

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

AMANDA DE MELO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE LIGNÓIDES NA INIBIÇÃO DA
TOPOISOMERASE II- α HUMANA**

**João Pessoa
2011**

AMANDA DE MELO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE LIGNÓIDES NA
INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II- α HUMANA**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Creusioni Figueredo dos Santos

**João Pessoa
2011**

B574a Bezerra, Amanda de Melo.
Avaliação da Bioatividade de Lignóides na Inibição da
Topoisomerase II-a Humana / Amanda de Melo Bezerra.- João
Pessoa: [s.n.], 2011.
77f. : il.

Orientadora: Creusioni Figueredo dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – UFPb – CCS/LTF

1. Produtos Naturais. 2. Topoisomerase. 3. Lignóides.

UFPb/BC

CDU: 547.9(043)

AMANDA DE MELO BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE LIGNÓIDES NA INIBIÇÃO DA
TOPOISOMERASE II- α HUMANA**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Creusioni Figueredo dos Santos (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Celidarque da Silva Dias (Examinador Interno)

Prof^a. Dr^a. Ivana Maria Fachine Sette (Examinador Externo – UEPB)

João Pessoa, ____ de _____ de 2011.

Dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, direta ou indireta, foram vítimas do câncer e aos pesquisadores que buscam incessantemente a sua cura.

Agradecimentos

Agradeço ao corpo docente do curso de mestrado, pelos ensinamentos.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Creusioni Figueredo dos Santos, que teve a palavra certa nos momentos de dificuldades.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, por ter doado os compostos avaliados nesse trabalho, além de toda a atenção e colaboração prestadas, sem as quais esse trabalho não seria possível.

A todos que fazem parte do Laboratório de Estudos em Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (DBM/UFPB) pela ajuda no que foi necessário, em especial a Vanessa da Silva Luna, Antônio Cláudio da Silva Lins e Thiago Souza Onofre, pelo auxílio na realização dos experimentos.

As amigas Ana Paula, Daniela, Michelle, Synara, Fernanda, Nara, Nathália e Talissa, por serem a força nos meus momentos de fraqueza.

A Thiago de Vasconcelos Monteiro, pelo incentivo, pelo carinho e, sobretudo, pela paciência.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. Esse é o seu bem mais precioso.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A Topoisomerase II está envolvida em diversos processos celulares vitais, como a replicação e a transcrição do DNA, além da segregação dos cromossomos. Essa enzima catalisa mudanças na topologia do DNA através de rupturas temporárias e posterior rearranjo da dupla hélice, sendo fundamental para que ocorra a proliferação celular. Muitos compostos que interferem na atividade catalítica dessa enzima são eficientes no tratamento quimioterápico de câncer. O desenvolvimento de novos inibidores a partir de fontes vegetais pode ser uma estratégia valiosa, podendo servir também como um instrumento adequado para a produção de agentes ativos semi-sintéticos que não causem danos graves ao organismo e que apresentem um menor custo. Já se tem reportado que alguns lignóides derivados de plantas têm ação inibitória sobre a DNA Topoisomerase II. Plantas da família Lauraceae são fontes de lignóides bioativos. Dentre as diversas espécies, encontra-se a *Licaria aurea* e a *Licaria chrysophylla*. No presente estudo, 12 lignóides derivados destas duas espécies foram avaliados quanto à sua capacidade inibitória sobre a DNA Topoisomerase II humana, utilizando a etoposida como controle de ação das substâncias. Dois dos compostos estudados apresentaram atividade inibitória sobre a enzima Topoisomerase II humana. Esses compostos são a lignana (2S,3S)-Dihidro-dehidrodiconiferil álcool-3-(β -D-glicopiranosil)-hexaacetate e a neolignana 1,4-Bis-(3, 4,5-trimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano.

Palavras-chave: Topoisomerase II, Câncer, Lignóides, *Licaria aurea*, *Licaria chrysophylla*.

ABSTRACT

The Topoisomerase II is involved in several vital cellular processes such as replication and transcription of DNA, in addition to the segregation of chromosomes. This enzyme catalyzes changes in DNA topology by temporary disruptions and subsequent rearrangement of the double helix and is essential for cell proliferation to occur. Many compounds that interfere with the catalytic activity of this enzyme are effective in chemotherapy of cancer. The development of new inhibitors from plant sources can be a valuable strategy, serving also as a tool for the production of semi-synthetic active agents that do not cause serious damage to the body and with a lower cost. Has already been reported that some lignoids derived from plants have inhibitory action on DNA Topoisomerase II. Plants of the *Lauraceae* family are sources of bioactive lignoids. Among different species, there are the *Licaria aurea* and *Licaria chrysophylla*. In this study, 12 lignoids derived from both species were evaluated for their inhibitory effect on human DNA Topoisomerase II, using etoposide as action control of substances. Two of these compounds showed inhibitory activity against the human enzyme Topoisomerase II. These compounds are the lignan (2S,3S)-Dihydro-dehydrodiconiferyl alcohol-3-(β -D-glycopiranosyl)-hexaacetate and the neolignan 1,4-Bis-(3, 4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dimethylbutane.

Keywords: Topoisomerase II, Cancer, Lignoids, *Licaria aurea*, *Licaria chrysophylla*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Super helicoidização do DNA.....	22
Figura 2. Mecanismo de ação da enzima DNA Topoisomerase II.....	30
Figura 3. Primeira reação de transesterificação do DNA pela enzima DNA Topoisomerase II.....	31
Figura 4 : Lignana siringaresinol.....	40
Figura 5: Neolignana surinamensina.....	41
Figura 6. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 5 μ M.....	51
Figura 7. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 50 μ M.....	52
Figura 8. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 70 μ M.....	52
Figura 9. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 90 μ M.....	53

Figura 10. Estrutura química da podofilotoxina.....**57**

Figura 11. Estrutura química da etoposida.....**57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número, nomenclatura e estrutura química dos compostos estudados.....	44
Tabela 2. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 2000 e 2007.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

HOAc – Ácido acético

IV - Infravermelho

pBR322 – Plasmídeo - deriva de *p* (plasmídeo) e *BR*, Bolivar e Rodriguez (os criadores)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TOPO I – Topoisomerase do tipo I

TOPO II – Topoisomerase do tipo II

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

UV - Ultravioleta

LISTA DE SIGLAS

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

OMS – Organização Mundial de Saúde

SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE.....	21
2.1.1 Conceito.....	21
2.1.2 Topoisomerases e a Topologia do DNA.....	22
2.1.3 Os Tipos de Topoisomerases.....	24
2.1.3.1 Topoisomerases do tipo II.....	25
2.1.3.2 Isoformas da topoisomerase II.....	27
2.1.4 Reações Catalíticas das Topoisomerases.....	28
2.2 TOPOISOMERASES DO TIPO II COMO ALVOS NA TERAPIA ANTICÂNCER.....	33
2.2.1 Mecanismos de Inibição das Topoisomerases.....	34
2.2.2 A Química dos Produtos Naturais e o Câncer.....	36
2.3 LIGNÓIDES.....	38
2.3.1 Conceito.....	38
2.3.2 Lignanas.....	39
2.3.3 Neolignanas.....	41
2.3.4 Família <i>Lauraceae</i>	42
2.3.5 Lignóides Estudados.....	42
3 OBJETIVOS	
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49

4.1 BIOENSAIOS COM A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE EM PRESENÇA DE LIGNÓIDES.....	49
5 RESULTADOS.....	51
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	62
REFRÊNCIAS.....	65
ANEXO.....	77

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Topoisomerases constituem uma classe de enzimas nucleares que estão envolvidas nos mecanismos que levam ao enrolar e ao desenrolar da molécula de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), facilitando a progressão de eventos celulares importantes como a replicação, a transcrição e a segregação dos cromossomos durante a mitose (WANG, 1996; WANG, 1987). Os dois tipos existentes de topoisomerases se distinguem pelo mecanismo catalítico com que alteram as propriedades topológicas do material genético (McCLENDON & OSHEROFF, 2007; SILVA *et al.*, 2003; WANG, 2002). As enzimas do tipo I induzem uma quebra em uma das fitas do DNA, enquanto as enzimas do tipo II quebram as duas fitas da molécula (SCHOEFFLER & BERGER, 2005; CHAMPOUX, 2001; NITISS, 1998; WANG, 1996).

Devido à importância das topoisomerases na manutenção e replicação do DNA durante a proliferação celular, as células ficam muito vulneráveis quando essas funções são perdidas (KELLNER *et al.*, 2000; REDINBO *et al.*, 1998).

A Topoisomerase do tipo II (TOPO II) é uma enzima evolutivamente conservada em eucariotos que participa de rotas cruciais em vários processos que se relacionam ao crescimento das células eucarióticas, incluindo replicação e transcrição do DNA e segregação de cromossomos (NITISS, 2009; WANG, 2002; SUZUKI, 1998). Essa enzima está envolvida em diversos processos celulares vitais e em praticamente todos os processos que exigem movimento de DNA dentro do núcleo ou a abertura da dupla hélice (DEWEESE & OSHEROFF, 2008). A TOPO II catalisa mudanças na topologia do DNA através de rupturas temporárias e posterior rearranjo da dupla hélice, sendo fundamental para que ocorra a proliferação celular (NITISS, 2009; JO *et al.*, 2006; HECK, 1986). Por ser necessária ao processo de multiplicação das células, vários compostos que interferem na atividade catalítica dessa enzima são eficientes no tratamento quimioterápico do câncer humano (BENDER, 2008; JO *et al.*, 2006; BALDWIN, 2005; KELLNER, 2000; HASHIMOTO, 1997) .

Por quase cinco décadas, cientistas ao longo do mundo tentam vencer a “Guerra contra o Câncer”. Foram caracterizadas as diferenças bioquímicas entre células cancerígenas e células normais, porém o problema reside no fato dessas diferenças serem muito sutis e muito variáveis na natureza (BENDER & OSHEROFF, 2008). Incontestáveis progressos foram alcançados no que se refere à melhora do tratamento do câncer humano, entretanto, as drogas com ação anticancerígena utilizadas atualmente têm seletividade limitada e são altamente tóxicas (CANDELARIA, 2005). Percebe-se, portanto, a importância de se descobrir novos agentes no intuito de se tentar reduzir esses problemas. A TOPO II aparece como um potencial alvo terapêutico para tal. Muitos compostos que interferem na atividade catalítica dessa enzima já se mostraram eficientes no tratamento quimioterápico do câncer humano (BENDER & OSHEROFF, 2008; BALDWIN & OSHEROFF, 2005; TANBE *et al.*, 1991)

As topoisomerasas têm importante papel na duplicação do material genético que precede a divisão celular (NITISS, 2009; CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996). Quando esta função é desativada, as células ficam vulneráveis. Além disso, em tecidos tumorais, a expressão das topoisomerasas do tipo II é maior (25-300 vezes) do que nas células de metabolismo normal (KELLNER *et al.*, 2000). Desta forma, drogas que são capazes de inibir *in vitro* esta enzima são fortes candidatas a inibir a proliferação celular. Assim, as topoisomerasas são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas que apresentam atividade anticâncer.

Com o aumento do número de substâncias carcinogênicas e mutagênicas no meio ambiente, a pesquisa para explorar novos compostos anticâncer tem se tornado crucial dia após dia. Apesar de muitos agentes químicos anticâncer estarem disponíveis, o largo espectro de efeitos colaterais e o aparecimento de células tumorais resistentes à quimioterapia nos pacientes fizeram com que a pesquisa em câncer e a descoberta de novos agentes antitumorais a partir de produtos naturais, particularmente plantas medicinais, se tornassem essenciais (HAFIDH *et al.*, 2009). Dessa forma, produtos naturais representam um rico e largo campo de estudo para a descoberta de drogas com potencial aplicação no tratamento do câncer (HAFIDH *et al.*, 2009; HARVEY, 2008).

Muitos compostos isolados de plantas foram aprovados como potentes agentes anticâncer, alguns com atividade antitopoisomerase reconhecida (BRANCO, *et al.*, 2008; PRESCOTT *et al.*, 2007; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007; MACIEL *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2006; ISHAR *et al.*, 2006; TING *et al.*, 2003; PEEBLES *et al.*, 2001; GRYNBERG *et al.*, 2002; WADA *et al.*, 1998; PHYTA *et al.*, 1998; CONSTANTINOU *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 1995; KASHIWADA *et al.*, 1993). Entre os compostos mais potentes e mais utilizados na clínica estão os derivados semi-sintéticos da lignana podofilotoxina, a etoposida e a tenoposida (LONG, 1992).

