seguida de pós teste de Bonferroni.

## 4.8 Avaliação do status de amplificação *MYC* e telômero por FISH

A introdução da técnica de *fluorescence in situ hybridization* (FISH – fluorescência no local da hibridização), há aproximadamente 30 anos marcou o início de uma nova era do estudo da estrutura e função cromossômica. Conceitualmente, o FISH é uma técnica simples que consiste essencialmente na hibridização de uma sonda de DNA (*DNA probe*) a sua sequência complementar no cromossomo de preparações previamente fixadas em lâminas (VOLPI & BRIDGER, 2008; BISHOP, 2010).

A marcação fluorescente pode ser feita diretamente, pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes na sequência da sonda, ou indiretamente através da utilização de anticorpos secundários com fluoróforos. Após esses procedimentos as sondas e seus alvos podem ser visualizadas através de análise microscópica (VOLPI & BRIDGER, 2008; BISHOP, 2010).

Para análise da interferência da biflorina na amplificação de *MYC* e no comprimento do telômero da linhagem ACP02, as células foram cultivadas em placas de 12 poços, na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL e após 24h, tratadas 1, 2,5 e 5  $\mu$ M de biflorina e DMSO (10  $\mu$ L/mL) por 24 e 72 horas. Decorrido esse período, o sobrenadante e as células tripsinizadas foram colocados em tubos falcon de 15 mL e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos.

Em seguida o pellet formado foi ressuspenso em 5 mL de solução hipotônica de KCl 0,075 M e incubado por 20 minutos a 37 °C, para que ocorresse a ruptura da membrana nuclear dessas células.

Essa nova suspensão foi novamente centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e o pellet ressuspenso em 5 mL de solução fixadora de metanol/ ácido acético 3:1 acrescida de *cytoclear procell*<sup>®</sup> (5 µL/mL), um reagente que consiste numa mistura de proteínas detergentes capazes de remover resquícios de citoplasma, tornando a visualização mais fácil. Com essa solução fixadora foram feitas sucessivas lavagens através de centrifugação e ressusensão até que a lâmina preparada estivesse suficientemente limpa.

Para o preparo da lâmina foi utilizado o pellet obtido nas lavagens. Esse pellet foi ressuspenso em 300 µL da própria solução fixadora e gotejado na região central de uma lâmina previamente limpa e desengordurada.

Após a evaporação total do fixador os núcleos interfásicos aderidos na lâmina foram observados em microscópio óptico com contraste de fase, para a certificação de que havia material em quantidade suficiente e satisfatoriamente limpo para a realização dos procedimentos seguintes.

Para a marcação de *MYC* foi utilizada a sonda comercial Poseidon<sup>®</sup> que fornece fluorescência direta e para a marcação do telômero utilizamos a sonda pan telomérica StarFISH<sup>®</sup>, também de fluorescência direta, seguindo-se o protocolo experimental indicados na bula das referidas sondas para a hibridização que consiste em:

- Aplicar de 10-20 µL da sonda sobre o local da lâmina onde estão aderidos os núcleos, posteriormente cobrir com lamínula 22x22 mm, e envolver lâmina e lamínula cuidadosamente em papel filme;

- Co-desnaturar DNA celular e sonda por aquecimento a 75 °C por 10 minutos;
- Hibridizar por incubação em overnight em câmara úmida a 37°C protegida da luz;
- Retirar o papel filme e a lamínula, cuidadosamente, e aplicar de 15 µL do contracorante DAPI/Antifade e nova lamínula sobre o local onde o material está aderido.
- Armazenar a -20 °C por 20 minutos a até 60 dias;
- Realizar a leitura em microscópio de fluorescência com avaliação de 200 células por tratamento, nas quais a detecção de sinais vermelhos amplificados indicam a marcação de *MYC* amplificado, enquanto os sinais azuis referem-se a região telomérica.

A medida de comprimento de telômeros, determinado em cada núcleo interfásico foi adquirido pelo software de captura de imagem “Applied Spectral Imaging image analysis system”. As imagens foram processadas pelo software TFL-TELO seguindo o protocolo de (POON et al., 1999).

## 5 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos podemos afirmar que:

- A biflorina possui atividade citotóxica equivalente a doxorrubicina sobre células da linhagem gástrica ACP02;
- A citotoxicidade apresentada pela biflorina provoca inibição da proliferação de clones celulares *in vitro*;
- A biflorina apresenta a capacidade de inibir a motilidade celular *in vitro*;
- A biflorina é capaz de reduzir a população de células com 4 sinais de *MYC* ou mais, aumentando, proporcionalmente, àquelas com menos de 3 sinais, sugerindo redução do número de células amplificadas e aumento de células com amplificação normal;
- Células tratadas com biflorina apresentam ainda redução do comprimento dos telômeros, o que pode indicar inibição da atividade da telomerase;

## REFERÊNCIAS

ABCAM. *Cell Culture Guidelines*. 2011. Disponível em: [www.abcam.com/technical](http://www.abcam.com/technical). Acesso: Jun/2010.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. *A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay*. Journal of immunological methods, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes neoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*. v. 28, p. 118-129, 2005.

AYENSU, E. S. *Medicinal Plants of the West Indies*. Reference Publications, Algonac, Mich., p. 170, 1981.

BAEHNER, R. L.; NATHAN D. G.. *Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease*. N. Engi. J. Med.. v. 278, p. 971-976, 1968.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B.. *The genetics and genomics of cancer*. Nature genetics supplements. v. 33, p. 238-244, 2003.

BANG, YUNG-JUE; CUTSEM, E. V.; FEYEREISLOVA, A.; CHUNG, H. C.; SHEN, L.; SAWAKI, A; LORDICK, F.; OHTSU, A.; OMURO, Y.; SATOH, T.; APRILE, G.; KULIKOV, E.; HILL, J.; MICHAELA LEHLE; JOSEF RÜSCHOFF M. D.; YOON-KOO KANG. *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. v. 28. Lancet, 2010.

BARBER, M.; FITZGERALD, R. C.; CALDAS C. *Familial gastric cancer – aetiology and pathogenesis*. v. 20. 4 ed. p. 721-34. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006.

BARCH, M. J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J. L.. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3 ed.. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

BISHOP, R.. *Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance*. Bioscience Horizons. v. 3, p. 85-95, 2010.

BLACKBURN, E. H.. *Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions*. v. 579. FEBS Letters, 2005.

BLACKWOOD, E. M.; LIISCHER, B.; EISENMAN, R. N.. *Myc and Max associate in vivo*. Genes and Development. v. 6, p. 71-80, 1992.

BORNSCHIEN, J.; MALFERTHEIRNER, P.. *Gastric Carcinogenesis*. n. 396. p. 729-742. Langenbecks Arch Surg, 2011.

BUSCHBECK, M; URIBESALGO, I.; LEDL, A.; GUTIERREZ, A.; MINUCCI, S.; MULLER, S.; CROCE, L. Di. *PML4 induces differentiation by Myc destabilization PML inhibits repressive Myc functions*. Oncogene v. **26**, p. 3415-3422, 2007.

CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; ASSUMPÇÃO, P. P., SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.. *MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis*. World Journal Gastroenterol. v. 14, n. 39, p. 5962-5968, 2008.

CANCER, Learn about. AMERICAN CANCER SOCIETY Disponível em:  
<http://www.cancer.org/>. Acesso: jan/2011.

CANTLEY, L. C.; BASELGA, J.. *The Era of Cancer Discovery*. Editorial – American Association for Cancer Discovery. 2011.

CERVANTES, A., ROSELLÓ, S.; RODA, D; RODRIGUEZ-BRAUN, E. *The treatment of advanced gastric cancer: current strategies and future perspectives*. v. 103. *Annals of Oncology*, 2008.

CESTARI, M. E. W; ZAGO, M. M. F.. *A prevenção do câncer e a promoção da saúde: um desafio para o Século XXI*. *Revista Brasileira de Enfermagem*. v. 58, 2 ed., p. 218-221, 2005.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. v. 2. Ed. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. *A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará* *Revista Virtual de Química*. v. 1, n. 2, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M., GROTHAUS, P. G., NEWMAN, D. J. *Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents*. *Chem. Rev.* V. 109, P. 3012-3043, 2009.

CREW, K. D. & NEUGU A. I. *Epidemiology of gastric cancer*. v. 12. 3ed. *World Journal of Gastroenterology* , 2006.

CROCE, C. M.. *Oncogenes and Cancer*. *The New England Journal of Medicine*. - *Molecular Origins of Cancer*. 2008.

CURRENT PROTOCOLS. Disponível em: [http://www.protocolonline.org/prot/Cell\\_Biology/Cell\\_Culture/](http://www.protocolonline.org/prot/Cell_Biology/Cell_Culture/). Acesso: jun/2010.

CURY-BOAVENTURA, M.F., POMPEIA, C., CURI, R.. *Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells*. Clinical Nutrition. v. 23, p. 721–732, 2004.

DANG, C. V.; O`DONNELL, K. A.; ZELLER, K. I.; NGUYEN, T.; OSTHUS, R. C.; LI, F. *The c-Myc target gene network*. Seminars in Cancer Biology. v. 16, p. 253-264, 2006.

DEMETERCO, C.; ITKIN-ANSARI, P.; TYRBERG, B.; FORD, L. P.; JARVIS, R. A.; LEVINE, F.. *c-Myc Controls Proliferation Versus Differentiation in Human Pancreatic Endocrine Cells*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. v. 87, n. 7, p. 3475–3485, 2002.

EISENMAN, R. N.; *Deconstructing Myc*. Genes and Development. v. 15, p. 2023-2030, 2001.

FACCHINI, L. M.; PENN, L. Z.. *The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights*. The FASEB Journal. v. 12, p. 633-651, 1998.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene MYC no câncer. Revista Brasileira de Cancerologia. v. 52, n. 2, p. 165-171, 2006.

FIELDS, R. D.; LANCASTER, M. V.. *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*. Am. Biotechnol. Lab. v. 11, n.4, p. 48-50, 1993.

FISHER, P. B.; PRIGNOLI, D. R.; HERMO JR., H.; WEINSTEIN, B.; PESTKA, S.. *Effects of Combined Treatment with Interferon and Mezerein on Melanogenesis and Growth in Human Melanoma Cells*. Journal of Interferon Research. v. 5, p. 11-22 , 1985.