Plantas da família Lauraceae são fontes de lignóides bioativos. Dentre as diversas espécies, encontra-se a *Licaria aurea* e a *Licaria chrysophylla* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998).

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE

2.1.1 Conceito

Topoisomerasas são enzimas responsáveis para o funcionamento de todas as células e sua síntese é ditada pela estrutura da dupla-hélice (NITISS, 2009; DEWEESE & OSHEROFF, 2008; SILVA *et al.*, 2003). Recebem esse nome devido à capacidade de alterar a topologia ou a geometria tridimensional do DNA sem modificar a estrutura química subjacente da molécula (OSHEROFF, 1998). São chamadas por WANG (2002) como “as mágicas do mundo do DNA”, pois podem resolver todos os problemas topológicos da molécula nos mais diversos processos (WANG, 2002). Essas enzimas nucleares regulam o estado topológico do DNA ao gerar quebras transitórias na dupla-fita (McCLENDON & OSHEROFF, 2007; SCHOEFFLER & BERGER, 2005; WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996). A descoberta de que a molécula de DNA é super helicoidizada, juntamente com a descoberta das topoisomerasas (WANG, 1971), deu início a um novo campo na Biologia Molecular: a topologia do DNA (WANG, 2002).

O DNA pode ser torcido num processo denominado super helicoidização (*supercoiling*). A super helicoidização é uma propriedade topológica da molécula de DNA onde a dupla-hélice dá voltas em torno do seu próprio eixo no espaço tridimensional (BOWATER, 2002). No estado relaxado do DNA, uma fita normalmente dá uma volta completa em torno do eixo da dupla hélice a cada 10,4 pares de base, mas se o DNA estiver torcido, as cadeias ficam enroladas (SILVA *et al.*, 2003) Se o DNA estiver torcido na direção da hélice, é denominado uma

super helicoidização positiva e as bases estão unidas mais firmemente; já a super helicoidização negativa refere-se a uma torção na direção oposta, resultando num afrouxamento das bases (**Figura 1**) (SILVA *et al.*, 2003).

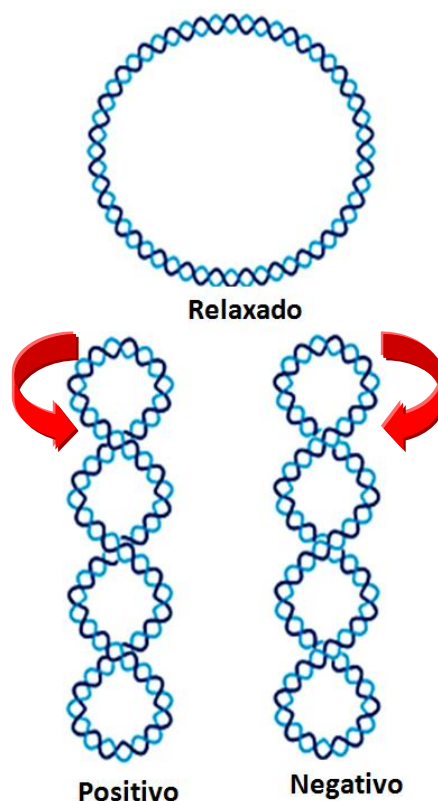


Figura 1. Super helicoidização do DNA. Molécula de DNA no estado relaxado (acima), em super helicoidização positiva (abaixo, à esquerda) e em superhelicoidização negativa (abaixo, à direita). **Fonte:** Adaptado de http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/box/nrmicro1088_BX1

2.1.2 Topoisomerasas e a Topologia do DNA

Em todos os organismos vivos, de bactérias a humanos, o DNA apresenta uma ligeira super helicoidização negativa (*underwound*), que é causada pela ação das enzimas topoisomerasas (SCHVARTZMAN & STASIAK, 2004). Nessa situação, a tensão da torção diminui a helicidade do DNA e facilita a separação das fitas (WITZ & STASIAK, 2010; VOLOGODSKI & COZZARELLI, 1994). Além

disso, é energeticamente mais viável separar fitas quando o DNA está helicoidizado negativamente do que quando está no seu estado relaxado (WITZ & STASIAK, 2010).

Durante a replicação do DNA, o desenrolar das duas fitas pode gerar super helicoidização positiva em frente à forquilha de replicação, já que as enzimas helicases apenas separam as fitas, mas não a desenrolam (McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Topoisomerasas são requeridas para rapidamente relaxarem essa região para permitir o avanço da forquilha. Topoisomerasas também devem funcionar para assegurar que as fitas do DNA estejam completamente desassociadas, assim, os cromossomos replicados podem ser segregados para as células-filhas (NITISS, 1998).

Para que a informação contida no DNA seja reproduzida, as suas fitas devem ser separadas (DEWEESE & OSHEROFF, 2008). A super helicoidização negativa tem uma importante função biológica, facilitando a separação local e global das fitas complementares, contribuindo para o início e o alongamento de dois eventos cruciais para as células, a transcrição e a replicação, respectivamente (WITZ & STASIAK, 2010; McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Na transcrição, o movimento do DNA cria dois gradientes de super helicoidização, um aumento no enrolamento do DNA na frente da enzima RNA polimerase e uma diminuição desse enrolamento atrás desta enzima (McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Assim, durante a transcrição, o DNA é mais super helicoidizado positivamente em frente da RNA polimerase e mais negativamente super helicoidizado atrás desta. Em situações normais, a ação das topoisomerasas em frente e atrás da RNA polimerase impede a acumulação de super helicoidização e permite que a RNA polimerase continue a transcrição (NITISS, 1998).

Em contraste com a ação das topoisomerasas, o movimento de algumas enzimas, como helicases e polimerases, resulta em aguda super helicoidização positiva (*overwound*) do DNA pelo fato de apenas separarem a dupla fita e não a desenrolarem, o que a comprime em uma curta região (WANG, 2002; SCHVARTZMAN & STASIAK, 2004; WANG, 1996). Essa super helicoidização positiva aumenta a dificuldade para separar a dupla-hélice em fitas individuais,

bloqueando os processos essenciais de ácidos nucleicos (FALASCHI *et al.*, 2007; ESPELI & MARIANS, 2004).

Alterações na topologia do DNA requerem a introdução de quebras na fita e as topoisomerases geram um mecanismo seguro para realizar essas mudanças, visto que as quebras são protegidas, não gerando pontas que possam ser objetos de rearranjo ou recombinação, nem gerando respostas de dano do DNA (NITISS, 2009).

2.1.3 Os Tipos de Topoisomerases

As topoisomerases são as proteínas mais conservadas do mundo do DNA (WANG, 2002). Estudos em leveduras indicaram a existência de três topoisomerases: duas tipo I (codificadas pelos genes TOP1 e TOP3) e uma tipo II (codificada pelo gene TOP2) (NITISS, 1998). Nos humanos, são conhecidos dois tipos de topoisomerases, uma do tipo I e a do tipo II, que se distinguem pelo mecanismo catalítico com que alteram as propriedades topológicas do material genético (McCLENDON & OSHEROFF, 2007; SCHOEFFLER & BERGER, 2005; SILVA *et al.*, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996). Ambos os tipos são críticos para o funcionamento normal de qualquer célula e possuem funções recíprocas reversas, isto é, uma é expressa quando a outra é inibida (WHITACRE, 1997). Qualquer alteração no balanço entre essas enzimas é suficiente para induzir a apoptose (SILVA *et al.*, 2003). A redundância funcional das DNA topoisomerases pode permitir a supressão da carência de uma enzima pela presença de outra topoisomerase. A falta de uma dessas enzimas pode levar à geração de um DNA altamente super helicoidizado, através da transcrição ou da replicação (NITISS, 1998).

Topoisomerases do tipo I (TOPO I) estão presentes em todos os processos que envolvem sistema de monitoramento no DNA e têm importantes papéis na manutenção da integridade genômica (LEPPARD & CHAMPOUX, 2005; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; NITISS, 1998; WANG, 1996). As TOPO I agem

gerando uma quebra simples e transitória na cadeia de DNA e são capazes de modelar a super helicoidização negativa e positiva do DNA, mas não conseguem remover nós e emaranhados da dupla-hélice (DEWEESE & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Em complemento às questões relatadas para a super helicoidização positiva e negativa do DNA, processos nucleares como a replicação e a recombinação geram nós e emaranhados no material genético. Se esses nós se acumularem no genoma, o sistema de monitoramento do DNA será incapaz de separar as duas fitas da dupla-hélice (SCHVARTZMAN & STASIAK, 2004; WANG, 2002; WANG, 1996). Além disso, se os emaranhados dos cromossomos não forem resolvidos anteriormente à divisão da célula, estas morrerão por falha na mitose, pois os cromossomos não poderão ser segregados (WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; NITISS, 1998; OSHEROFF, 1998). Conseqüentemente, nós no DNA e emaranhados dessas moléculas podem ser letais para a célula se não forem resolvidos. Esses nós e emaranhados são removidos por topoisomerases do tipo II (DEWEESE & OSHEROFF, 2008).

2.1.3.1 Topoisomerases do tipo II

Topoisomerases do tipo II atuam gerando uma quebra transitória dupla na cadeia de DNA e participam de inúmeros processos nesta molécula, sendo necessárias para a recombinação, a separação dos cromossomos e condensação e descondensação destes (SCHAVARTZMAN & STASIAK, 2004; WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; NITISS, 1998; WANG, 1996).

Compactação da cromatina, segregação dos cromossomos e topologia do DNA estão inter-relacionadas (LOSADA & HIRANO, 2001; KOSHLAND & STRUNNIKOV, 1996). Em eucariontes, estudos genéticos com leveduras, estudos citológicos envolvendo diferentes células tratadas com inibidores de topoisomerase e estudos bioquímicos de condensação de cromossomos em

extratos de células implicaram na atuação da TOPO II na condensação da cromatina e na segregação de cromossomos durante a mitose (NITISS, 1998; WANG, 1996). Fortes evidências, principalmente provenientes de estudos com *E. coli*, *Schizosaccharomyces pombe* e *S. cerevisiae*, apontam que a TOPO II é indispensável para a segregação de cromossomos (NITISS, 1998; WANG, 1996). Estudos mostraram que quando células de leveduras entram na mitose, os cromossomos maiores sofrem perdas ou quebras na ausência da TOPO II (SPELL & HOLM, 1994). Esses achados apóiam a idéia de que as topoisomerases evoluíram para resolver os problemas topológicos da cadeia de DNA à medida que esta vai se tornando cada vez maior; para os cromossomos curtos, os problemas topológicos podem ser aliviados por movimentos de suas extremidades (WANG 1996).

Estudos clássicos também indicaram que TOPO II tem um papel-chave na estrutura do cromossomo e na sua condensação (XU & MANLEY, 2007; BELMONT, 2006). Quando a função da TOPO II é bloqueada após a condensação cromossômica, as células param na metáfase e as cromátides não conseguem se separar (SHAMU & MURRAY, 1992; HOLM *et al.*, 1985). Assim, é como se a ação da TOPO II não apenas facilitasse a condensação dos cromossomos, mas também exercesse um papel importante na segregação destes (PARK, 2008). Porém, há muitas questões atuais relacionadas com qual passo absolutamente requer TOPO II, uma vez que a condensação dos cromossomos possa ocorrer em muitos contextos em que a TOPO II está ausente (NITISS, 2009).

A única topoisomerase que é essencial para a viabilidade celular é a tipo II, codificada pelo gene TOP2 (NITISS, 1998), sendo singularmente requerida para separar completamente cromossomos replicados precedente à divisão da célula. Já mutações na topoisomerase do tipo I resultam em células viáveis (NITISS, 1998).

Também foi sugerido que a TOPO II tem participação no reparo do DNA (YMANE *et al.*, 2002). É importante ressaltar que a estrutura química do DNA é idêntica à original após a ação da TOPO II, apenas as propriedades topológicas da dupla-fita são alteradas (DEWEESE & OSHEROFF, 2008).

Estudos com células eucarióticas levaram à descoberta de novas topoisomerases e a novas perguntas envolvendo a via de ação dessas enzimas nos eventos celulares. Estudos *knockout* (do inglês, silenciado, mutante no qual um gene funcional foi substituído por uma forma não-funcional ou foi silenciado) com genes estão ajudando a delinear as vias das topoisomerases em células de mamíferos, assim como estudos em leveduras estabeleceram paradigmas sobre a função dessas enzimas em eucariontes inferiores (KAUFMANN, 1998). A aplicação de novas tecnologias para identificar interação de proteínas conectou o estudo de topoisomerases a outras áreas da Biologia Humana, incluindo estabilidade genômica e envelhecimento (NITISS, 1998).