FONSECA, A. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. *Total assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra of biflorin and bis-biflorin from Capraria biflora..* Magnetic resonance in chemistry. v. 41, p. 1038-1040, 2002.

FOSTER, I.. *Cancer: A cell cycle defect.* The society and college radiographers. v.14, p.144-149, 2008.

FRESHNEY, I.; STACEY, G. N.; AUERBACH, J. M. *Culture of specialized cells – Culture of human stem cells.* Wilwy: New Jersey, 2007.

GAO, L.; NIETERS, A.; BRENNER, H. *Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis.* European Journal of Human Genetics. v. 17, p. 1658-1667, 2009.

GEBHARDT, A.; FRYE, M.; HEROLD, S.; BENITAH, S. A.; BRAUN, K.; SAMANS, B.; ATT, F. M.; ELSÄSSER, H.; EILERS, M.. *Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1.* The Journal of Cell Biology, v. 172, p.139-149, 2006.

GONÇALVES, O.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; NAVARRO, M.C.P. *Novo Método de Extração Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial.* Revista do Instituto de Antibióticos de Recife. v.4, p. 79-81, 1962.

GOODMAN, K. J. & CORREA, P. *Transmission of Helicobacter pylori among siblings.* v. 355. Lancet, 2000.

GORE , R. M.. *Gastric Cancer.* Sao Paulo: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2009.

GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C.. *Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer research. v. 54, 1994.

GREIDER, C. W. *Telomeres do D-loop-T-loop*. v. 97. 4 ed. Cell, 1999.

GRIEP, A. E.; WESTPHAL, H. *Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells*. *Developmental Biology*. Proc. Natd. Acad. v. 85, p. 6806-6810, 1988.

GUERRA, M. R., MOURA GALLO, C. V., MENDONÇA, G. A. S.. *Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes*. Revista Brasileira de Cancerologia . v.51, 3 ed, p. 227- 234, 2005.

HAN, S.; KIM, H. Y.; PARK, K.; CHO, H. J ; LEE M. S.; KIM H. J.; KIM Y. D. . *c-Myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer*. J Korean Med Sci. v.14, p. 526-530, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell. v. 144, p.646-674, 2011.

HEMERKING, H. *The MYC Oncogene as a Cancer Drug Target*. Current Cancer Drug Targets. v. 3, p. 163-175, 2003.

HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A.. *The proto-oncogene c-myc and apoptosis*. Oncogene. v. 17, p. 3351-3357, 1998.

HONYCHURCH, P.N. *Caribbean Wild Plants and Their Uses*. Macmillan Publishers Ltd.: London, p. 84, 1986.

HUNTSMAN, D. G.; CARNEIRO, F.; LEWIS, F. R.; MACLEOD, P. M.; HAYASHI, A., MONAGHAN, K. G.; MAUNG, R.; SERUCA, R.; JACKSON, C. E.; CALDAS, C. *Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations*. v. 344. N. Engl. J. Med., 2001.

IARC - International Agency for Research on Cancer. *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes, and Helicobacter pylori*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1994.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro : Inca, 2011.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Atlas de mortalidade por câncer no Brasil*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/atlas/>. Acesso: 2012.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. *CÂNCER*. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso: mai/2010.

JACOBS, J. P., JONES, C. M.; BAILLE, J. P.. *Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5*. n. 227. Nature, 1970.

JEMAL, a.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E; FORMAN, D. *Global Cancer Statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

KANEKO S. & YOSHIMURA T.. *Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types 1975-1989*. v. 84. Br J Cancer, 2001.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R.. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. British Journal of Cancer. v. 26, p. 239–257, 1972.

KOHROKI, J.; MUTO, N.; TANAKA, T.; ITOH, N.; INADA, A.; TANAKA, K.; DURHAM, J., BROWN, G.. *Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukemia cell lines*. Leukemia Research. v. 22, p. 405–412, 1988.

KOO, S. H.; KWON, K. C.; SHIN, S. Y.; JEON, Y. M., PARK, J. W.; KIM, S. H.; NOH, S. M.. *Genetic Alterations of Gastric Cancer: Comparative Genomic Hybridization and Fluorescence In Situ Hybridization Studies*. Cancer Genet Cytogenet. v. 117, p. 97–103, 2000.

LAUREN P. *The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification*. v. 64. Acta Pathol Microbiol , 1965

LEAL, M. F.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, C. E. A.; LAMARÃO, M. F. V.; CALCAGNO, D. Q.; KHAYATA, A. S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; CABRAL, I. R.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.. *Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines*. Cancer Genetics and Cytogenetics. v. 195, p.85-91, 2009.

LEAL, M. F.; CALCAGNO, D. Q.; COSTA, J. F. F. B.; SILVA, T. C. R.; KHAYATA, A. S.; CHEN, E. S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.. *MYC, TP53, and Chromosome 17 Copy-Number Alterations in Multiple Gastric Cancer Cell Lines and in Their Parental Primary Tumors*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.

LESZCZYNIECKA, M.; ROBERTS, T.; DENT, P.; GRANT, S.; FISHER, P. B.. *Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications*. Current Cancer Drug Targets. v. 3, p. 163-175, 2003.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.. *In vitro scratch assay: a convenient inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nature Protocols. v. 2, n. 2, 2007.

LICHTSTEINER, S. P.; LEBKOWSKI, J. S.; VASSEROT, A. P.. *Telomerase: A Target for Anticancer Therapy*. v. 886. Ann N Y Acad Sci., 1999.

LIMA, E. M.; RISSINO, J. D.; HARADA, M. L., ASSUMPÇÃO, P. P.; DEMACHKI, S.; GUIMARAES, A. C.; CASSARTELLI, C.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.. *Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor*. Braz J Med Biol Res. v. 37, p. 1831-1838, 2004.

LORENZI, H.; F. J. A. MATOS. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa-São Paulo, p. 434-435, 2002.

LUSCHER, B.; EISENMAN, R. N.; *New light on Myc and Myb*. Genes and Development. v. 4, p. 2025-355, 1990.

LUTZ, W; LEON, J.; EILERS, M. *Contributions of Myc to tumorigenesis*. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1602, p. 61-71, 2002.

MAGEE, P. N. & BARNES, J. M.. *Carcinogenic nitroso compounds*. v. 10. Adv. Cancer Res, 1976.

MATOS, F.J.A. *Farmácias Vivas-Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado Para Pequenas Comunidades*. 4 ed. Editora UFC: Fortaleza, 2002.

MATSUO, T.; ITO, M.; TATSUGAMI, M.; BODA, T.; TAKATA, S.; TANAKA, S.; CHAYAMA, K.. *Gastric Cancer Development after Helicobacter pylori Eradication Therapy: A New Form of Gastric Neoplasia*. n.85. Digestion, 2012.

MÉNORET, M. *The genesis of the notion of stages in oncology: the French permanent cancer survey (1943 – 1952)*. The society for the social history of medicine, 2002.

MEYERHARDT, J. A.; FUCHS, C. S.. *Chemotherapy Options for Gastric Cancer. Seminars in Radiation Oncology*. v. 12, n. 2, 2002.

MEYERSON, M. *Telomerase enzyme activation and human cell immortalization. Toxicol Lett*, 1998.

MONTENEGRO, R. C.; VASCONCELLOS M. C.; BEZERRA F. S., ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.. *Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. Toxicology in Vitro*. v. 21, p. 795-800, 2007.

MORAIS, N. M. T; NOGUEIRA, C. M. D; LOPES, M. F. G.; VASCONCELOS, N. M. S; SÁ, M. J. H. C.(1995) *Estudo Inorgânico Analítico de Plantas Medicinais.. Anais Associação. Brasileira de. Química*. v. 44, n. 4, p. 14-19, 1995.

MYC GENE. *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) [ Homo sapiens ]*. Gene ID: 4609. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>. Última atualização: 01/01/2012.

MYC PROTEIN. Disponível em: <http://macromoleculeinsights.com/myc.php>. Acesso: jun/2011.

MYC protein. *myc proto-oncogene protein [Homo sapiens]*. NCBI Reference Sequence: NP\_002458.2.. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/71774083>. Última atualização: 01/01/2012

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*. v. 204, p. 205–208, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.. *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. J. Nat. Prod.*. V. 70, P. 461-477, 2007.

NILSSON, J. A.; CLEVELAND, J. L.. *Myc pathways provoking cell suicide and cancer.* v. 22. *Oncogene*, 2003.

OLEARCHYK, A. S.. *Gastric carcinoma. A critical review of 243 cases.* v. 70. *Am J Gastroenterol*, 1978.

PANANI, A. D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. v. 266. 2 ed. *Cancer Letters*, 2008.

PLUMB, J. A.. *Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay.* *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols.* v. 88. P.159-164. 2004.

POON SS, MARTENS UM, WARD RK, LANSDORP PM. *Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy.* n. 36. *Cytometry*, 1999.

PRENDERGAST, G. C.. *Mechanisms of apoptosis by c-Myc.* *Oncogene.* v. 18, p. 2967-2987, 1999.

PROTEOMICS Technology Centre of expertise. *Cell Culture – Procedure and Guidelines.* 2007.

QIU, H.; ZHANG, L.; KESHARI, R.; WANG, G. ZHOU, Z.; XU, D.; WANG, W.; ZHAN, Y.; LI, W.. Relationship between H. pylori infection and clinicopathological features and prognosis of gastric cancer. *BioMed Central Cancer.* v. 10, 2010.

REDDEL, R. R. *Genes involved in the control of cellular proliferative potential*. v. 854. Ann NY Acad Sci, 1998.

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

RESENDE, A. L. S.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, S. *Mortalidade por câncer gástrico no Estado do Pará, 1980-1997*. *Arquivo de Gastroenterologia*. v. 43, p.247-252, 2006.

RESENDE, C.; THIEL, A.; MACHADO, J. C.; RISTIMAKI, A.. *Gastric Cancer: Basic Aspects*. p. 38-44. *Helicobacter*, 2011.

RIBEIRO, H. F.; ALCÂNTARA, D. F. A.; MATOS, L. A.; SOUSA, J. M. C.; LEAL, M. F.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O.. *Cytogenetic characterization and evaluation of c-MYC gene amplification in PG100, a new Brazilian gastric cancer cell line*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 43, p.717-721, 2010.

RIBEIRO, L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.. *Mutagênese ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003.

RIVERA, F.; VEGA-VILLEGAS, M. E.; LÓPEZ-BREA, M. F.. *Anti Tumour Treatment: Chemotherapy of advanced gastric cancer*. *Cancer Treatment Reviews*. v. 33, p. 315-324, 2007.

RYAN, K. M.; BIRNIE, G. D.. *Myc oncogenes: the enigmatic family*. *Biochem. Journal*. v. 314, p. 713-721, 1996.

SCOFIELD, D. <[http://www.cassiakeyensis.com/sofl\\_plants/med\\_Capriariabiflora.html](http://www.cassiakeyensis.com/sofl_plants/med_Capriariabiflora.html)>, 2002.

SERPA, J. *Cadidíase cutâneas na criança*. Anais da Faculdade de Medicina Universidade de Recife. v. 18, n2, p. 275-88, 1958.

SJÖDAHL K, LU Y, NILSEN TI, YE W, HVEEM K, VATTEN L, LAGERGREN J.. *Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study*. v. 120. Int J Cancer, 2007.

SQUIER, M. K. T.; COHEN, J. John. *Standard Quantitative Assays for Apoptosis Margaret*. Molecular Biotechnology. v.19, 2001.

SURIANO, G.; YEW, S.; FERREIRA, P.; SENZ, J.; KAURAH, P.; FORD, J. M.; LONGACRE, T. A.; NORTON, J. A.; CHUN, N.; YOUNG, S.; OLIVEIRA, M. J.; MACGILLIVRAY, B.; RAO, A.; SEARS, D.; JACKSON, C. E.; BOYD, J; YEE, C.; DETERS, C.; PAI, G. S.; HAMMOND, L. S.; MCGIVERN, B. J.; MEDGYESY, D.; SARTZ, D.; ARUN, B.; OELSCHLAGER, B. K.; UPTON, M. P.; NEUFELD-KAISER, W.; SILVA, O. E.; DONENBERG, T. R.; KOOBY, D. A.; SHARMA, S; JONSSON, B. A.; GRONBERG, H.; GALLINGER, S.; SERUCA, R.; LYNCH, H.; HUNTSMAN, D.G.. *Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management*. v. 15. 11ed. Clin Cancer Res, 2005.

TAKAHASHI, Y.; OHOKA, N.; HAYASHI, Hidetoshi; SATO, Ryuichiro. *TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARγ transcriptional activity*. Journal of Lipid Research. v. 49, p. 880-892, 2008.

TAUB, R.; KIRSCH, I.; MORTON, C.; LENOIR, G; SWAN, D.; TRONICK, S.. *Translocation of the C-MYC gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells*. Proc Natl Acad. v. 79, p. 7837-41, 1982.

TELOMERASE1. reverse *transcriptase isoform 1 [Homo sapiens]*. NCBI Reference Sequence: NP\_937983.2. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_937983.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_937983.2). Acesso: jan/2012.

TELOMERASE2. *reverse transcriptase isoform 2 [Homo sapiens]*. NCBI Reference Sequence: NP\_001180305.1. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001180305.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001180305.1). Acesso: jan/2012.

THOMPSON, E. B.. *The Many Roles of C-Myc in Apoptosis*. Annu. Rev. Physiol. v. 60, p. 575-600, 1998.

TIAN, X.; CHEN, B.; LIU, X.. *Telomere and Telomerase as Targets for Cancer Therapy*. v. 160. Appl Biochem Biotechnol, 2010.

TRAMACERE, I. ; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.. *Tobacco Smoking and Esophageal and Gastric Cardia Adenocarcinoma: A Meta-analysis*. v. 22. 3 ed. Epidemiology, 2011.

TRICKER, A. R. & PREUSSMANN, R.. *Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential*. v. 259. Mutat. Res.,1991.

UICC – Union for International Cancer Control. *Classification of malignant tumors*. 7 ed. Willey-Balckwell, 2009. Disponível em: <http://www.uicc.org/tnm>. Acesso: jun/2011.

USHIJIMA, T. *Epigenetic Field for cancerization*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. v. 40, n. 2, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A.P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.. *Antitumor Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from Capraria biflora*. Biol. Pharm. Bull. v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; MONTENEGRO, R. C.; MILITAO, G. C. G.; FONSECA, A. M.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-

LOTUFO, L. V. *Bioactivity of Biflorin, a Typicalo-Naphthoquinone Isolated from Capraria biflora L.* Z. Naturforsch. v. 60, p. 394-398, 2005.

VASCONCELLOS, M. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R; M.; MACHADO, M. S.; GUECHEVA, T. N.; Villela, I.; IMMICH, B. F.; MONTENEGRO, R. C.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G.; MORAES, M. E. A.; SAFF, J.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; HENRIQUES, J. A. P.. *Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o-naphthoquinone isolated from Capraria biflora L.* Arch Toxicol. 2010.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; ARAÚJO, A. J., PESSOA, C.; LEMOS, T. L. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C.. *The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma.* Melanoma Research. No 2, Vol 21, 2011.

VERDECCHIA, A.; MARIOTTO, A.; GATTA, G.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; AJIKI, W.. *Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents.* European Journal of Cancer. v. 39, n. 11, p. 1603-1609, 2003.

VITA, M.; HENRIKSSON, M.. *The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.* Seminars in Cancer Biology. v. 16, p. 318-330, 2006.

VOLPI, E. V.; BRIDGER, J. M. *FISH glossary: na overview of the fluorescence in situ hibridization technique.* Biotechniques. v. 45, p. 385-409, 2008.

WYLLIE, A. H.. *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.* v. 284. Nature, 1980.

XU, A. G.; LI, S. G.; LIU, J. H.; GAN A. H.. *Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer.* World J Gastroenterol . v. 7, p. 403-406, 2001:

YANG G. F.; DENG C. S; XIONG Y.Y.; GONG L.L.; WANG B. C.; LUO J.. *Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with Helicobacter pylori cagA (+) infection.* World J Gastroenterol. v. 10, p. 491-496, 2004.

YASUI, W. *Future Perspectives of Gastric Cancer Treatment - From Bench to Bedside.* v. 78. Pathobiology, 2011.

ZUN-WU, Z. & FARTHING, M. J.G.. *Molecular mechanisms of H. pylori associated gastric carcinogenesis.* v. 5. 5 ed. World Journal of Gastroenterolog, 1999.



## ARTIGO

**Title : Anticancer activity on gastric cancer cell line by Biflorin**

Gleyce S. Barbosa<sup>a</sup>, Luciana Gregório<sup>b</sup>, Telma L. G. Lemos<sup>b</sup>, Rommel R. Burbano<sup>c</sup>, Raquel C. Montenegro<sup>c</sup>, Marne C. Vasconcellos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

\* Correspondence author: marne@ufam.edu.br

Telephone number: +55.92.33055000

Address: Alexandre Amorim street, 330

Zip Code: 69010-080

## Abstract

Stomach cancer is the second cause of cancer death. Advances in genetics and further characterization of each tumor particularities became necessary to regionalize the study of tumors. In this work, we used ACP02, a gastric cancer cell line established from a primary gastric diffuse adenocarcinoma in Pará, to evaluate the potential anticancer of biflorin, a prenyl-ortonaftoquinone obtained from *Capraria biflora* L.'s roots. Biflorin was cytotoxic in ACP02, and the morphological analysis indicated cell death with features of necrosis. In clonogenic assay was observed a decrease in colony formation at all concentrations tested (1.0, 2.5 and 5.0  $\mu$ M) and the cell shape has changed, suggesting induction of cell redifferentiation. NBT test was performed and after 24 h of biflorina treatment differentiation process starts at all concentrations. We used a FISH locus-specific probe for *MYC* and telomere in cells with and without biflorina treatment. We concluded that biflorin has cytotoxic and anticlonogenic activity in ACP02, induces cell differentiation and reduces cell amplification of *MYC* gene, which is involved in cellular differentiation of various tumor types. In addition, biflorin inhibits the *in vitro* migration and reduces the telomeres length, inducing a terminal process in ACP02 cells. These results showed that biflorin acts on important targets of anticancer therapy, when used on the gastric line ACP02, at concentrations around 2.5  $\mu$ M, which makes it a promising substance for the treatment of this tumor type.

Key words: gastric cancer; *MYC*; cell differentiation; telomeres; cytotoxicity.

## Introduction

Gastric cancer is the fourth most common cancer around the world, with a high incidence and mortality for both sexes<sup>1</sup>. In Brazil, the estimative for 2012/2013 is 20.090 new cases of gastric cancer, 12.670 in men and 7420 in women, being this disease the second cause of death by cancer<sup>2</sup>. The survival for gastric cancer is rare from the fact that patients are often diagnosed with advanced disease<sup>3,4</sup>. Therapeutic advances in gastric cancer treatment are late, comparing to others solid organs malignancies. There is not much consensus on optimal systemic treatment. Despite of the ongoing researches using the classical chemotherapy agents (whether as single-agent or combination therapy), there has been a lack of efficacy of these treatments<sup>5</sup>. Therefore, the efforts on development of new drugs that target molecular aberrancies in signal transduction pathways specific to gastric cancer is even more needed and relevant.

The multistep carcinogenesis of gastric cancer is still not well understood. Chromosome instability can lead to the loss of tumor suppressor genes, the activation of oncogenes and the multiple mutations<sup>6,7</sup>. Also, abnormal cell differentiation can be related to tumor formation<sup>8</sup>. Therefore, agents that induce differentiation of tumor cells can induce redifferentiation in these cells and restore their normal phenotype or cause a terminal differentiation leading to cell death, being a useful biological treatment strategy. There is not much literature on gastric cancer cell differentiation. However, recently, Bai and collaborators (2010) showed that sodium butyrate (NaB), a histone deacetylase inhibitor, could induce gastric cancer cell differentiation<sup>9</sup>.

In this context, Biflorin, an *o*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*, has been found to be cytotoxic to several cancer cell lines and *in vivo* models<sup>10-13</sup>.

Gastric cancer cell lines are useful tools to study the clonal evolution of this malignancy and new experimental drugs. However most of these cells are derived from Asia samples<sup>14</sup>.

In 2004, Lima and collaborators established a new gastric cell line from a primary human gastric tumor from the North of Brazil<sup>15</sup>. Furthermore, other three cell lines were established from the same group and cytogenetic characterization was performed<sup>16</sup>. Chromosome 8 trisomy, where *MYC* oncogene is located, was found to be one of the most important molecular alterations leading to gain function<sup>17</sup>.