Apesar das inúmeras descobertas que envolvem o mecanismo e as vias de ação das topoisomerases, mais estudos são necessários. Por exemplo, foi visto que a deleção do gene TOP2 β de camundongo, que codifica a proteína DNA topoisomerase II- β , leva a defeitos na formação das junções neuromusculares (YANG, 2000). Fica o questionamento de como uma enzima que atua ao nível de DNA, no núcleo celular, possa afetar a formação dessas estruturas.

2.1.3.2 Isoformas da topoisomerase II

Células de mamíferos expressam duas isoformas da enzima do tipo II: topoisomerase II- α e topoisomerase II- β (NITISS, 2009; LINKA, 2007; CHAMPOUX, 2001; NITISS, 1998). Essas isoformas diferem em suas massas moleculares (170 e 180 kDa, respectivamente) e são codificadas por genes diferentes (WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; DRAKE, 1989), exibindo, apesar da similaridade, diferentes padrões de expressão e funções fisiológicas (WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; NITISS, 1998). Essas duas isoformas diferem no seu padrão de expressão, sendo a alfa preferencialmente expressa em células em proliferação, enquanto que a beta é, aparentemente, expressa em níveis iguais tanto em células em divisão quanto em quiescência (NITISS, 1998). As duas isoformas apresentam

um elevado grau de identidade de aminoácidos (aproximadamente 70%), apresentando uma conservação de aminoácidos ao longo da maior parte da região codificadora da proteína, embora a porção carboxiterminal da proteína (a qual não é necessária para a atividade *in vitro* da topoisomerase) seja divergente entre as duas isoformas (CHRISTENSEN, 2002). Um achado sugeriu que a topoisomerase II- β está, preferencialmente, localizada no núcleo (PORTER & FARR, 2004), porém outros achados não determinaram que houvesse um local preferencial. As propriedades enzimáticas das topoisomerasas II- α e II- β são indistinguíveis (NITISS, 2009; YMANE, 2002). A maioria das funções da TOPO II, como sua participação na replicação, transcrição, condensação cromossômica, mitose e recombinação do DNA, foi descrita para a isoforma α (HASHIMOTO, 1997). Esta isoforma também está envolvida na formação ou na manutenção da heterocromatina (PARK, 2008).

A expressão da topoisomerase II- α é regulada pelo o ciclo celular e essa enzima é essencial para a viabilidade de todas as células em divisão, sendo necessária para a separação de cromossomos replicados (NITISS, 2009). Estudos recentes indicaram a sua localização nas regiões centroméricas (CHRISTENSEN, 2002). Novos estudos em células de mamíferos também apóiam a hipótese de que TOPO II tem funções cruciais nos centrômeros (PORTER & FARR, 2004), apesar dos detalhes moleculares necessitarem ser elaborados. Topoisomerase II- β tem papel-chave para a sobrevivência de algumas células neurais e é importante na regulação da transcrição (NITISS, 2009). Acredita-se que a II- β seja um tipo de “back-up” de II- α para a célula, sendo expressa quando esta é inibida e estando mais associada à diferenciação celular do que à proliferação (SILVA *et al.*, 2003). A isoforma II- β está localizada no núcleo e deve atuar na produção de rRNA (HASHIMOTO, 1997).

2.1.4 Reações Catalíticas das Topoisomerasas

Todas as topoisomerases conhecidas compartilham duas características: (1) sua capacidade de unir e fechar a ligação fosfodiéster do DNA em duas sucessivas reações de transesterificação e (2) uma vez clivado pela topoisomerase, um DNA intermediário é formado e a enzima permite que as pontas do segmento do DNA cortado se desfaçam, abrindo uma porta para a passagem de outro segmento de DNA fita simples ou dupla fita, isto é, essas reações criam portões transitórios mediados por enzima para a passagem de outra fita do DNA (WANG, 2002; TANBE *et al.*, 1991). Ambas as topoisomerases, I e II, cortam o DNA por ataque nucleofílico via átomo de oxigênio à ligação fosfodiéster do DNA (SILVA *et al.*, 2003). O atual modelo para as reações de quebra da cadeia pela DNA topoisomerase envolve a ligação de dois segmentos de DNA: um segmento G (*gate* – portão), que é clivado nas duas fitas pela enzima, com a formação de uma ligação éster entre o sítio ativo da tirosina e o fosfato 5' no DNA, e um segmento T (*transport* – transporte), que é capturado por um “grampo operado por ATP” (*ATP operated clamp*) que passa pela ruptura no segmento G (BERGER, 1998; BAKSHI *et al.*, 2001). O evento para a reação da TOPO II é mostrado na **Figura 2**.

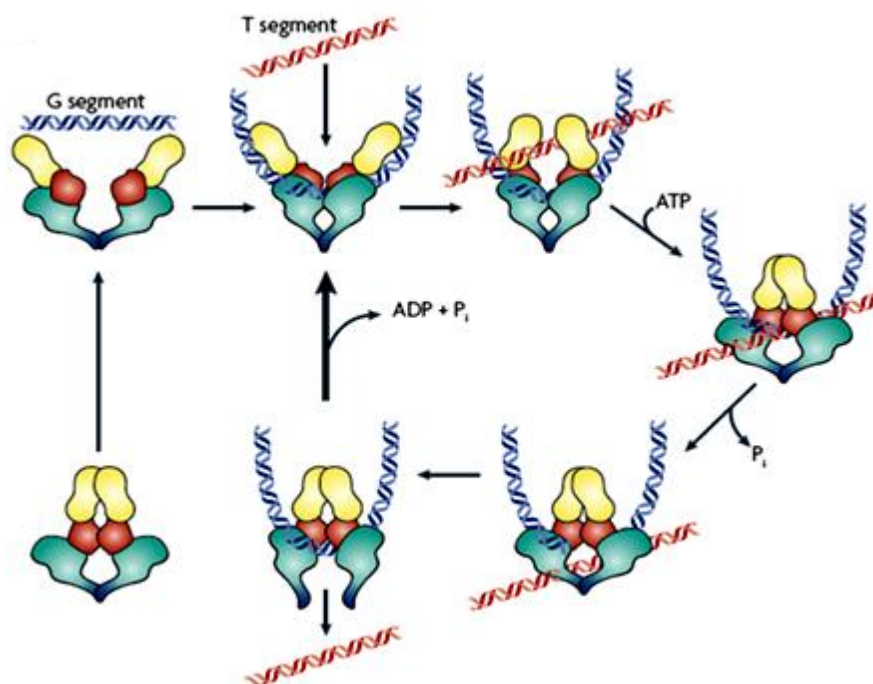


Figura 2. Mecanismo de ação da enzima DNA Topoisomerase II. Topoisomerase II interage com duas fitas de DNA. A enzima introduz uma quebra dupla em uma das fitas, denominada segmento G (*G segment*), e passa a segunda fita, denominada segmento T (*T segment*) através da primeira quebra. A hidrólise de ATP é usada para mudanças conformacionais da enzima. **Fonte:** Adaptado de NITISS, 2009.

Nessa reação, ocorre um ataque nucleofílico via átomo de oxigênio tirosil da enzima ao fósforo da molécula de DNA, formando uma ligação covalente fosfotirosina e quebrando a ligação fosfodiéster do DNA ao mesmo tempo (NITISS, 2009). Essa reação recebe o nome de primeira reação de transesterificação (WANG, 2002) e seu mecanismo detalhado é mostrado na **Figura 3**. A reintegração do DNA ocorre após uma segunda reação de transesterificação, a qual é, basicamente, o reverso da primeira, quebrando a ligação covalente entre a proteína e o DNA e refazendo o DNA (WANG, 2002).

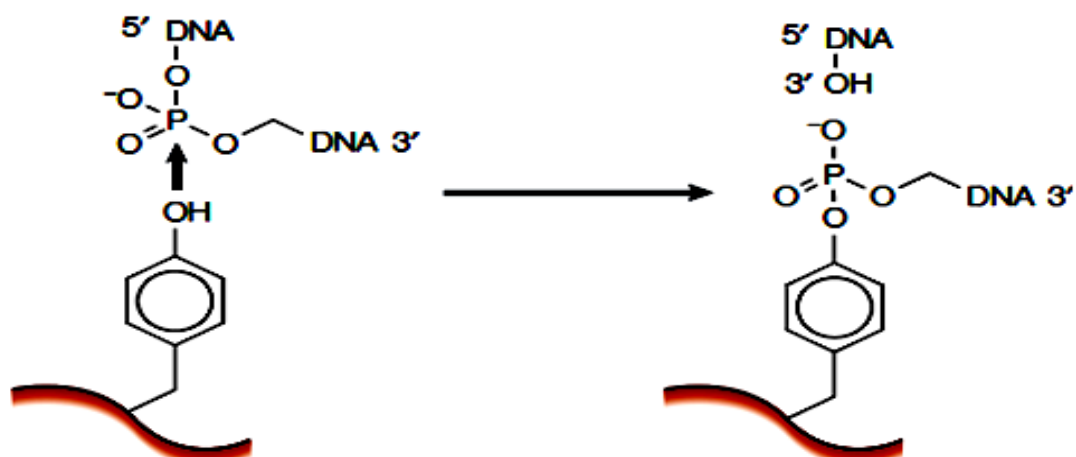


Figura 3. Primeira reação de transesterificação do DNA pela enzima DNA Topoisomerase II. Fonte: WANG, 2002.

A estratégia geral da reação da TOPO II é gerar uma ruptura transitória da dupla fita de DNA. Essa ruptura é mediada pelo um ataque nucleofílico (PARK, 2008). A enzima promove a passagem da fita intacta (que não foi rompida) através da quebra transitória da outra fita e, depois, sela a ruptura (NITISS, 2009).

A clivagem do DNA pela TOPO II utiliza uma tirosina que é ativada para atacar a ligação fosfodiéster e formar uma ligação fosfotirosina no complexo covalente intermediário proteína-DNA (NITISS, 2009; TSE-DINH, 2007). Para a TOPO II, a clivagem requer uma colaboração entre o sítio ativo da tirosina e outros resíduos, incluindo o domínio TOPRIM. O domínio TOPRIM é um domínio conservado encontrado em topoisomerasas envolvido na clivagem do DNA (NITISS, 2009; TSE-DINH, 2007). Esse mecanismo de quebra do DNA gera várias vantagens distintas, incluindo a proteção das pontas do DNA e a habilidade de rápida e eficiente de religar a fita quebrada do DNA. Uma importante propriedade do complexo covalente é que, na maioria das vezes, ele continua a ser livremente reversível (NITISS, 2009). A reação catalisada pela TOPO II, em contraste com a TOPO I, é dependente de ATP (Adenina Trifosfato) (CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996; NITISS, 1998; WANG, 1998). A hidrólise de ATP é usada para mudanças conformacionais da enzima e não está diretamente

envolvida na ruptura e no rearranjo do DNA, estando o sítio de ligação do ATP localizado no domínio aminoterminal da proteína (NITISS, 2009).

Células em processo proliferativo não podem sobreviver sem TOPO II (McCLENDON & OSHEROFF, 2007; WANG, 2002; FORTUNE & OSHEROFF, 2000). No entanto, por gerarem quebras duplas na cadeia do DNA como parte do seu mecanismo normal de ação, elas são proteínas muito perigosas. Deste modo, essa enzima assume um caráter, apelidado por DEWEESE & OSHEROFF (2008), de *Dr Jekyll/Mr Hyde*, pois enquanto é essencial para a viabilidade da célula, também tem a capacidade de fragmentar o genoma cada vez que exercem sua função (DEWEESE & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007;). Assim, enquanto essas enzimas são essenciais para a sobrevivência de células em proliferação, elas também têm efeitos genotóxicos significantes (McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Por causa dessa “dupla personalidade”, os níveis de complexos de clivagem são mantidos em um balanço crítico. Quando os níveis de complexos de clivagem DNA-TOPO II ficam muito baixos (isto é, atividade da enzima está diminuída), as células são incapazes de sofrer segregação de cromossomos e finalmente morrem por falha na mitose (WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; WANG, 2002; CHAMPOUX, 2001; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; NITISS, 1998; OSHEROFF, 1998). Numa situação oposta, quando os níveis de complexos de clivagem tornam-se muito altos, a ação de algumas enzimas pode converter esses complexos em quebras permanentes na fita dupla. Quando essas quebras permanentes no DNA estão presentes em número suficiente, podem ativar vias de morte nas células de eucariontes (BENDER & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007; FELIX *et al.*, 2006; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; KAUFMANN, 1998).

Em sua ação natural, as topoisomerases assentam-se na estrutura do DNA por meio de dobras (supertorção) topológicas, fazendo cortes, o que permite que as funções de reparação, transcrição, replicação e estruturação do cromossomo ocorram adequadamente (SILVA *et al.*, 2003). Feita esta abertura, as células passam a se dividir seguindo uma série de etapas bem definidas. Na primeira etapa, chamada G₁, a célula copia o DNA para os seus cromossomos num estágio conhecido como síntese (S). No final desta fase, a célula faz uma

"avaliação interna" a fim de verificar se deve prosseguir o ciclo celular (SILVA *et al.*, 2003). Essa checagem tem o intuito de conferir se o novo conjunto de cromossomos é realmente idêntico ao antigo. Se avaliação for positiva, passa-se à fase seguinte, onde a célula divide-se e um segundo conjunto idêntico de cromossomos vai para a célula-filha (metáfase, M). Esse estágio irreversível é denominado mitose. Caso a avaliação seja negativa, as células não vão se dividir, passando ao estado G_0 , onde o processo de divisão é colocado em modo inercial à espera do reparo. Se o dano no cromossomo for muito grande, sem possibilidades de reparo, a célula, na tentativa de se preservar, interrompe o ciclo vital cometendo suicídio. Acredita-se que esta seja uma estratégia de proteção dos organismos, que assim evitam passar o dano para uma nova geração de células (SILVA *et al.*, 2003).

As células cancerosas não possuem essa avaliação interna, o que evita que, mesmo na presença de danos genéticos, a célula sofra apoptose e continue no seu processo de divisão (SILVA *et al.*, 2003). Uma estratégia de combate a essas células seria o uso de substâncias que induzissem a formação de pontos artificiais de checagem no processo da divisão celular. Nesse contexto, qualquer agente que afete o complexo DNA-TOPO II nas células malignas poderia induzir esse processo letal (NITISS, 2009; SILVA *et al.*, 2003). Muitas drogas que têm como alvo a TOPO II matam células ao gerar um dano no DNA mediado pela enzima, preferencialmente inibindo a sua atividade catalítica e induzindo a apoptose em várias linhagens celulares (BERTRAND *et al.*, 1993; BARRY *et al.*, 1993; ONISHI, 1993).

2.2 TOPOISOMERASES DO TIPO II COMO ALVOS NA TERAPIA ANTICÂNCER

Com o aumento do número de pacientes portadores de neoplasias no mundo, assim como do número de substâncias carcinogênicas e mutagênicas no meio ambiente, a pesquisa para explorar novos compostos com atividade

anticâncer tem se tornado fundamental dia após dia (HAFIDH, 2009). DNA topoisomerase II é essencial para a divisão e proliferação celular por ser requerida para a realização da mitose, regulando a topologia do DNA (JO *et al.*, 2006). Foi reportado que células tumorais em proliferação expressam essa enzima em níveis 25-300 vezes mais altos do que células normais (KELLNER *et al.*, 2000; HECK & EARNSHAW, 1986). A importância da TOPO II na proliferação de células, assim como na transcrição, e a sua maior expressão em células malignas quando comparadas às normais, sugerem que a essa enzima pode ser uma eficiente estratégia anticâncer. Dessa forma, essas enzimas são alvos especiais na nova quimioterapia antitumoral (CHEN & LIU, 1994).

2.2.1 Mecanismos de Inibição das Topoisomerases

As topoisomerases podem ser inibidas em vários pontos diferentes no seu ciclo de reação, o que implica em diferentes conseqüências bioquímicas e celulares. Compostos que têm atuação inibitória sobre as topoisomerases podem ser separados em duas categorias: 1) inibidores catalíticos da topoisomerase e 2) venenos de topoisomerase (NITISS, 2009; DEWEESE & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007; SILVA *et al.*, 2003). Compostos da primeira categoria matam células através da inibição da atividade catalítica da TOPO II, mas não geram aumento dos níveis de complexos covalentes dessa enzima (NITISS, 2009; BENDER & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007; FORTUNE & OSHEROFF, 2000). Inibidores catalíticos de TOPO II incluem a novobiocina (COLLINS, 1990; COTTON *et al.*, 1986), o merbarone (DRAKE *et al.*, 1989) e a antraciclina aclarubicina (JENSEN *et al.*, 1990). Todos os três compostos têm alvos além da TOPO II (CLIFFORD *et al.*, 2003; NITISS *et al.*, 1997; COLLINS, 1990); além disso, não foram úteis para avaliar a viabilidade de inibidores catalíticos de TOPO II para a terapia anticâncer. Vários outros inibidores catalíticos foram descritos, como as bis-2,6-dioxopiperazinas (ICRF-159, 17a e ICRF-193, 17b) (ROCA & WANG, 1992; TANBE *et al.*, 1991) e o extrato de chá mate (*Ilex paraguariensis*) (GONZALEZ DE MEJIA *et al.*, 2005); de

qualquer forma, os seus mecanismos exatos de ação não foram explorados (NITISS, 2009).

Compostos da segunda categoria não afetam a atividade catalítica da enzima, mas agem sobre o complexo de quebra DNA-topoisomerase II, aumentando seus níveis e convertendo a TOPO II em uma toxina celular que inicia as ações mutagênicas e letais descritas anteriormente (NITISS, 2009; BENDER & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007; SILVA *et al.*, 2003). Esses agentes geram lesões que incluem quebras na fita de DNA e ligação covalente de proteína ao DNA (NITISS, 2009). Devido a essa ação, esses compostos são defendidos como “venenos de topoisomerase II” para distingui-los de inibidores que não afetam a quebra/re-ligação do DNA mediada pela TOPO II. Alguns venenos atuam inibindo a habilidade da TOPO II de ligar o substrato clivado (BALDWIN & OSHEROFF, 2005; WILSTERMANN & OSHEROFF, 2003; FORTUNE & OSHEROFF, 2000; OSHEROFF, 1989). Esses agentes não só aumentam os níveis de complexos de clivagem, como também aumentam a vida-média desses complexos (McCLENDON & OSHEROFF, 2007). A geração de altos níveis de complexos covalentes DNA-topoisomerase II tem profundos efeitos na fisiologia celular. A estabilização do complexo de clivagem por essa classe de inibidores leva, subsequentemente, à morte celular por meio de um espectro de caminhos complexos, que tem início com (1) alterações no ciclo celular, com subsequente parada do mesmo, (2) danos induzidos pela sinalização e (3) o envolvimento da maquinaria enzimática que resulta em apoptose, derivada da ativação da via das caspases (KAUFMANN, 1998; TANBE *et al.*, 1991). Venenos de TOPO II bloqueiam efetivamente os fenômenos de transcrição e replicação, dessa forma, as células entram em apoptose (KAUFMANN, 1998).

Venenos de TOPO II são largamente utilizados na clínica como agentes anticâncer, compreendem a maioria dos agentes clínicos ativos e representam algumas das mais bem sucedidas e largamente prescritas drogas quimioterápicas usadas, atualmente, no tratamento de neoplasias humanas (NITISS, 2009; DEWEESE & OSHEROFF, 2008; McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Na Medicina, destacam-se os compostos da classe das epipodofilotoxinas como potentes inibidores da TOPO II (BRANCO *et al.*, 2008). Drogas como etoposida e

doxorubicina são terapias de preferência para uma variedade de cânceres sistêmicos e tumores sólidos (McCLENDON & OSHEROFF, 2007). Muitos bioflavonóides, como genisteína, também são potentes venenos inibidores da TOPO II (BANDELE & OSHEROFF, 2007; AUSTIN *et al.*, 1992).

Há uma série de diferenças entre inibidores catalíticos e venenos de TOPO II. Uma das diferenças está no padrão de resposta observado, os quais diferem entre as duas classes (NITISS, 2009). Outra diferença está na especificidade, sendo que a maioria dos inibidores catalíticos de TOPO II não é específica (NITISS, 2009). Em experimentos com cultura de células, inibidores catalíticos de TOPO II antagonizam a toxicidade dos venenos de TOPO II (JENSEN & SEHESTED, 1997), indicando que os agentes atuam por mecanismos diferentes. O mecanismo preciso de ação dos venenos de TOPO II ainda é uma questão não resolvida (NITISS, 2009). A sensibilidade em relação a drogas que inibem a TOPO II depende, em parte, dos níveis dessa enzima. A habilidade da TOPO II de gerar dano no DNA na presença de inibidores leva à hipótese de que um importante determinante da sensibilidade à droga é o nível aumentado dessa enzima (NITISS, 2009). Células expressando níveis aumentados são hipersensíveis aos venenos de TOPO II e células expressando níveis baixos são resistentes (NITISS & BECK, 1996; BECK, 1993). Se níveis aumentados de TOPO II levam à hipersensibilidade a inibidores, tumores expressando níveis mais altos de TOPO II podem ser particularmente bons candidatos para a terapia que faz uso de venenos de TOPO II. Muitos inibidores da TOPO II estão em uso clinicamente há vários anos, sendo, também, usados juntamente com outras classes de agentes quimioterápicos de acordo com o tipo do tumor (NITISS, 2009).

2.2.2 A Química dos Produtos Naturais e o Câncer

As plantas constituem a mais rica fonte natural de biomoléculas utilizadas pelo homem (OLIVEIRA, 2008). O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e, por muito tempo, foi a

principal fonte de drogas usadas no tratamento medicinal (HALBERSTEIN, 2005). A Revolução Industrial e o desenvolvimento da Química Orgânica resultaram na preferência por produtos sintéticos para o tratamento farmacológico (RATES, 2001).

O emprego de medicamentos derivados de plantas ressurgiu na sociedade guiado por um forte apelo da busca do natural associado a menores custos com os tratamentos (GLASER, 1999). Nos últimos anos, a relevância dos organismos vegetais como fontes de substâncias anticancerígenas e com outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, estimulando, inclusive, a percepção das lideranças industriais empenhadas na fabricação de produtos sintéticos (BRAZ FILHO, 2010).

A química de produtos naturais possui finalidades práticas, objetivando-se, entre outras finalidades, o estudo ou a descoberta de matérias-primas de importância medicinal. Há uma grande e crescente população mundial que prefere o uso de produtos naturais no tratamento e prevenção de complicações médicas (HAFIDH, 2009). Mais de 40% das drogas modernas são derivadas de fontes naturais, usando a própria substância natural, sua versão semi-sintética ou sua versão sintética (HAFIDH, 2009). Além disso, mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, particularmente como agentes anticâncer (HARVEY, 2008; GAUTAM *et al.*, 2007; JASSIM & NAJI, 2003). Cerca de 25% das prescrições médicas nos Estados Unidos incluem substâncias naturais como princípio ativo, obtidas de plantas de regiões temperadas e tropicais, o que corresponde ao valor estimado de 900 milhões de dólares na circulação comercial (BRAZ FILHO, 2010).

Plantas têm uma longa história de utilização no tratamento do câncer e possuem um importante papel na produção de medicamentos com atividade efetiva anticâncer (CRAGG & NEWMAN, 2005). Mais de 60% das drogas usadas no tratamento do câncer são derivadas, de uma forma ou de outra, de produtos naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG & NEWMAN, 2005; NEWMAN *et al.*, 2003). Os crescentes e significativos avanços na biologia celular e molecular ofereceram oportunidades para a descoberta de alvos moleculares no desenvolvimento de drogas. Quatro décadas após a descoberta da primeira topoisomerase (WANG, 1971), vários estudos envolvendo

essa enzima proporcionaram um melhor entendimento dos seus mecanismos de ação. Uma importante meta dos trabalhos presentes e futuros é maximizar a eficácia terapêutica de agentes que têm a TOPO II como alvo e minimizar sua toxicidade.

A topoisomerase tem se mostrado um alvo atrativo na pesquisa de várias drogas. Isto deve ao seu importante papel especialmente na duplicação do material genético que precede a divisão celular (CHAMPOUX, 2001). Desta forma, drogas que são capazes de inibir *in vitro* esta enzima são fortes candidatas a inibir a proliferação celular. O desenvolvimento de novos inibidores a partir de fontes vegetais pode ser uma estratégia valiosa, podendo servir também como um instrumento adequado para a produção de agentes ativos semi-sintéticos que não causem danos graves ao organismo (YAMADA, 2006).