Activated signaling of *MYC* gene-family members (c-MYC, MYCN, MYCL) is a hallmark of many cancer types. *MYC* genes can activate and repress transcription of target genes through distinct mechanisms and contributes to tumorigenesis by promoting cell growth, metastasis, angiogenesis and genomic instability and differentiation<sup>18-21</sup>. High *MYC* amplification has frequently been observed in primary tumors from individual from the North of Brazil, making the cell model suitable to study gastric cancer molecular pathways and treatment<sup>22-24</sup>. It has been shown that the reduction of *MYC* amplification allows the neoplastic cell terminal differentiation, especially hematopoietic, but also in other cell lines, such as adipocytes, pancreatic cells, endocrine cells, keratinocytes, melanocytes, nerve cells and teratocarcinomas<sup>25-30</sup>.

Sachs (1978) and Waxman (1986) have already reported the importance of this evidence, since the induction of terminal differentiation, necessary for cell death, is a potentially less toxic alternative treatment for cancer<sup>31</sup>.

Considering the necessity to find new alternatives for the gastric cancer treatment and the importance for unraveling action mechanisms of promising cytotoxic drugs, this study evaluated the biflorin's activity on cell viability, clonogenicity, motility, differentiation, telomere length and *MYC* amplification in ACP02 cell line.

## **Material and Methods**

### **Chemicals**

Biflorin (Figure 1) was obtained as previously described<sup>32,33</sup>, and was always above 95% purity. Doxorubicin hydrochloride (adriamycin, CAS no. 25316-40-9) was purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), AlamarBlue™ (CAS no. 153796-08-8 St. Louis, MO, USA) and penicillin/streptomycin (USB, Cleveland, OH, USA). DMSO (dimethylsulfoxide) (CAS no. 67-68-5), DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) and fetal calf serum were purchased from Gibco® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Crystal violet (CAS no. 548-62-9), Methanol (CAS no. 67-56-1), Glacial Acetic Acid (CAS no. 64-19-7) was purchased from Merck; KCl (CAS no. 74-47-40-7), PMA (CAS no.16561-29-8), Nitrotetrazolium Blue Chloride (CAS no. 298-83-9) was purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

### **Cell line and cell culture**

ACP02 (human gastric adenocarcinoma), AGP01 (human gastric ascites), PG100 (human gastric adenocarcinoma) and MRC5 (normal human fibroblast) cells were obtained from João de Barros Barreto, University Hospital (HUJBB) in Pará State, Brazil. The cells were maintained in DME medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were split every 3 days and were diluted 1 day before each experiment.

## **Citotoxicity**

ACP02, AGP01, PG100 and MRC5 cells, seeded in 96-well plates ( $0,5 \times 10^4$  cells per well), were treated, in triplicate, with biflorin, doxorubicin or DMSO solvent and the AlamarBlue™ assay was performed<sup>34,35</sup>. The concentrations used were: Biflorin from 1.25 to 20  $\mu\text{M}$ , Doxorubicin (positive control) from 0.078 to 5  $\mu\text{M}$  and DMSO (negative control) 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . After treatment cells were incubated for 24, 48 and 72 h and then 10  $\mu\text{L}$  of AlamarBlue™ 0,02% was added to each well. After 2 h, the fluorescent signal was monitored in a multiplate reader using 530-560 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength. The fluorescent signal generated was directly proportional to the number of living cells in the sample, as soon as only viable cells are capable of metabolizing the salt originating its fluorescent form. The  $\text{IC}_{50}$  values and their 95% confidence intervals (CI 95%) were obtained by sigmoidal nonlinear regression using the GRAPHPAD prism5 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

## **Tripan Blue exclusions**

Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion test<sup>36</sup> after incubation of ACP02 cells ( $2.5 \times 10^4$  cells/mL) with biflorin at 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ , 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 0.16  $\mu\text{M}$  and DMSO 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . After 24 and 72 h of treatment, both, the supernatant and the trypsinized cells, were completely collected. 90  $\mu\text{L}$  of this cells suspension was mixed to tripan blue (10  $\mu\text{L}$ ) and, after 60 seconds, cells that excluded tripan blue were counted in a Neubauer chamber.

### **Analysis of morphological changes**

ACP02 cells treated with biflorin (1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ) and DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) were examined by light microscopy (LeicaDM500, Heerburgg, Swiss) and morphological changes were evaluated. To prepare the slides, the cells were harvested, transferred to cytospin slides, fixed with ethanol for 1 min and stained with hematoxylin–eosin<sup>11</sup>.

### **Clonogenic assay**

After biflorin treatment (1.0  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  and 5.0  $\mu\text{M}$ ), cells (400 cells/per well) were incubated in complete medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  for 7 days. Colonies were washed with PBS and fixed with methanol (P.A.), stained with crystal violet (0.1%), counted, and the survival expressed as a percentage relative to the negative control treatment (DMSO 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )<sup>37</sup>. The statistical analysis were performed by ANOVA 1way using the GRAPHPAD prism5 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

### **Migration**

Cells were cultured in 12 well plates ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) and, after 24h, treated with Biflorin (1.0, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ) and DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). After 24 h of treatment the "scratch" was done and the behavior of cells was observed and photographed at 0, 24 and 48 h<sup>38</sup>.

### **NBT reducing activity**

ACP02 cells ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) were treated with biflorin (1, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ), DMSO (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) and TPA (0,16  $\mu\text{M}$ ) for 24 and 72 h. Then the NBT reducing activity was determined by the method described by Kohroki and collaborators<sup>39</sup>. Briefly, after the incubation, cells were harvested and centrifuged. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (PBS) and 100  $\mu\text{L}$  of a solution containing TPA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and NBT (2  $\text{mg}/\text{mL}$ ) freshly prepared. This was incubated for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of cold PBS (3 mL). The suspension was centrifuged, resuspended in PBS and transferred to cytospin slides. After centrifugation (5 min/1000 rpm) the cells were fixed in slides with ethanol (1 min), and stained with safranin (0,5%). Two hundred cells were counted using light microscopy, differentiating the stained ones with purple, which metabolized TPA, from those colored in pink, which didn't metabolized it. The statistical analysis were performed by ANOVA 2way using the GRAPHPAD prism5 software (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

### **Fluorescent in situ hybridization analysis**

For FISH analysis, metaphasic and/or tumoral interphasic nuclei, with or without treatment with biflorin (1, 2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ), were hybridized with a probe specific for the region of the *MYC* gene (8q24.12–q24.13) (ONPONC0824; Bioagency<sup>®</sup>). The hybridization was visualized by a fluorescence microscope (Olympus BX41) with a double filter (FITC/TRITC) and a capture and image analysis system (Applied Spectral Imaging<sup>®</sup>). Two hundred interphasic nuclei and/or

metaphase events were evaluated per slide and the fluorescent signals were verified. Untreated normal lymphocyte nuclei were used as negative controls, whereas untreated ACP01 cells were used as positive control to *MYC* amplification<sup>40,41</sup>.

For fluorescence in situ hybridization with probes to telomeric sequences (TELO-FISH) used the method of Lansdorp (1995) and Lansdorp *et al* (1996)<sup>42,43</sup>. Nuclei obtained from temporary culture of human lymphocytes, using the protocol established by Preston *et al.* (1987)<sup>44</sup>, were fixed (3 methanol: 1 acetic acid) on slides. The slides were hybridized with a telomeric probe pan Star FISH, following the manufacturer's recommendations. The measurement of telomere length, determined in each interphase nucleus was acquired by the image capture software "Applied Spectral Imaging image analysis system." The images were processed using the TFL-TELO software following the protocol<sup>45</sup>. The statistical analyze were performed by ANOVA 2way using the GRAPHPAD program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

## Results

### **Biflorin displayed *in vitro* cytotoxicity in gastric cancer cell line**

The cell lines were treated with biflorin for 24 and 72 h and analyzed by Alamar blue assay. Table 1 shows the obtained IC<sub>50</sub> values. The IC<sub>50</sub> values ranged from 0.73 μM in MRC5 (human normal fibroblast) to 7.08 μM in PG100 (human gastric cancer) cell lines. Doxorubicin showed IC<sub>50</sub> values from 0.1 μM in MRC5 (human normal fibroblast) to 5.89 μM in AGP01 (human gastric cancer). All subsequent experiments were carried out in ACP02 gastric cancer cells. For mechanistical purposes, the experiments were conducted after 24 h and 72 h incubation, at concentrations corresponding to 1.0, 2.5, and 5.0 μM of biflorin.

### **Effects of biflorin on ACP02 differentiation**

Morphological examination of ACP02 gastric cancer cells showed drug-mediated changes (Fig. 2). ACP02 cells treated with biflorin, at all tested concentrations, presented morphology consistent with necrosis, cytoplasmatic vacuolization and tumescence, naked nuclei, disappearance of the nuclear and homogeneous nucleus with appearance pyknotic nucleus. After ten days of treatment was observed a decreased of clones formation (Fig. 3), morphologically this cells treated with biflorin showed an aspect similar to neuronal cells, this behavior might suggest induction of differentiation. The same time, the migration results (Fig. 4) demonstrated that the distance between scratch borders after 24 and 72 h of treatment has

decreased quickly in control cells than in treated cells, what can be related with cell proliferation reduction or an antimetastatic activity. Further to confirm the ability of biflorin to induce cell differentiation, the NBT reduce assay was performed. After 24 h, cell exposed to biflorin at all doses start the differentiation. Biflorin-induced cell differentiation was maximal at 72 h incubation (Fig. 5).

### **Molecular cytogenetics analysis**

*MYC* amplification and telomere size were evaluated by FISH. The 200 cells analyzed after Biflorin treatment (2.5 and 5  $\mu$ M), 24 h and 72 h, had a significant increase percentage of cells exhibiting 1 – 2 signals and proportional reduction on that exhibiting 3-5 signals in *MYC* amplification assay (Tab. 2). In telomere we observed a significant elongation reduction on biflorin treated cells (5.0  $\mu$ M - 24 and 72 h) (Tab. 3).