Na tentativa de descobrir novos inibidores da topoisomerase II, variadas classes de produtos naturais têm sido testadas e relatadas na literatura nos últimos anos. Dentre estas classes, podem ser citados os flavonóides (LINS, 2008; CONSTANTINOU *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 1995) e biflavonóides (GRYNBERG *et al.*, 2002), os diterpenos (MACIEL *et al.*, 2007) e triterpenóides (WADA *et al.*, 1998), os estilbenóides (YAMADA *et al.*, 2006), os alcalóides (PRESCOTT *et al.*, 2007; WOO *et al.*, 2006), as naftodiantronas (PEEBLES *et al.*, 2001), as naftoquinonas (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007; TING *et al.*, 2003; PHYTA *et al.*, 1998), as binaftoquinonas (CUNHA *et al.*, 2006), os derivados do núcleo cromano (BRANCO, *et al.*, 2008; ISHAR *et al.*, 2006;) e os taninos (KASHIWADA *et al.*, 1993). Já se tem reportado que alguns lignóides derivados de plantas têm ação inibitória sobre a DNA topoisomerase II (SALADINO *et al.*, 2005; LONG, 1992).

2.3 LIGNÓIDES

2.3.1 Conceito

Lignóide é um termo genérico que caracteriza micromoléculas que apresentam um esqueleto exclusivamente formado pelo grupo fenilpropânico (C_6-C_3)_n, sendo n restrito a poucas unidades (NASSER, 1985). São biossintetizados nos passos finais da via do ácido chiquímico (SIMÕES *et al.*, 2003). Dos mais de 2000 lignóides relatados na literatura, 90% pertencem ao grupo das lignanas e das neolignanas (SIMÕES *et al.*, 2003). As lignanas e as neolignanas formam um grupo de produtos naturais caracterizados por possuir o esqueleto carbônico com duas unidades C_6-C_3 . O que difere as lignanas das neolignanas é o precursor biogenético próximo. As lignanas são produzidas pelo acoplamento oxidativo de ácidos e/ou de álcoois cinamílicos, enquanto, as neolignanas são formadas pelo acoplamento oxidativo alil- e/ou propenilfenóis (WHITING, 1985).

Ambas as classes têm despertado grande interesse devido às suas inúmeras atividades biológicas no homem.

2.3.2 Lignanas

A designação lignana foi primeiramente utilizada por Haworth, em 1942, e provém do latim *lignum*, que significa madeira, lenho (NASSER, 1985). São dímeros formados a partir do acoplamento oxidativo de álcoois cinamílicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos (SIMÕES *et al.*, 2003). O esqueleto estrutural de uma lignana apresenta o carbono gama (C- γ) oxigenado (SIMÕES *et al.*, 2003; NASSER, 1985). A **Figura 4** mostra um exemplo de estrutura de lignana, aqui representada pela lignana siringaresinol.

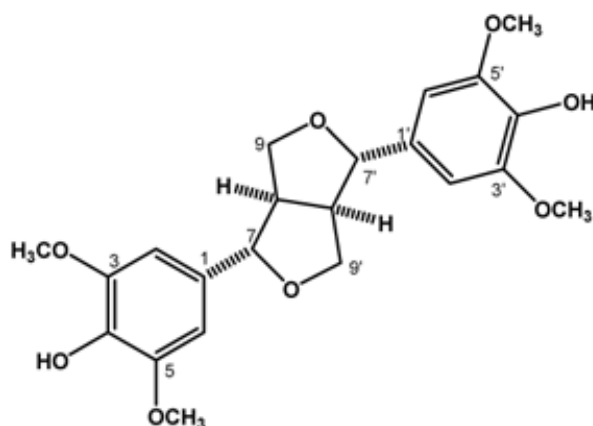


Figura 4: Lignana siringaresinol.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702007000300002

Acredita-se que as propriedades biológicas das lignanas sejam essenciais para o desenvolvimento da planta, visto o grande número destas encontradas no reino vegetal. Estas substâncias também podem ser aproveitadas pelo homem de forma direta ou servindo de modelo para a produção de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2003). As lignanas compreendem uma família de produtos naturais que apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas (NASSER, 1985). Na medicina tradicional chinesa, esses compostos são usados no tratamento de hepatites virais e na proteção do fígado (SALADINO *et al.*, 2005).

Uma das mais famosas lignanas é a podofilotoxina, que pode ser isolada de diferentes plantas do gênero *Podophyllum* (SALADINO *et al.*, 2005; WHITACRE *et al.*, 1997). Desde a sua descoberta, esse potente agente citotóxico recebeu muita atenção no campo da química de produtos naturais. Para evitar seus vários efeitos colaterais, como toxicidade gastrointestinal, e permitir seu uso clínico, alterações no seu esqueleto estrutural foram feitas (SALADINO *et al.*, 2005). Entre os derivados da podofilotoxina estão dois dos mais potentes e mais utilizados agentes anticâncer, a etoposida e a tenoposida (SALADINO *et al.*, 2005; LONG, 1992). Esses derivados semi-sintéticos apresentam um mecanismo de citotoxicidade completamente diferente da podofilotoxina mostrando diferentes efeitos colaterais quando comparados a esta (SALADINO *et al.*, 2005; LONG,

1992). A podofilotoxina inibe a mitose ligando os microtúbulos e causando a parada do processo mitótico na metáfase, já seus derivados etoposida e tenoposida são inibidoras da TOPO II (WHITACRE, 1997; LONG, 1992). Assim como outras drogas derivadas da podofilotoxina, estas atuam estabilizando o complexo DNA-topoisomerase de tal forma que a conexão das duas vertentes do DNA se torna impossível após a quebra das fitas pela enzima (SALADINO *et al.*, 2005).

2.3.3 Neolignanas

O grupo das neolignanas (do grego *néos* = moderno, novo) foi criado por Gottlieb, em 1978, e compreende dímeros da unidade C₆-C₃ provenientes da condensação oxidativa de alilfenóis e de propenilfenóis entre si ou cruzada (NASSER, 1985). As neolignanas distinguem-se das lignanas pela ausência do carbono gama (C-γ) oxigenado, ou seja, do oxigênio no carbono terminal da cadeia em C₃ (SIMÕES *et al.*, 2003; NASSER, 1985). Um exemplo de esqueleto estrutural desse grupo é representado pela neolignana surinamensina (**Figura 5**).

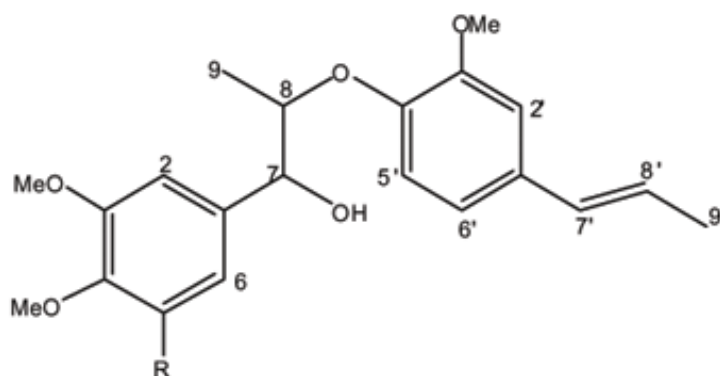


Figura 5: Neolignana surinamensina.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582007000100006

A grande variação estrutural faz das neolignanas um grupo de grande interesse entre os produtos naturais nos pontos de vista químico e bioquímico (NASSER, 1985). São reconhecidas algumas atividades farmacológicas desse grupo e seu uso já tem emprego na clínica. Entre essas atividades, destacam-se o seu uso na terapia do câncer, seus empregos como antisifilítico, estimulante do SNC (Sistema Nervoso Central), fungicida na prática veterinária e arbotivo na medicina popular (NASSER, 1985).

2.3.4. Família Lauraceae

Plantas da família Lauraceae são fontes de lignóides bioativos, sendo esta classe um dos constituintes mais numerosos e mais difundidos dessa família (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998). A distribuição da família *Lauraceae* no mundo é de aproximadamente 1.900 espécies, sendo que destas, 390 são encontradas no Brasil, contribuindo assim com cerca de 20% do total dessas espécies (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998). A família *Lauraceae* possui mais de 31 gêneros e compreende árvores e arbustos largamente distribuídos em zonas tropicais e subtropicais, tendo alguns representantes na zona temperada. (ZANIN & LORDELLO, 2006).

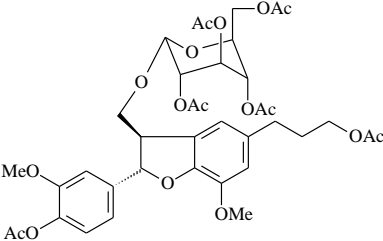
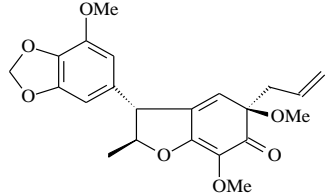
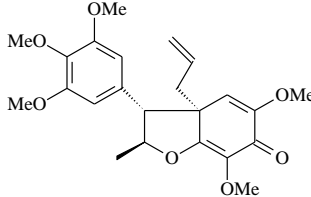
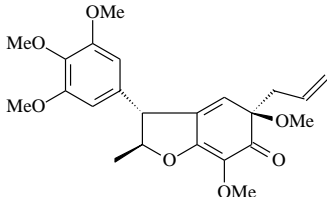
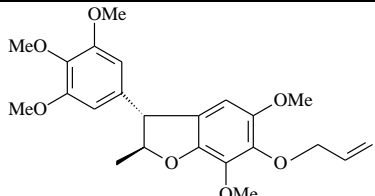
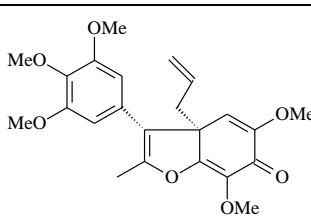
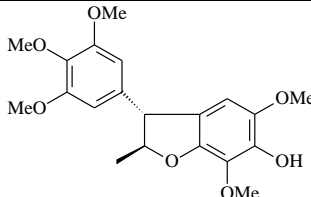
As plantas desta família são conhecidas pela produção de grande diversidade de metabólitos secundários (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998). Entre os seus gêneros, destaca-se o gênero *Licaria*, que foi estabelecido por Aublet, em 1775, com a espécie *Licaria guianensis* estéril, e é oriundo da América Tropical (MAIA, 1973).

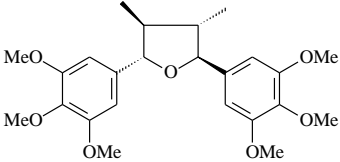
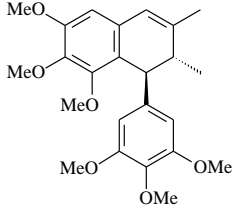
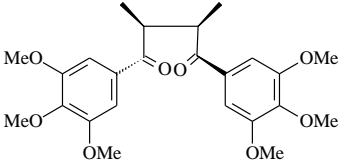
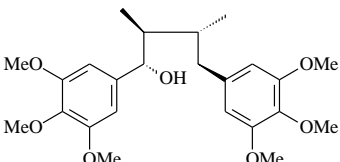
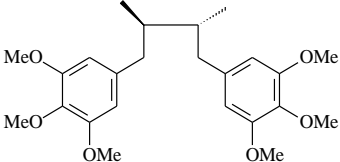
Dentre as diversas espécies, encontra-se a *Licaria aurea* e a *Licaria chrysophylla*.

2.3.5. Lignóides Estudados

No presente trabalho, 12 lignóides foram avaliados (ver **Tabela 1**), sendo uma lignana (composto 1) e 11 neolignanas (compostos 2-12). O composto 1 é uma lignana do tipo benzofurânica glicosilada isolada de *Licaria chrysophylla*. Segundo SILVA *et al.* (1989), durante o processo de isolamento da lignana 1 foi necessário acetilá-la para facilitar sua purificação. As neolignanas enumeradas de 2 a 7 também foram isoladas de *Licaria chrysophylla* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1986; LOPES *et al.*, 1986). A neolignana grandisina (composto 8) foi a única isolada de *Licaria aurea* (BARBOSA FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989). As neolignanas enumeradas de 9 a 12 não são naturais, elas foram obtidas da reação de grandisina (composto 8) com alguns reagentes (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA FILHO *et al.*, 1989). Por exemplo, quando tratou-se a grandisina (composto 8) com ácido perclórico/ácido acético e refluxo por 7 minutos, obteve-se a neolignana ariltetralina 9. A neolignana dicarbonilada 10 é o produto da oxidação de grandisina (composto 8) com permanganato de potássio. A neolignana 11 foi obtida através da redução de grandisina na presença de Na/NH₃. Finalmente, a neolignana diarilbutano (composto 12) é o produto de hidrogenólise da 7-hidroxineolignana 11. Os lignóides naturais (compostos 2 a 8) e seus derivados (compostos 1, 9-12) foram avaliados quanto à capacidade inibitória sobre a enzima DNA Topoisomerase II- α Humana.

Tabela 1. Número, nomenclatura e estrutura química dos compostos estudados.

NÚMERO	NOME	ESTRUTURA QUÍMICA
1	(2S,3S)-Dihidro-dehidrodiconiferil álcool-3-(β-D-glicopiranosil)-hexaacetato	
2	Chrisofilona II-A	
3	Chrisofilona I-B	
4	Chrisofilona II-B	
5	Chrisofilona III-B	
6	Chrisofilona IV-B	
7	Chrisofilona VI-B	

NÚMERO	NOME	ESTRUTURA QUÍMICA
8	Grandisina	
9	<i>trans</i> -1,2-Dihidro-6,7,8-trimetoxi-2,3-dimetil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-naftaleno	
10	<i>meso</i> -2,3-Bis-(3,4,5-trimetoxi-benzoil)-butane	
11	(7 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 8' <i>R</i>)-7-Hidroxi-3,4,5,3',4',5'-hexametoxi-8.8'-neolignana	
12	1,4-Bis-(3, 4,5-trimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano	

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a capacidade inibitória de compostos naturais e derivados sobre a enzima DNA Topoisomerase II- α Humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade inibitória de substâncias isoladas das espécies *Licaria aurea* e *Licaria chrysophylla* e seus derivados.
- Analisar a atividade inibitória de lignana sobre a DNA Topoisomerase II- α Humana.
- Analisar a atividade inibitória de neolignanas sobre a DNA Topoisomerase II- α Humana.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BIOENSAIOS COM A ENZIMA DNA TOPOISOMERASE EM PRESENÇA DE LIGNÓIDES

Os 12 compostos da classe dos lignóides (lignananas e neolignananas) e seus derivados, obtidos de duas plantas da família Lauraceae, *Licaria aurea* e *Licaria chrysophylla*, foram doados pelo Professor Dr José Maria Barbosa Filho.

Neste trabalho foi examinada a interconversão do DNA pBR322 para a forma relaxada através da enzima Topoisomerase II- α Humana, em presença desses compostos, enumerados de 1 a 12, onde o de número 1 é uma lignana e os enumerados de 2 a 12 são neolignananas. Todos foram testados nas concentrações de 5, 50, 70 e 90 μ M. Duas unidades da enzima Topoisomerase II- α Humana foram utilizadas. Como controle para a ação desses compostos, foi utilizado 100 μ M de etoposida.

No ensaio da atividade enzimática, a enzima foi incubada por 20 minutos a 37°C com 0.35 μ g de DNA pBR322 em presença ou em ausência dos compostos, nas quatro concentrações citadas anteriormente, perfazendo um volume final de 50 μ L, que foi completado com tampão Tris 15 mM pH 7.0 (100 mM NaCl, 100 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de ATP). O protocolo utilizado foi baseado no *kit* da Invitrogen®.

A reação foi finalizada pelo acréscimo 10 μ L da solução de parada (50% de glicerol, 10 % de SDS) em presença de azul de bromofenol. Em seguida, as amostras da reação foram aplicadas em gel de agarose 1,0%, equilibrada com tampão TAE pH 8.5 (40 mM Tris, 20 mM Ácido Acético PA e 1 mM EDTA), por 1 hora a 40 V. Após a corrida, o gel foi revelado em solução de Brometo de Etídio (5 mg/mL), lavado com água destilada e fotografado sob luz ultravioleta com câmera digital.

A partir dos resultados obtidos, foram elaborados este trabalho e um artigo que está em fase de publicação.

Resultados

5 RESULTADOS

Os doze compostos avaliados (Linhas 4 a 15) se mostraram inativos quanto à inibição da enzima DNA Topoisomerase II- α Humana nas concentrações 5 μ M, 50 μ M e 70 μ M (**Figuras 6, 7 e 8**, respectivamente). Em presença desses lignóides, nas referidas concentrações e sob ação da TOPO II- α Humana, o DNA assumiu um estado topológico relaxado. A molécula de DNA relaxada tende a ocupar maior espaço e fica mais difícil sua translocação por entre os interstícios do gel de agarose, logo esta molécula fica mais retida do que a forma de DNA super helicoidizado positivamente. O controle positivo se mostrou eficiente (Linha 1), assim como o controle negativo (Linha 2) e o controle de ação das substâncias testadas (Linha 3), apresentando atividades satisfatórias e viabilizando a metodologia dos testes nas duas concentrações dos compostos.

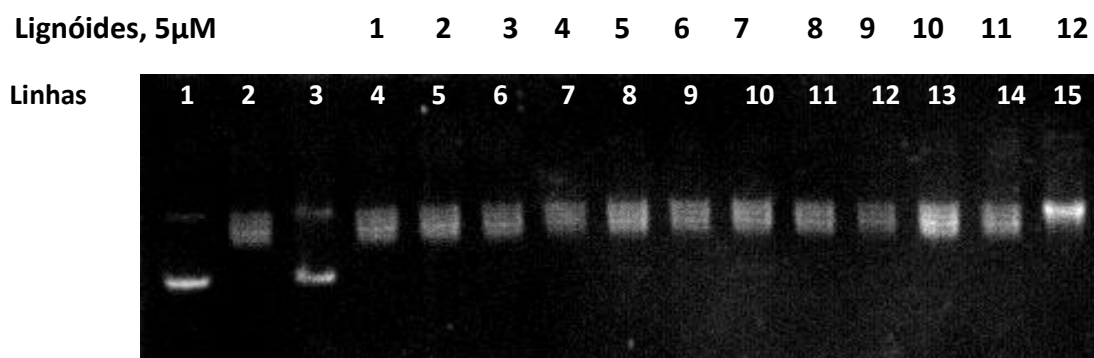


Figura 6. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 5 μ M. Todas as linhas contêm 0.35 μ g de pBR322 e 2.0 unidades da enzima Topoisomerase II- α , com exceção da Linha 1. Linha 1: controle negativo (somente pBR322). Linha 2: controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α). Linha 3: etoposida (100 μ M). Linha 4: lignana (composto 1) e Linhas 5-15: neolignanas (compostos 2 a 12), a 5 μ M.

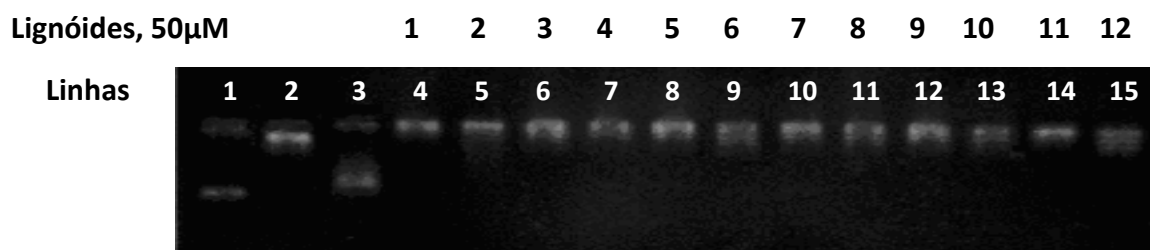


Figura 7. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 50 μ M. Todas as linhas contêm 0.35 μ g de pBR322 e 2.0 unidades da enzima Topoisomerase II- α , com exceção da Linha 1. Linha 1: controle negativo (somente pBR322). Linha 2: controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α). Linha 3: etoposida (100 μ M). Linha 4: lignana (composto 1) e Linhas 5-15: neolignananas (compostos 2 a 12), a 50 μ M.



Figura 8. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 70 μ M. Todas as linhas contêm 0.35 μ g de pBR322 e 2.0 unidades da enzima Topoisomerase II- α , com exceção da Linha 1. Linha 1: controle negativo (somente pBR322). Linha 2: controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α). Linha 3: etoposida (100 μ M). Linha 4: lignana (composto 1) e Linhas 5-15: neolignananas (compostos 2 a 12), a 70 μ M.

Os compostos 1 (lignana) e 12 (neolignana) (Linhas 4 e 15, respectivamente) apresentaram resultados positivos na concentração de 90 μ M (**Figura 9**), sobre a atividade da Topoisomerase II- α Humana, enquanto as demais neolignananas, na mesma concentração, não apresentaram atividade sobre a referida enzima. Pode ser observado que os resultados referentes aos lignóides 1 e 12 são semelhantes ao resultado apresentado pela etoposida, tomada como controle de ação das substâncias (Linha 3). O DNA super helicoidizado positivamente migrou através do gel de agarose mais facilmente do que a forma relaxada. Os controles positivo (Linha 1) e negativo (Linha 2) se mostraram eficientes, apresentando atividades satisfatórias e viabilizando a metodologia do teste.

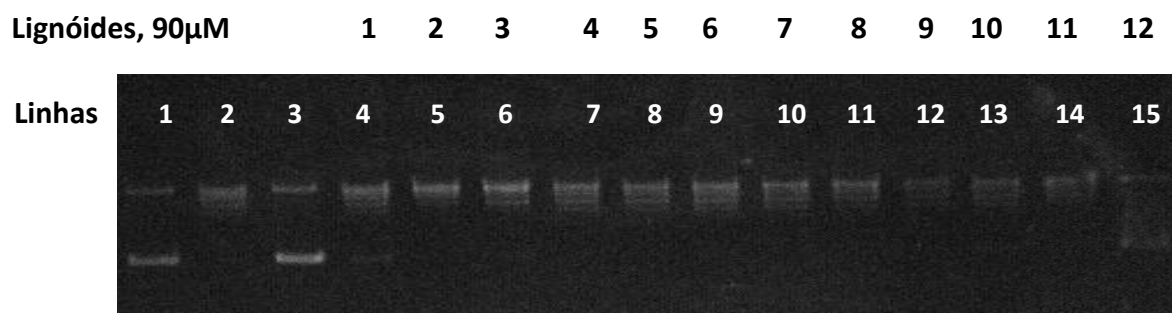


Figura 9. Placa de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando análise da atividade inibitória da TOPO II- α pelos lignóides na concentração de 90 μ M. Todas as linhas contêm 0.35 μ g de pBR322 e 2.0 unidades da enzima Topoisomerase II- α , com exceção da Linha 1. Linha 1: controle negativo (somente pBR322). Linha 2: controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α). Linha 3: etoposida (100 μ M). Linha 4: lignana (composto 1) e Linhas 5-15: neolignanas (compostos 2 a 12), a 90 μ M.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O termo câncer é genericamente utilizado para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, de acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM).

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, estando entre as doenças que mais matam no mundo (BRASIL, 2010). O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O relatório estimou que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorreriam em países de médio e baixo desenvolvimento.

Segundo o INCA, a porcentagem de mortalidade por câncer aumentou, no Brasil, no período de 2000 a 2007. Os dados podem ser visualizados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 2000 e 2007.

Fonte: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM, MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, MS/INCA/Conprev/Divisão de Informação.

ANO	PORCENTAGEM
2000	12,3
2001	12,6
2002	12,8
2003	13,0
2004	13,4
2005	14,2
2006	14,5
2007	14,8

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 serão válidas também para o ano de 2011 e apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer (BRASIL, 2010). Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos na descoberta e no desenvolvimento de novas drogas que tenham ação sobre essa doença.

Grandes esforços têm sido feitos para encontrar tratamentos adequados que possam eliminar as células tumorais, de preferência, sem agredir as células saudáveis. A toxicidade e o alto custo das drogas quimioterápicas convencionais despertaram o interesse para uso de produtos naturais no combate ao câncer.

Os lignóides compõem uma classe de produtos naturais que são derivados do ácido cinâmico/álcool cinâmico/alil e propenil fenóis. Essa família vegetal está relacionada a uma enorme variedade de atividades biológicas e farmacológicas (WARD, 1995). Um exemplo dessa classe são as podofilotoxinas (**Figura 10**), que apresentam atividade antitumor ocasionada pela interferência que ocasionam na divisão celular. Por essa enzima ser crucial para o processo de multiplicação da célula, ela tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de drogas para o tratamento do câncer. Análogos e derivados da podofilotoxina continuam a ser investigados em um esforço para melhorar a atividade antitumoral da droga etoposida (**Figura 11**) (BENDER *et al.*, 2008). Uma grande variedade de

derivados foram preparados. Alguns mostram que a promessa particular em termos de atividade melhorou ou apresenta algumas vantagens. (WARD, 1995).