## Discussion

Gastric cancer is one of the most aggressive cancer in the world. Patients with inoperable, recurrent or metastatic tumors are incurable and prognosis is about few months with best supportive care. In despite of the progress in recent decades, the metastatic gastric cancer remains an incurable disease. The drugs used for treatment are not efficient. The strategies for the future are based on new cytotoxic drugs, targeted therapies, identification of predictive or prognostic markers and integration of molecular determinants, which may help to select patients likely to benefit from treatment<sup>46</sup>. In this way, the screening for new drugs is a constant search. Biflorin an o-naphthoquinone isolated by roots of *Capraria biflora* L. have already been very promising, as proposed for the treatment of cancer. Vasconcellos and co-workers<sup>10-13</sup> over the past seven years have shown that this molecule is cytotoxic to various tumor cells *in vitro*, has activity *in vivo* against tumor models Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma and melanoma, the latter with the increased survival of the animals. In this work, we demonstrated that the values of IC<sub>50</sub> in gastric cell lines by Alamar Blue test is very significantly, in ACP02, the lineage chosen for the development of research on the potential of biflorin against gastric tumors. After 72 hours the IC<sub>50</sub> was 1.92  $\mu$ M (0.73  $\mu$ g/ml) (Tab. 1) and, according to the literature, pure compounds can be considered promising to justify further studies when presenting IC<sub>50</sub> less than 1  $\mu$ g/ml<sup>47</sup>. In MRC5 cell line (Human normal fibroblast) biflorin was citotoxicity but Vasconcellos e collaborators<sup>10-13</sup> demonstrated that this compound in V79 cells (Hamster Chines Fibroblast), Yeast and *Salmonella thiphymurim* was not mutagenic. Biflorin reduced ACP02 cell viability but didn't cause significant increase in the number of unviable cells (data not show). The same event was observed in B16 cells (Vasconcellos et al; 2011). In the clonogenic assay biflorin was able to reduce the number of colony cells (Fig. 3) at all doses. In the migration assay, biflorin inhibited the migration of human gastric cancer cell ACP02 in 2.5 and 5.0  $\mu$ M at 24 and 48

hours after biflorin's treatment (Fig. 4). Others quinones demonstrated similar activities. Kim and collaborators (2007)<sup>48</sup> showed that  $\beta$ -lapachone inhibited migration of both, HepG2 and Hep3B cells, in wound-healing experiment and confirmed this approach with matrigel invasion assay, these findings were associated with a dramatic increase of erg-1 and thrombospondin-1 protein levels and a down-regulation of Snail and up-regulation of E-cadherin expression. The same experiments were performed for Manu and collaborators (2011)<sup>49</sup>, using plumbagin on breast and gastric cancer cells, showing that this drug could inhibit CXCL12-induced migration and invasion, when the suppression of CXCR4 expression is observed. Chia and collaborators (2010)<sup>50</sup> tested Chinese herbal cocktail Tien-Hsien Liquid, which could inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231, H1299, PC-3, and CT-26 cancer cells, determined by Boyden chamber transwell assays. An anthraquinone, Aloe-Emodin, showed the same inhibition and it was associated with the suppression of MMP-2 and MMP-9 proteins expressions<sup>51</sup>.

Cell differentiation is essential for normal growth and dedifferentiation is a key process in the development of malignant tumors. Therefore, drug-induction of re-differentiation of tumor cells is an important mechanism of some anticancer chemotherapy, discovery of differentiation inducing factors is a critical strategy of drug development<sup>52</sup>. The changes in morphology was the first indicator that biflorin could induce cell redifferentiation. The ability of treated cells to reduce NBT implies functional redifferentiation and the results demonstrated a time- and dose-dependent effect on NBT reduction, which was maximal at 72 h with 5.0  $\mu$ M (Fig. 5). Others studies with gastric cells lines demonstrated different pathways responsible by this phenomenon. Ling and co-workers (2006)<sup>53</sup> describe the effect of a substance extracted by garlic (Diallyl disulfide) of inducing cell differentiation on MGC803 cells by ERK pathway inhibition. In a study with SGC7901 cells, Zhang and collaborators (2011)<sup>52</sup> showed that these cells treated with melatonin demonstrated more morphological differentiation than cells untreated, but the authors correlated the results to the negative balance of alkaline phosphatase and lactate

dehydrogenase, enzymes involved on differentiation in gastric tissue. Another work with SGC7901 cells demonstrated that p27 but not p21, is an important protein involved on cell differentiation of gastric cancer<sup>54</sup>. Our study, analyzed the *MYC* gene by fluorescence in situ hybridization (FISH). *MYC* is a proto-oncogene commonly deregulated in gastric cancer, which is involved, mainly, in cell cycle regulation and growth arrest<sup>55</sup>. It has become clear that the proto-oncogene *MYC* is an important regulator of cell growth and the enhanced expression of the *MYC* contributes for almost every aspect of tumor cell biology, including angiogenesis, dedifferentiation, cell adhesion reduction and metastasis promotion<sup>9,56,57</sup>. Our group found that biflorin treated cells (2.5 and 5.0  $\mu\text{M}$ ) showed a significant reduction of *MYC* amplification (Tab. 2) which can be a result of a selective cytotoxicity or a proteolytic degradation of this gene<sup>58</sup>.

Telomeres, the DNA-protein complex present at the end of eukaryotic chromosomes, are protective against events that promote genomic instability, such as degradation of the chromosome terminal regions and inappropriate recombination. These chromosomal regions are specific to the action of telomerase, a specialty reverse transcriptase ribonucleoprotein that acts in the maintenance of telomere<sup>59</sup>. Telomerase activity is suppressed in most normal human somatic cells, these cells lose gradually telomeric portions, every cell cycle, due to the lack of telomerase activity. Many studies correlate this loss with the aging process and death<sup>60,61</sup>. On the other way, up-regulation of telomerase activity and telomere enhance is found in most cancer cells, what is associated with immortalization and unlimited cell division. This specific expression in affected carcinogenic tissues justify telomeres as a great target for anticancer therapy<sup>59</sup>. It has been shown that telomere enhance and telomerase activation are also common findings in cases of gastric cancer<sup>62,63</sup>. We observed that biflorin (5.0  $\mu\text{M}$ ) reduces the telomeres length after 24 and 72h of treatment (Tab. 3). Another quinone,  $\beta$ -lapachone, decreased telomerase activity in human leukemia cells (U937, K562, HL60, and THP-1)<sup>64</sup> and

in human prostate DU145 carcinoma cells<sup>65</sup>, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of these substances group.

## **Conclusions**

In conclusion, we have shown that biflorin affects cell survival, clonogenicity, motility, which are hallmarks of cancer, and promote cell redifferentiation, which seem to be associated to a reduction of *MYC* amplification. In addition, telomeres length is also affected, this length reduction corroborates to the approach that this substance may reduce the cell immortalization in ACP02 cell line.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Brazilian Agencies CNPq, FAPESP and CAPES for fellowships and financial support.

There is no conflict of interest to declare.

## References

[1] IARC - International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2008* – Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Available in: <http://globocan.iarc.fr/>. Access: 2012.

[2] INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil. Available in: <http://www.inca.gov.br/atlas/>. Access: 2012.

[3] Y. Jiang, J.A. Ajani, Multidisciplinary management of gastric cancer, *Current Opinon in Gastroenteroly*. 26 (2010) 640-6

[4] P. Milkvý, Multimodal therapy of gastric cancer, *Dig. Dis*. 28 (2010) 615-8.

[5] J. Yoong, M. Michael, T. Leong, Target therapies for gastric cancer, *Drugs* 71 (2011) 1367-1384.

[6] J.P. Murnane, Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer, *Cancer Res*.70 (2010) 4255-9.

[7] R.J. O'Sullivan, J. Karseder, Telomeres: protecting chromosomes against genome instability, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 11 (2010) 171-81

[8] L. Siminovitch, A.A. Axelrad, Cell-Cell interactions *in vitro*: Their relation to differentiation and carcinogenesis, *Proc. Can. Cancer Conf*. 5 (1963) 149-65.

- [9] Z. Bai, Z. Zhang, Y. Ye, S. Wang. Sodium butyrate induces differentiation of gastric cancer cells to intestinal cells via the PTEN/phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cell Biology International* 34 (2010) 1141-1145
- [10] M.C. Vasconcellos, R.C. Montenegro, G.C. Militao, A.M. Fonseca, O.D. Pessoa et al, Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*, L., *Z. Naturforsch C.* 60 (2005) 394-398.
- [11] M.C. Vasconcellos, D.P. Bezerra, A.M. Fonseca, M.R. Pereira, T.L. Lemos, et al, Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1416-1421.
- [12] M.C. Vasconcellos, D.P. Bezerra, A.M. Fonseca, A.J. Araujo, C. Pessoa, et al, The *in-vitro* and *in-vivo* inhibitory activity of biflorin in melanoma. *Melanoma Res.* 21 (2011) 106-114.
- [13] M.C. Vasconcellos, D.J. Moura, R.M. Rosa, M.S. Machado, T.N. Guecheva, C. Pessoa, ;-l. Villela, B.F. IMMICH, R.C. Montenegro, A.M. Fonseca, T.L.G. Lemos, M.E.E. Moraes, J. Saff, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, J.A.P. Henriques. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L., *Arch. Toxicol.* 84 (2010) 799-810.
- [14] H. Hojo, Establishment of cultured cell lines of human stomach cancer origin and their morphological characteristics, *Niigata Igakukai Zassi* 91 (1977) 737-763.
- [15] E.M. Lima, J.D. Rissino, M.L. Harada, P.P Assumpção, S. Demachki, A.C. Guimaraes, C. Cassartelli, M.A.C. Smith, R.R. Burbano. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (2004) 1831-1838.9

[16] M.F. Leal, J.L.M. Nascimento, C.E.A. Silva, et al, Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 195 (2009) 85-91.

[17] M.F. Leal, D.Q. Calcagno, J.F.F.B. Costa, T.C.R. Silva, A.S. Khayata, E.S. Chen, P.P. Assumpção, M.A.C. Smith, R.R. Burbano. MYC, TP53, and Chromosome 17 Copy-Number Alterations in Multiple Gastric Cancer Cell Lines and in Their Parental Primary Tumors. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

[18] S. Adhikary, M. Eilers, Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6 (2005) 635–645

[19] C.V. Dang, K.A. O`Donnell, K.I. Zeller, T. Nguyen, R.C. Osthus, F. Li, The *c-Myc* target gene network, *Seminars in Cancer Biology* 16 (2006) 253-264.

[20] B. Hoffman, D.A. Liebermann, The proto-oncogene *c-myc* and apoptosis, *Oncogene*, 17 (1998) 3351-3357.

[21] E.B. Thompson, The Many Roles of *C-Myc* in Apoptosis, *Annu. Rev. Physiol.* 60 (1998) 575-600.