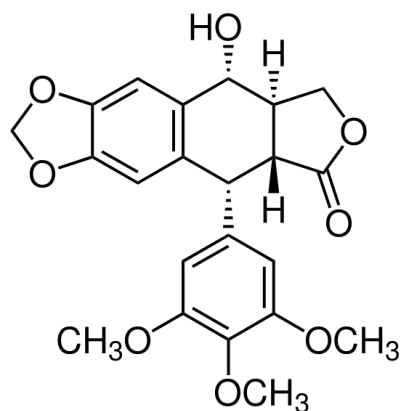


Figura 10. Estrutura química da podofilotoxina.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Podophyllotoxin_acsv.svg

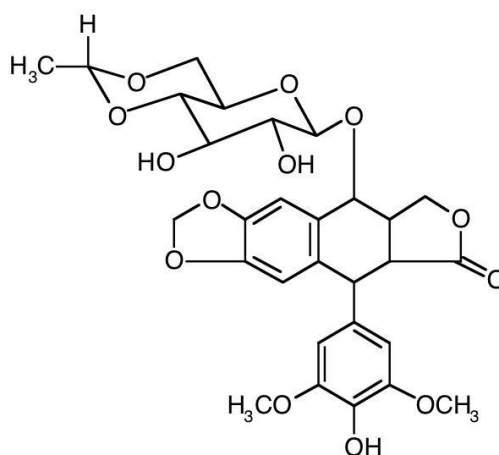


Figura 11. Estrutura química da etoposida.

Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etoposide.jpg>

Sabe-se que podofilotoxina inibe a mitose ligando os microtúbulos e causando a parada do processo mitótico na metáfase, já seus derivados etoposida e tenoposida são inibidoras da TOPO II (WHITACRE *et al.*, 1997; LONG, 1992). Estas atuam estabilizando o complexo DNA-topoisomerase II de tal

forma que a conexão das duas vertentes do DNA se torna impossível após a quebra das fitas pela enzima (SALADINO *et al.*, 2005).

Análogos e derivados da podofilotoxina continuam a ser investigados em um esforço para aperfeiçoar a atividade clínica antitumoral da droga etoposida.

Uma vasta gama de derivados foi elaborada, tendo, alguns, mostrado promessa particular em termos de melhora na atividade ou outras vantagens.

Trabalhos especificamente com lignanas e neolignanas naturais com atividade em Topoisomerase II Humana ainda não foram reportados. Através de observações comparativas e visto a semelhança estrutural com a lignana (composto 1), as neolignanas (compostos 2-12) (ver **Tabela 1**, pág. 40) as neolignanas também apontam como possíveis inibidoras de TOPO II e, portanto, como inibidoras de tumores.

Partindo da necessidade de desenvolvimento de drogas anticâncer com maior eficácia, menor efeito adverso e custo mais baixo, o presente trabalho buscou avaliar a bioatividade de substâncias naturais isoladas de espécies vegetais e seus derivados sobre a enzima DNA Topoisomerase II- α Humana.

No referido estudo, 12 compostos da classe dos lignóides derivados de duas plantas da família Lauraceae, *Licaria aurea* e *Licaria chrysophylla*, e alguns derivados obtidos dos mesmos, foram avaliados quanto à sua capacidade inibitória sobre a enzima DNA Topoisomerase II- α Humana. Os resultados indicam que não há correlação óbvia entre as estruturas destes compostos e a atividade inibitória de DNA pBR322 pela Topoisomerase II- α Humana.

O composto **1**, denominado (2S,3S)-Dihidro-dehidrodiconiferil alcohol-3-(β -D-glycopiranosil)-hexaacetato, foi isolado de forma natural de *Licaria chrysophylla*, mas precisou ser acetilado para conseguí-lo puro (SILVA *et al.*, 1989).

Os compostos **2-7** (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1986; LOPES *et al.*, 1986) foram isolados de *Licaria chrysophylla*.

O composto **8** (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989) foi isolado de *Licaria aurea*. As estruturas químicas foram deduzidas a partir de dados de RMN de ^1H , Infra-vermelho (IV) e Ultra-violeta (UV), que indicam com clareza suas naturezas benzofurânica e furânica, respectivamente.

O composto **9** foi isolado de *Licaria aurea* e foi obtido através do tratamento de grandisina com HClO_4 , HOAc , refluxo por 7 minutos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989).

O composto **10** foi isolado de *Licaria aurea* e foi obtido a partir da oxidação de grandisina com KMnO_4 , KOH , a temperatura ambiente por 30 minutos (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989).

O composto **11** foi isolado de *Licaria aurea* e foi obtido a partir da redução de grandisina com Na e NH_3 (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989).

O composto **12** foi isolado de *Licaria aurea* e foi preparado a partir da hidrogenólise da 7-hidroxineolignana (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1998; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1989).

Foi utilizado como controle de ação das substâncias a etoposida, derivado semi-sintético da lignana podofilotoxina, que apresenta papel importante no tratamento clínico do câncer como potente agente quimioterápico.

Os compostos **1** e **12** apresentaram atividade inibitória sobre a enzima Topoisomerase II- α Humana, já os compostos **2** a **11** não forneceram o mesmo resultado.

O composto **1** é uma lignana do tipo benzofurânica glicosilada e o composto **12** é um produto de reação da neolignana tetrahidrofurânica, grandisina. Este produto de reação é uma neolignana do tipo diarilbutano. Não há semelhanças estruturais entre os dois compostos que possam explicar ou, ao menos, sugerir a razão para a atividade inibitória positiva. Quando as substâncias ensaiadas (compostos **1** e **12**) são comparadas aos padrões podofiloxina (**Figura 10**), uma lignana do tipo ariltetralina, e etoposida (**Figura 11**), também uma lignana do tipo ariltetralina, só que glicosilada, a única relação existente é que todos pertencem à classe dos lignóides, sendo o composto **1** e os padrões, lignanas, e o composto **12**, uma neolignana. Esses resultados são interessantes,

pois esses dois compostos apresentaram atividade em concentração (90 μM) menor que a do seu controle (etoposida, 100 μM), indicando, portanto, maior poder de atividade na inibição da Topoisomerase II- α Humana. Além disso, não há relato na literatura, até o presente momento, de neolignanas (naturais ou derivadas) com atividade antitopoisomerase. Esse trabalho apresenta a primeir

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com o crescente número de pacientes portadores de câncer no mundo e diante dos altos custos dos tratamentos antitumorais, além dos diversos efeitos colaterais ocasionados pelos medicamentos atualmente utilizados na clínica, fica evidente a necessidade de se desenvolver medicamentos mais específicos contra as células cancerígenas e que tenham um menor custo para o paciente. O uso de produtos naturais é uma alternativa valiosa para tal.

Diante do fato de dois dos principais fármacos usados na clínica antitumoral atualmente e que têm a DNA Topoisomerase II- α Humana como alvo terapêutico - a etoposida e a tenoposida, serem derivados de fontes vegetais e pertencentes à classe dos lignóides, optou-se pelo estudo dessa classe.

Dos 12 lignóides testados nas concentrações 5, 50, 70 e 90 μ M, dois mostraram efeito inibitório sobre a atividade da enzima DNA Topoisomerase II- α Humana. O efeito positivo se deu na última concentração testada. Estas substâncias são (2S,3S)-Dihidro-dehidrodiconiferil álcool-3-(β -D-glicopiranosil)-hexaacetate e 1,4-Bis-(3, 4,5-trimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano. Os resultados indicam que não há correlação óbvia entre as estruturas destes compostos e a atividade inibitória de DNA pBR322 pela Topoisomerase II- α Humana. O composto (2S,3S)-Dihidro-dehidrodiconiferil álcool-3-(β -D-glicopiranosil)-hexaacetato é uma lignana que não tem semelhança com a podofilotoxina, como os demais compostos relatados na literatura, e o composto 1,4-Bis-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano é a única neolignana relatada na literatura, até o momento, com atividade antitopoisomerase. Os resultados indicam que estes dois compostos apresentam maior poder de atividade na inibição da Topoisomerase II- α Humana do que o padrão etoposida utilizado nas experiências.

Pretende-se, em trabalhos futuros, avaliar o efeito destes dois compostos que apresentaram resultado positivo frente à inibição da DNA Topoisomerase II- α Humana em culturas de células neoplásicas. Demais estudos com a referida enzima serão realizados, futuramente, ao nível de Doutorado.

Esse e outros estudos incentivam a continuidade da busca por novos compostos naturais, semi-sintéticos ou sintéticos capazes de inibir a Topoisomerase II e que tenham toxicidade tolerável a ponto de serem utilizadas na terapêutica.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 - AUSTIN, C. A. *et al.* **Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by a novel flavone and catechin derivatives.** *Biochem. J.*, 282, 883-889, 1992.
- 2 - BAKSHI, R. P.; GELENDE, S.; MUNIYAPPA K. **Functional and regulatory characteristics of eukaryotic type II DNA topoisomerases.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 36, 1-37, 2001.
- 3 - BALDWIN, E. L.; OSHEROFF, N. **Etoposide, topoisomerase II and cancer.** *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 5, 363-372, 2005.
- 4 - BANDELE, O. J.; OSHEROFF, N. **Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II α and II β .** *Biochemistry*, 46, 6097-6108, 2007.
- 5 - BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S. **Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of some lignoids from Lauraceae.** *Magn. Reson. Chem.* 36, 929-935, 1998.
- 6 - BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* **Neolignans from *Licaria aurea*.** *Phytochemistry*, 28, 8, 2209-2211, 1989.
- 7 - BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* **Benzodioxane and beta-aryloxy-arylpropane type neolignans from *Licaria chrysophylla*.** *Phytochemistry*, 28, 12, 3477-3482, 1989.
- 8 - BARBOSA-FILHO, J. M.; SHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. **Biogenesis of chrysophyllon type neolignans.** *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 59, 4, 335-339, 1987.
- 9 - BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* **Unusual benzofuranoid neolignans from *Licaria chrysophylla*.** *Phytochemistry*, 25, 11, 2609-2612, 1986.
- 10 - BARRY, M. A.; BEHNKE, C. A.; EASTMAN, A. **Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia.** *Biochem. Pharmacol.*, 40, 2353-2362, 1993.

11 - BECK, W. T. *et al.* **Drug resistance associated with altered DNA topoisomerase II.** *Adv. Enzyme Regul.*, 33, 113-127, 1993.

12 - BELMONT, A. S. **Mitotic chromosome structure and condensation.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18, 632-638, 2006.

13 - BENDER, R. P.; OSHEROFF, N. **DNA topoisomerases as targets for the chemotherapeutic treatment of cancer.** *Checkpoint Responses in Cancer Therapy*, 14, 57-91, 2008.

14 - BENDER, R. P. *et al.* **Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase II α in the binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity.** *Biochemistry*, 47, 4501-4509. 2008.

15 - BERGER, J. M. **Structure of DNA topoisomerases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 140, 3-18, 1998.

16 - BERTRAND, R. *et al.* **Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors.** *Experim. Cell Res.*, 207, 388-397, 1993.

17 - BOWATER, R. P. **Supercoiled DNA: structure.** *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group, 2002. www.els.net.

18 - BRANCO, A. *et al.* **Rubrofusarina, um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- α humana.** *Braz. J. Pharmacogn.*, 18, 703-708, 2008.

19 - BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação Nacional de Prevenção e Vigilância do Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil.** São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>>. Acesso em: 01 dez. 2010.

20 - BRAZ FILHO, R. **Phytochemical contribution to development of a emergent country.** *Quim. Nova*, 33, 1, 229-239, 2010.

21 - CANDELARIA, M. **Genetic determinants of cancer drug efficacy and toxicity: practical considerations and perspectives.** *Anticancer Drugs*, 16, 9, 923-933, 2005.

22 - CHAMPOUX, J. **DNA Topoisomerases: structure, function and mechanism.** *Ann. Rev. Biochem.*, 70, 369-413, 2001.

23 - CHEN, A. Y.; LIU, L. F. **DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets.** *Ann. Rev. Pharmacol.*, 34, 191, 1994.

24 - CHRISTENSEN, M. O. *et al.* **Dynamics of human DNA topoisomerases II α and II β in living cells.** *J. Cell. Biol.*, 157, 31-44, 2002.

25 - CLIFFORD, B. *et al.* **G2 Arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53.** *Cancer Res.*, 63, 4074-4081, 2003.

26 - COLLINS, A. **Topoisomerase II can relax: novobiocin is a mitochondrial poison after all.** *Bioessays.*, 12, 493-494, 1990.

27 - CONSTANTINO, A. *et al.* **Flavonoids as DNA Topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships.** *J. Nat. Prod.*, 58, 217-225, 1995.