[22] D.Q. Calcagno, M.F. Leal, S.S. Taken, P.P. Assumpção, S. Demachki, M.A. Smith, R.R. Burbano. Aneuploidy of chromosome 8 and C-MYC amplification in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma, *Anticancer Res.* 25 (2005): 4069-4074.

[23] D.Q. Calcagno, M.F. Leal, A.D. Seabra, A.S. Khayat, E.S. Chen, S. Demachki, P.P. Assumpção, M.H. Faria, S.H. Rabenhorst, M.V. Ferreira, M. Smith, R.R. Burbano Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, C-MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *World Journal Gastroenterology*. 38 (2006) 6207-11.

[24] P.P. Assumpção, G. Ishak, E.S. Chen, S.S. Takeno, M.F. Leal, A.C. Guimarães, D.Q. Calcagno, A.S. Khayat, S. Demachki, M.A. Smith, R.R. Burbano, Numerical aberrations of chromosome 8 detected by conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma, *Cancer Genet. Cytogenet.* 169 (2006) 45-9.

[25] A. E. Griep, H. Westphal, Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells, *Developmental Biology. Proc. Natd. Acad.* 85 (1988) 6806-6810.

[26] M. Buschbeck, I. Uribealago, A. Ledl, A. Gutierrez, S. Minucci, S. Muller, L.Di. Croce, PML4 induces differentiation by Myc destabilization PML inhibits repressive Myc functions, *Oncogene* 26 (2007) 3415-3422.

[27] C. Demeterco, P. Itkin-Ansari, B. Tyrberg, L. P. Ford, R. A. Jarvis, F. Levine, c-myc Controls Proliferation Versus Differentiation in Human Pancreatic Endocrine Cells, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 7 (2002) 3475–3485.

[28] A. Gebhardt, M. Frye, S. Herold, S.A. Benitah, K. Braun, B. Samans, F.M. Att, H. Elsässer, M. Eilers, Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1, *The Journal of Cell Biology* 172 (2006) 139-149.

[29] Y. Takahashi, N. Ohoka, H. Hayashi, R. Sato, TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPAR $\gamma$  transcriptional activity, *Journal of Lipid Research* 49 (2008) 880-892.

[30] R.C. Montenegro, M.C. Vasconcellos, F.S. Bezerra, M. Andrade-Neto, C. Pessoa, M.O. Moraes, L.V. Costa-Lotufo, Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells, *Toxicology in Vitro* 21 (2007) 795-800.

[31] M. Leszczyniecka, T. Roberts, P. Dent, S. Grant, P.B. Fisher, Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications, *Current Cancer Drug Targets*, 3 (2003) 163-175.

[32] O. Gonçalves, I.L. D'Albuquerque, M.C.P. Navarro. *Novo Método de Extração Purificação da Biflorina com Possibilidade Industrial*. *Revista do Instituto de Antibióticos de Recife*. 4 (1962) 79-81.

[33] A.M. Fonseca, O.L.D. Pessoa, E.R. Silveira, T.L.G. Lemos, F.J.Q. Monte, et al, Total assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*, *Magnetic Resonance in Chemistry* 41 (2003) 1038-1040.

[34] G.R. Nakayama, M.C. Caton, M.P. Nova, Z. Parandoosh. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*. 204 (1997) 205–208.

[35] S.A. Ahmed, R.M. Gogal, W.J.E. Jr., A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation assay, *J. Immunol. Methods* 170 (1994) 211-224.

[36] D. Renzi, M. Valtolina, R. Foster, The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system, *ATLA* 21 (1993) 89–96.

[37] J. Plumb. *Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay*. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. 88 (2004) 159-164.

[38] Liang, A.Y. Park, J. Guan, In vitro scratch assay: a convenient inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2 (2007).

[39] J. Kohroki, N. Muto, T. Tanaka, N. Itoh, A. Inada, K. Tanaka, J. Durham, G. Brown. Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukemia cell lines. *Leukemia Research*. 22 (1998) 405–412.

[40] E. V. Volpi, J. M. Bridger. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*. 45 (2008) 385-409.

[41] R. Bishop. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*. 3 (2010) 85-95.

[42] P.M. Lansdorp, Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells, *J. Cell Sci*. 108 (1995) 1-6.

[43] P.M. Lansdorp, N.P. Verwoerd, F.M. van de Rijke, V. Dragowska, M.T. Little, R.W. Dirks, H.J. Raap, Heterogeneity in telomere length of human chromosomes, *Hum. Mol. Gen.* 5 (1996) 685-91.

[44] R.J. Preston, J.R. San Sebastian, A.F. McFee, The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents, *Mutat. Res.* 189 (1987), 175–183.

[45] S.S. Poon, U.M. Martens, R.K. Ward, P.M. Lansdorp, Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy, *Cytometry*. 36 (1999) 267-78.

[46] F. Pasini, A.P. Fraccon, G. DE Manzoni, The role of chemotherapy in metastatic gastric cancer, *Anticancer Res.* 31 (2011) 3543-54.

[47] C. PESSOA, E.R. SILVEIRA, T.L.G. LEMOS, L.A. WETMORE, M.O. MORAES, A. LEYVA, Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil, *Phytotherapia Research* 14 (2000) 187-191.

[48] S.O. Kim, J.I. Kwon, Y.K. Jeong, G.Y. Kim, N.D. Kim, Y.H. Choi, Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 2169-76.

[49] K.A. Manu, M.K. Shanmugam, P. Rajendran, F. Li, L. Ramachandran, H.S. Hay, R. Kannaiyan, S.N. Swamy, S. Vali, S. Kapoor, B. Ramesh, P. Bist, E.S. Koay, L.H. Lim, K.S. Ahn, A.P. Kumar, G. Sethi, Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4, *Mol. Cancer* 1 (2011) 107-10.

[50] J.S. Chia, J.L. Du, W.B. Hsu, A. Sun, C.P. Chiang, W.B. Wang, Inhibition of metastasis, angiogenesis, and tumor growth by Chinese herbal cocktail Tien-Hsien Liquid, *BMC Cancer* 30 (2010) 175-190.

[51] S.H. Chen, K.Y. Lin, C.C. Chang, C.L. Fang, C.P. Lin. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 2296-303.

[52] S. Zhang, L. Zuo, S. Gui, Q. Zhou, W. Wei, Y. Wang, Induction of cell differentiation and promotion of endocan gene expression in stomach cancer by melatonin, *Mol. Biol. Rep.* (2011).

[53] H. Ling, LY. Zhang, Q. Su, Y. Song, ZY. Luo, X.T. Zhou, X. Zeng, J. He, H. Tan, JP. Yuan, Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803, *Cell Mol. Biol. Lett.* 11 (2006) 408-23.

[54] M. Wei, Z. Wang, H. Yao, Z. Yang, Q. Zhang, B. Liu, Y. Yu, L. Su, Z. Zhu, Q. Gu, P27Kip1, regulated by glycogen synthase kinase-3b, results in HMBA-induced differentiation of human gastric cancer cells, *BMC Cancer* 11 (2011) 1-12.

[55] D.Q. Calcagno, M.F. Leal, P.P. Assumpção, M.A.C.Smith, R.R.Burbano, MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis, *World J. Gastroenterol.* 21 (2008) 5962-5968.

[56] R.R. Burbano, P.P. Assumpção, M.F. Leal, D.Q. Calcagno, A.C. Guimarães, A.S. Khayat, S.S. Takeno, E.S. Chen, S.M.A. Cardoso, C-MYC locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil, *Anticancer Res.* 26 (2006) 2909-14.

[57] R.N. Eisenman, Deconstructing Myc, *Genes and Development* 15 (2001) 2023-2030.

[58] H.F. Ribeiro, D. Q. Calcagno, D.F.A. Alcântara, N.M.M. Melazzo, M.A.C Smith, R.R. Burbano, M.O. Bahia. Expressão dos genes MYC e FBXW7 em linhagem celular de adenocarcinoma gástrico (PG100) exposta ao medicamento homeopático. (2010) Resumo do 56º Congresso Brasileiro de Genética.

[59] E.H. BLACKBURN, Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions, *FEBS Letters* 579 (2005).

[60] R.R. Reddel, Genes involved in the control of cellular proliferative potential, *Ann. NY. Acad. Sci.* 854 (1998).

[61] M. Meyerson, Telomerase enzyme activation and human cell immortalization, *Toxicol. Lett.* (1998).

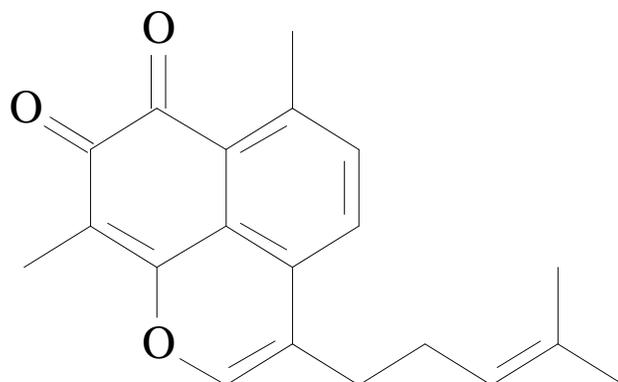
[62] S.P. Lichtsteiner, J. S. Lebkowski, A.P. Vasserot, Telomerase: A Target for Anticancer Therapy, *Ann. NY. Acad. Sci.* 886 (1999).

[63] X. Tian, B. Chen, X. Liu, Telomere and Telomerase as Targets for Cancer Therapy, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010).

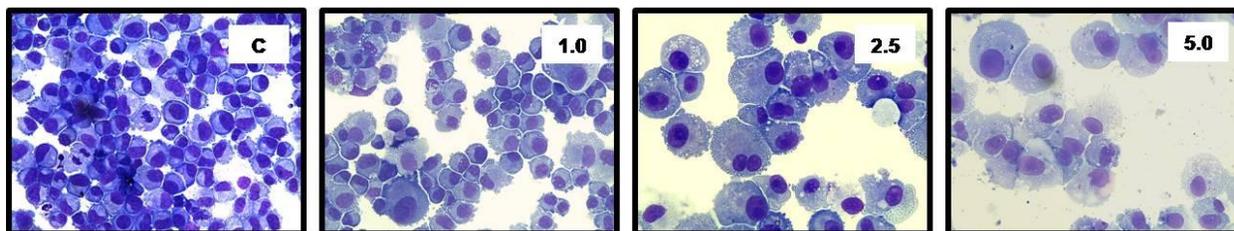
[64] DO. Moon, CH. Kang, MO. Kim, YJ. Jeon, JD. Lee, Y.H. Choi, GY. Kim,  $\beta$ -Lapachone (LAPA) Decreases Cell Viability and Telomerase Activity in Leukemia Cells: Suppression of Telomerase Activity by LAPA, *Journal of Medicinal Food* 13 (2010) 481-488.

[65] J.H. Lee, J.H. Cheong, Y.M. Park, Y.H. Choi, Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by  $\beta$ -lapachone in human prostate carcinoma cells, *Pharmacological Research* 51 (2005) 553–560.

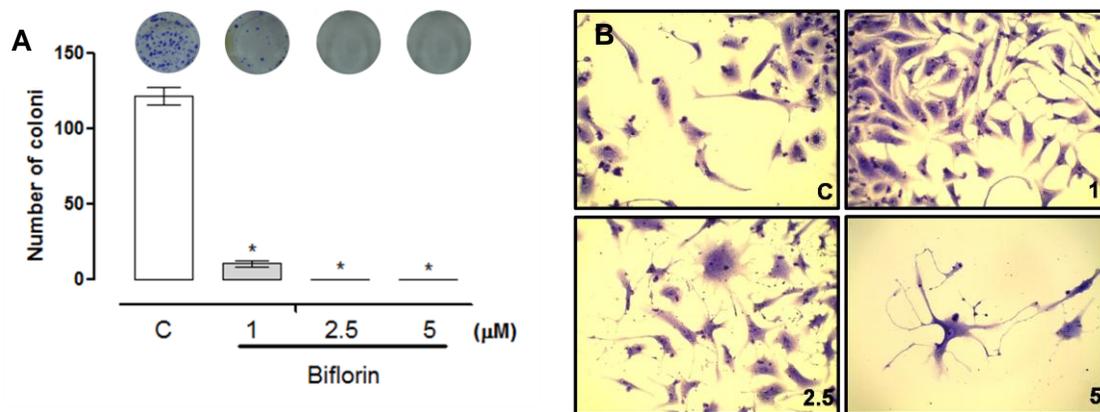
## Illustrations



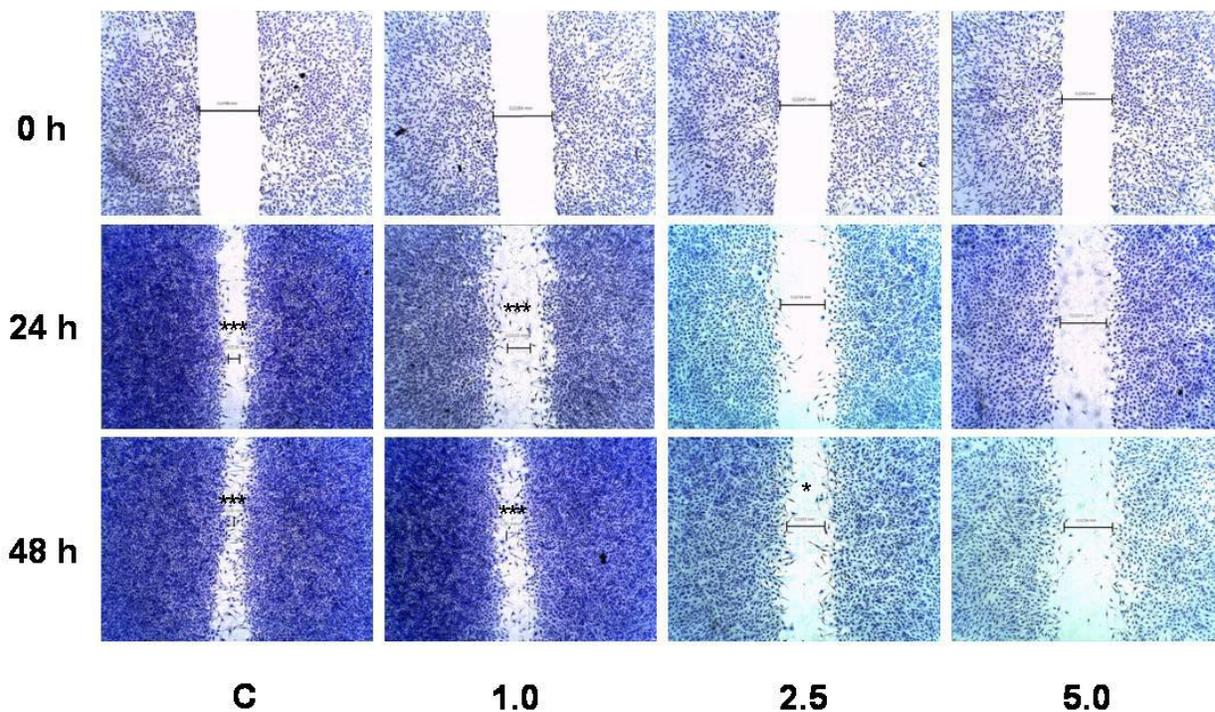
**Figure 1.** Chemical structure of biflorin (6,9-dimethyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)naphtha[1,8-*bc*]-pyran-7,8-dione).



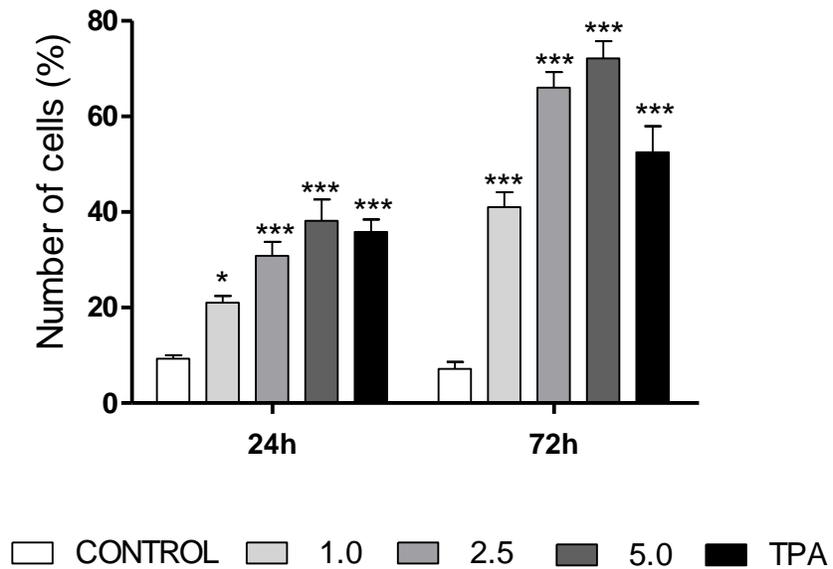
**Figure 2.** Morphological analysis of ACP02 stained with hematoxylin/eosin 72 h after treatment. (C) Untreated cells (400x); (1.0)(2.5)(5.0) treated with biflorina 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu$ M (400x), respectively.



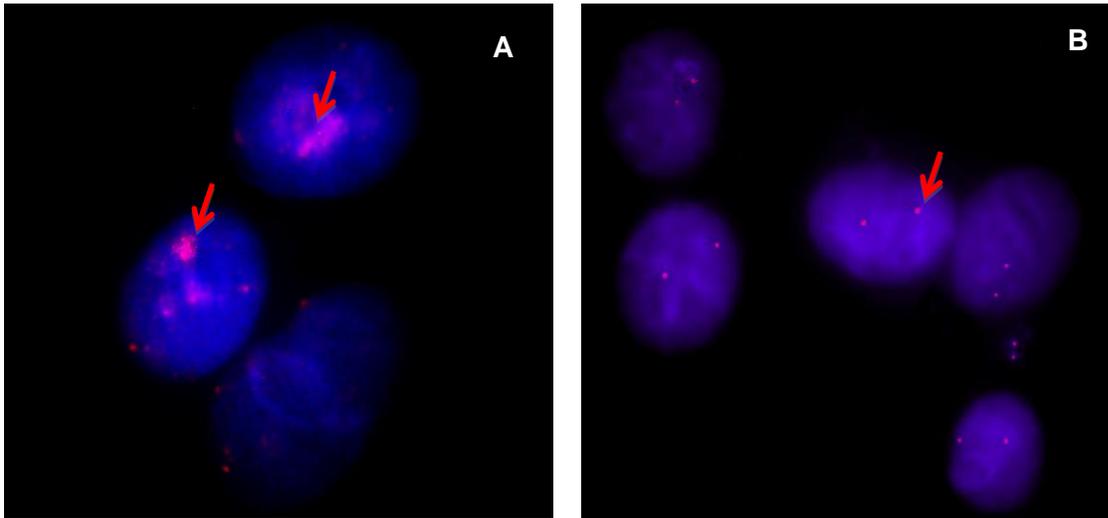
**Figure 3. A** – Numbers of colonies and **B** - Morphological analysis of ACP02 colony stained with crystal violet. Experiments performed after 10 days of treatment.. (C) Untreated cells, (1, 2.5, 5.0) treated with biflorin 1.0, 2.5 and 5.0 μM (200 x). \* $p < 0.05$ .



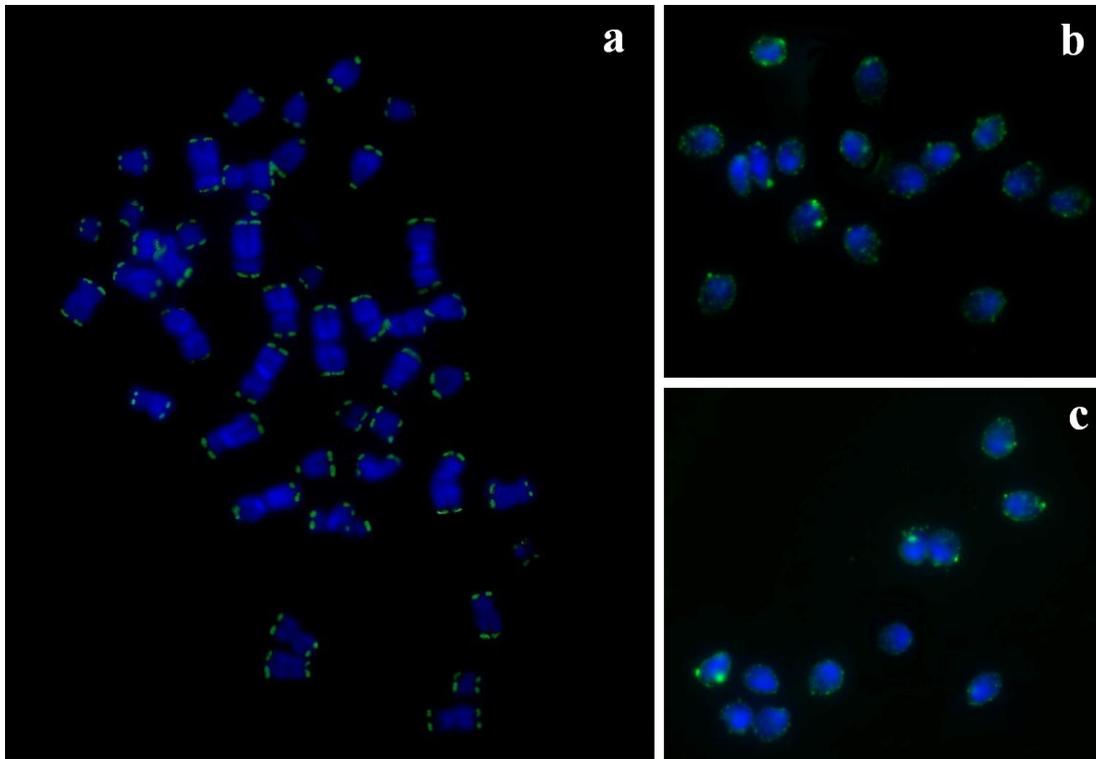
**Figure 4.** Migration processes of ACP02 after scratching the cell layer (0, 24 and 48 h) (40 x). (C) Untreated cells, (1, 2.5, 5.0) treated with biflorin (1.0, 2.5 and 5.0 μM). \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 5.** ACP02 differentiation analysis in NBT test after 24 and 72h of treatment. 24h (C) Untreated cells; (1.0)(2,5)(5.0) treated with biflorin 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu$ M, (TPA) treated with TPA 0.16  $\mu$ M; 72h (C) Untreated cells; (1.0)(2,5)(5.0) treated with biflorin 1.0, 2.5 and 5.0  $\mu$ M.; (TPA) treated with TPA 0.16  $\mu$ M. \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001.



**Figure 6.** Cells submitted to FISH with locus-specific probe for *MYC*; (A) ACP02 cells before treatment with biflorin (positive control): arrows indicate high *MYC* amplification at 8q24.1; (B) ACP02 after treatment with biflorin (5.0  $\mu$ M): reduction of *MYC* amplification.



**Figure 7.** Cells submitted to FISH with locus-specific probe for telomere. (A) Control – Humans Lymphocytes without treatment; (B) Untreated ACP02 cells (positive control); (C) ACP02 after treatment with biflorin (5.0 μM): reduction of telomere length.

**Table 1** - Cytotoxic activity of biflorin on cell lines (CL<sub>50</sub> in μM).

Cell Lines	Biflorin 24 h	Biflorin 72 h	Doxorubicin 24h	Doxorubicin 72h
<b>ACP02</b>	3.46 (2.83 – 4.22)	1.92 (1.7 – 2.19)	1.12 (0.84-1.50)	1.30 (1.21 – 1.41)
<b>AGP01</b>	5.63 (3.08 – 10.30)	3.44 (3.32 – 3.56)	< 10	5.89 (4.76 - 7.30)
<b>PG100</b>	7.08 (6.26 – 8.00)	6.35 (5.67 – 7.11)	0.45 (0.38 - 0.52)	0.43 (0.37 - 0.51)
<b>MRC5</b>	4.91 (4.27 – 5.66)	0.73 (0.62 – 0.85)	0.98 (0.75 -1.27)	0.10 (0.086 - 0.13)

**Table 2** - FISH analysis of *MYC* copy number in gastric cancer cell line ACP02. <sup>a</sup> The FISH analysis was performed on 200 nuclei. HA: High amplification. \**p*>0.05; \*\**p*>0.01.

	Nuclei exhibiting <i>MYC</i> signals, no. (200 nuclei) <sup>a</sup>					HA
	1 signal	2 signals	3 signals	4 signals	≥5 signals	
<b>C 24 h</b>	3 (1.5)	9 (4.5)	69 (34,5)	82 (41)	29 (14.5)	8 (4)
<b>C 72 h</b>	4 (2)	13 (6.5)	72 (36)	79 (39.5)	23 (11.5)	9 (4.5)
<b>1.0 24h</b>	5 (2.5)	11 (5.5)	65 (32.5)	81 (40.5)	27 (13.5)	11 (5.5)
<b>1.0 72h</b>	6 (3)	15 (7.5)	66 (33)	78 (39)	25 (12.5)	10 (5)
<b>2.5 24h</b>	6 (3)	19 (9.5)*	72 (36)	75 (37.5)	20 (10)*	8 (4)
<b>2.5 72h</b>	8 (4)*	21 (10.5)*	77 (38,5)	74 (37)	17(8.5)	3 (1.5)
<b>5.0 24h</b>	9 (4.5)*	31 (17.5) **	81 (40.5)	69 (34,5)	9 (4.5)**	1 (0.5)
<b>5.0 72h</b>	9 (4.5)*	37 (18.5)**	89 (44.5)*	60 (30)*	4 (2)**	1 (0.5)

**Table 3** - Telomere Fluorescence Intensity in Human Chromosomes as Measured by pan Telomeric Probe. # *Media indirect relative measure of the size of telomeres (units of TFL-TELO software)\* p>0.05.*

	Treatment ( $\mu\text{M}$ )	Allarms (mean#)
<b>24 h</b>	0.0	12.54
<b>72 h</b>	0.0	11.96
<b>24h</b>	1.0	11.10
<b>72h</b>	1.0	10.87
<b>24h</b>	2.5	10.90
<b>72 h</b>	2.5	8.30
<b>24h</b>	5.0	7.00*
<b>72h</b>	5.0	6.52*

## AGRADECIMENTOS

É... se passaram dois anos num piscar de olhos, a jornada está chegando ao final e nesse finalzinho fica a sensação de que “cada dia a mais é um a menos”...

E no fim, o melhor é poder olhar pra trás tendo a certeza de que fiz tudo que estava ao meu alcance e que cultivei no caminho grandes amizades. Sim, porque, mais que um artigo publicado (aspiração de todo pesquisador), fica dessa jornada uma história escrita na companhia de pessoas maravilhosas, com quem aprendi muito mais do que as lições que estão nos livros, artigos, teses, etc... E são a essas pessoas que desejo agradecer.

Primeiro vale lembrar daqueles que mal compreendem o que fazemos, mas respeitam, admiram, apóiam e, no meu caso, aceitam a distância que minhas escolhas impõem. Meu pai, meu herói (*Ednaldo Barbosa*), com quem eu aprendi as maiores lições de vida, tá ai paizinho, “missão dada é missão cumprida!” heheh; minha mãe, minha guerreira (*Rute Barbosa*), uma mulher de fibra com quem eu aprendi a ver sempre o lado bom em todas as situações e nunca me abalar diante dos desafios; meu irmão, meu príncipe (*Ewerton Barbosa*), meu companheirinho, meu confidente, que me cerca de carinho e afeto todos os dias; e minha irmã (*Ewellyn Barbosa*), minha linda, com quem eu aprendi a aceitar, admirar e conviver com as diferenças. FAMÍLIA, obrigada por tudo, sem o apoio de vocês nada seria possível. Amo vocês, amo MUITO!

Impossível não guardar recordações, não sentir saudades dos companheiros de bancada, *Tatiana Pedrosa, Zanair Vasconcelos, Daniele Baraúna, Vitor Renato, Francivaldo Versiani, Nívea Suely, Aline Barros, Iara Filardi, Ana Carolina, Luana Moura, Jéssica Nogueira*, que compartilharam bons e maus momentos, (MUITOS) risos e (algumas) lágrimas. Além dos vizinhos da micologia, da bioquímica, da tecnologia de fármacos, da fitoquímica, da biologia molecular, da UFPA, também companheiros nessa jornada!

E o que dizer da dupla dinâmica da secretaria??? *Luciana e Giane*, vocês são demais! Obrigada por todos os “galhos quebrados” (hehehe), pelas conversas, pelas risadas, pelas broncas (desculpem os transtornos, hehehe).

Agradeço sinceramente a minha orientadora, *Marne Vasconcellos*, pela oportunidade, por ter confiado e apostado em mim, mesmo sem me conhecer previamente, por ter me compreendido em muitas situações... Espero ter conseguido retribuir toda a confiança em mim depositada e quero que fique registrado que a tenho, não só como orientadora, mas como uma amiga!

A minha co-orientadora, *Raquel Montenegro*, que foi uma pessoa que surgiu na minha vida no momento certo, com quem eu compartilhei conversas, recebi conselhos que ficarão para toda vida, fica a minha grande admiração, a minha amizade e o meu agradecimento! Valeu mesmo por tudo!

Mas nem só de laboratório se faz um mestrado... A pessoa que habita a mestranda também contou com o colo de muitos outros amigos imprescindíveis (para a manutenção da sanidade, hehehe): *Carolina Alkmin, Michele Hanae, Maria Christina*,

*Thiago Barbosa, Geyse Mendes, Danilo Pereira*, na ausência física da minha família vocês foram meu alicerce, nos momentos em que eu tive que superar os problemas pessoais pra conseguir seguir em frente, foi em vocês que eu encontrei a força, o carinho, o apoio necessário. Muito, muito obrigada! E que nossa amizade dure eternamente, onde quer que eu ou cada um de vocês esteja!!!

Encerro esse ciclo com a sensação do dever cumprido e com a certeza de levar comigo o conhecimento, os valores, as boas lembranças, que impulsionarão novas conquistas futuras.

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

B238a Barbosa, Gleyce dos Santos

Atividade anticâncer da biflorina em células tumorais gástricas /  
Gleyce dos Santos Barbosa.- Manaus: UFAM, 2012.

110f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal  
do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> .Marne Carvalho de Vasconcellos

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Carvalho Montenegro

1. Câncer gástrico 2. Biflorina 3. Diferenciação- Células gástricas  
I. Vasconcellos, Marne Carvalho de (Orient.) II. Montenegro, Raquel  
Carvalho (Co-Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas. Título

CDU(1987) 616.33-006(043.3)