28 - COTTON, M. *et al.* **Novobiocin precipitates histones at concentrations normally used to inhibit eukaryotic type II topoisomerase.** *Nucleic Acid Res.*, 14, 3671-3686, 1986.

29 - CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. **Plants as a source of anti-cancer agents.** *J. Ethnopharmacol.*, 100, 72-79, 2005.

30 - CUNHA, A. S. *et al.* **Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on DNA Topoisomerase I and II- α .** *J. Braz. Chem. Soc.*, 17, 439-442, 2006.

31 - DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. **The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing.** *Nucleic Acids. Res.*, 37, 3, 738-748, 2008.

32 - DRAKE, F. H. *et al.* **Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II.** *Biochemistry*, 28, 8154, 1989.

- 33 - _____. **In vitro** and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. *Cancer Res.*, 49, 2578-2583, 1989.
- 34 - ESPELI, O.; MARIANS, K. J. **Untangling intracellular DNA topology.** *Mol. Microbiol.*, 52, 925-931, 2004.
- 35 - ESTEVES-SOUZA, A. *et al.* **Cytotoxic and DNA topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40, 1399-1402, 2007.
- 36 - FALASCHI, A. *et al.* **Molecular and structural transactions at human DNA replication origins.** *Cell Cycle*, 6, 1705-1712, 2007.
- 37 - FELIX, C. A.; KOLARIS, C. P.; OSHEROFF, N. **Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations.** *DNA Repair*, 5, 1093-1108, 2006.
- 38 - FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. **Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice.** *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 64, 221-253, 2000.
- 39 - GAUTAM, R. A.; SAKLANI, A; JACHAK, S. M. **Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents.** *J. Ethnopharmacol.*, 110, 200-234, 2007.
- 40 - GLASER, V. **Billion-dollar market blossoms as botanicals take root.** *Nat. Biotechnol.*, 17, 17-18, 1999.
- 41 - GONZALEZ DE MEJIA, E. *et al.* **Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation.** *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1966-1973, 2005.
- 42 - GRYNBERG, N. F. *et al.* **DNA Topoisomerase Inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35, 819-822, 2002.
- 43 - HAFIDH, R. R., *et al.* **A Review: cancer research of natural products in Asia.** *Int. J. Cancer Res.*, 5, 69-82, 2009.
- 44 - HALBERSTEIN, R. A. **Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns.** *Ann. Epidemiol.*, 15, 686-699, 2005.

45 - HARVEY, A. L. **Natural products in drug discovery.** *Drug Discov. Today*, 13, 894-901, 2008.

46 - HASHIMOTO, S., *et al.* **Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs.** *Leukemia Res.*, 21, 9, 875-883, 1997.

47 - HECK, M. M.; EARNSHAW, W. C. **Topoisomerase II: a specific marker for cell proliferation.** *J. Cell Biol.*, 103, 2569-2581, 1986.

48 - HOLM, C. *et al.* **DNA Topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast.** *Cell*, 41, 553-563, 1985.

49 - ISHAR, M. P. S. *et al.* **Design, synthesis and avaluation of Novel 6-chloro-/fluorochromone derivates as potential topoisomerase inhibitor anticancer agents.** *Bioorg. Med. Chem.* 16, 1366-1370, 2006.

50 - JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. **Review/Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective.** *J. Applied Microbiol*, 95, 412-427, 2003.

51 - JENSEN, P. B.; SEHESTED, M. **DNA Topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors – a new strategy to improve the antitumor selectivity of etoposide.** *Biochem. Pharmacol.*, 54, 755-759, 1997.

52 - JENSEN, P. B. *et al.* **Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage.** *Cancer Res.*, 50, 3311-3316, 1990.

53 - JO, J. Y.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; LILA, M. A. **Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II by interactions of grape cell culture polyphenols.** *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2083-2087, 2006.

54 - KASHIWADA, Y. *et al.* **Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*.** *J. Pharm. Sci.*, 82, 487-492, 1993.

55 - KAUFMANN, S. H. **Cell death induced by topoisomerase-target drugs: more questions than answers.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 195-211, 1998.

56 - KELLNER, U.; RUDOLPH, P.; PARWARESCH, R. **Human DNA Topoisomerase – diagnostic and therapeutic implications for cancer.** *Onkologie*, 23, 424-430, 2000.

57- KOSHLAND, D.; STRUNNIKOV, A. **Mitotic chromosome condensation.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12, 305-333, 1996.

58 - LEPPARD, J. B.; CHAMPOUX, J. J. **Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles and damage control.** *Chromosoma*, 114, 75-85, 2005.

59 - LINKA, R. M. *et al.* **C-terminal regions of topoisomerase II and topoisomerase II determine isoform-specific functioning of the enzymes *in vivo*.** *Nucleic Acids Res.*, 35, 3810-3822, 2007.

60 – LINS, A. C. S. **Estudo químico e atividade antioxidante de *Bauhinia petandra* (Bong.) Vog. Ex Steud e avaliação da atividade inibitória da enzima DNA topoisomerase II- α humana de substâncias naturais e semi-sintéticas.** 2008. 132f. Dissertação – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

61 - LONG, B. H. **Mechanisms of action of teniposide (VM-26) and comparison with etoposide (VP-16).** *Semin. Oncol.*, 19, 3–19, 1992.

62 - LOPES, M. N. *et al.* **Unusual benzofuranoid neolignans from *Licaria chrysophylla*.** *Phytochemistry* 25: 2609-2612, 1986.

63 - LOSADA, A.; HIRANO, T. **Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation.** *Bioessays*, 23, 924-935, 2001.

64 - MACIEL, M. A. M. *et al.* **Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human K562 leukemia cells.** *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 391-396, 2007.

65 - MAIA, J. G. S. **Estudo químico de plantas amazônicas *Eugenia biflora*, *Myrcia citrifolia*, *Licaria puchury-major*, *Licaria macrophylla* e *Licaria aurea*.** 1973.146 f. Tese (*Magister Scientiae*) – Escola de Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1973.

66 - McCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. **DNA Topoisomerase II, genotoxicity and cancer.** *Mutat. Res.*, 623, 83-97, 2007.

67 - NASSER, M. **Novas lignanas de *Licaria chrysophylla*.** 1985. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

68 - NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural products as sources of new drugs over the period of 1981-2002.** *J. Nat. Prod.*, 66, 1022-1037, 2003.

69 - NITISS, J. L. **Targeting DNA Topoisomerase II in cancer chemotherapy.** *Nat. Rev.*, 9, 338-350, 2009.

70 - _____. **DNA Topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions.** *Nat. Rev.*, 9, 327-337, 2009.

71 - _____. **Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1400, 63-81, 1998.

72 - NITISS, J. L.; POURQUIER, P.; POMMIER, Y. **Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes.** *Cancer Res.*, 57, 4564-4569, 1997.

73 - NITISS, J. L.; BECK, W. T. **Antitopoisomerase drug action and resistance.** *Eur. J. Cancer*, 32A, 958-966, 1996.

74 - OLIVEIRA, W. A. **Efeito das fases do extrato de *Aloe vera* (L.) na resposta imunológica in vitro junto à proteína H-RAS.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

75 - ONISHI, Y. *et al.* **Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1175, 147-154, 1993.

76 - OSHEROFF, N. **DNA Topoisomerases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1400, 1-2, 1998.

77 - _____. **Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide.** *Biochemistry*, 28, 6157-6160, 1989.

78 - PARK, S. W. *et al.* **Regulation of the catalytic function of topoisomerase II alpha through association with RNA.** *Nucleic Acids Res.*, 36, 19, 6080-6090, 2008.

79 - PEEBLES, K. A. *et al.* **Catalytic inhibition of human topoisomerase II- α by hypericin, a naphthodianthrone from St John's Worth (*Hypericum perforatum*).** *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1059-1070, 2001.

80 - PHYTA, Z. F. *et al.* **Inhibition of Topoisomerase I by naphthoquinone derivatives.** *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 3385-3390, 1998.

81 - PORTER, A. C.; FARR, C. J. **Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere.** *Chromosome Res.*, 12, 569-583, 2004.

82 - PRESCOTT, T. A. K. *et al.* **Lunacridine from *Lunasia amara* is a DNA intercalating topoisomerase II inhibition.** *J. Ethnopharmacol.*, 109, 289-294, 2007.

83 - RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** *Toxicon*, 39, 603-613, 2001.

84 - REDINBO, M. R. *et al.* **Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA.** *Science*, 279, 1504-1513, 1998.

85 - ROCA, J.; WANG, J. C. **Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp.** *Cell*, 71, 833-840, 1992.

86 - SALADINO, R. *et al.* **Methyltrioxorhenium catalysed synthesis of highly oxidized aryltetralin lignanas with anti-topoisomerase II and apoptogenic activities.** *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 5949-5960, 2005.

87 - SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M. **Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism.** *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 1465-1470, 2005.

88 - SCHVARTZMAN, J. B.; STASIAK, A. **A topological view of the replication.** *EMBO Rep.*, 5, 256-261, 2004.

89 - SHAMU, C. E.; MURRAY, A. W. **Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA Topoisomerase II activity during anaphase.** *J. Cell Bio.*, 117, 921-934, 1992.

90 - SHI, Q. *et al.* **Cytotoxic and antimetabolic flavonols from *Polanisia dodecandra*.** *J. Nat. Prod.*, 58, 475-482, 1995.

91 - SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M., C., B., V. **An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on b-lapachone and derivatives.** *Quim. Nova*, 26, 3, 407-416, 2003.

92 - SILVA, M. F. G. F. *et al.* **Benzodioxane and beta-aryloxy-aryllpropane neolignans from *Licaria chrysophylla*.** *Phytochemistry* 28: 3477-3482, 1989.

93 - SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. ver. ampl., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 557-575, 2003.

94 - SPELL, R. M.; HOLM, C. **Nature and distribution of chromosomal intertwinings in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.*, 14, 1465-1476, 1994.

95 - SUZUKI, K. *et al.* **Topostatin, a novel inhibitor of topoisomerases I and II produced by *Thermomonospora alba* strain No 1520.** *J. Antibiot.*, 51, 11, 991-998, 1998.

96 - TANBE, K. *et al.* **Inhibition of Topoisomerase II by antitumor agents Bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives.** *Cancer Res.*, 51, 4903-4908, 1991.

97 - TING, C. *et al.* **Isodiospyrin as a novel human DNA Topoisomerase I inhibition.** *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1981-1991, 2003.

98 - TSE-DINH, Y. C. **Exploring DNA Topoisomerases as targets of novel therapeutic agents in the treatment of infectious diseases.** *Infect. Dis. – Drug Targets*, 7, 3-9, 2007.

99 - WADA, S. *et al.* **In vitro** inhibitory effects of DNA topoisomerase II by fernane-type triterpenoids isolated from a *Euphorbia* genus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 2829-2832, 1998.

100 - WANG, J. C. **Cellular Roles of DNA Topoisomerases: a molecular perspective.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 430-440, 2002.

101- _____. **Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine.** *Q. Rev. Biophys.*, 31, 107-144, 1998.

102 - _____. **DNA Topoisomerases.** *Ann. Rev. Biochem.*, 65, 635-692, 1996.

103 - _____. **Recent studies of DNA topoisomerases.** *Biochim. Biophys. Acta*, 909,1-9, 1987.

104 - _____. **Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein.** *J. Mol. Biol.*, 55, 523-533, 1971.

105 - WARD, R. S. **Lignans, neolignans and related compounds.** *Nat. Prod. Rep.*,12, 43-74, 1995.

106 - WHITACRE, C. M. *et al.* **Topotecan increases topoisomerase II α levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process.** *Cancer Res.*, 57, 1425-1428, 1997.

107 - WHITING, D. A. **Lignans and neolignans.** *Nat. Prod. Rep.*, 2, 191-211, 1985.

108 - WILSTERMAANN, A. M.; OSHEROFF, N. **Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes.** *Curr. Top. Med. Chem.*, 3, 1349-1364, 2003.

109 - WITZ, G.; STASIAK, A. **DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting.** *Nuc. Ac. Res.*, 38, 2119-2133, 2010.

110 - WOO, S. H. *et al.* **Inhibition of topoisomerase II by liriodenine.** *Biochem. Pharmacol.*, 54, 467-473, 2006.

111 - YAMADA, M. *et al.* **Stilbenoids of *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) exhibiting DNA Topoisomerase II inhibition.** *Phytochemistry*, 67, 307-313, 2006.

112 - YMANE, K.; WU, X.; CHEN, J. **A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for Cell Survival.** *Mol. Cell Biol.*, 22, 555-566, 2002.

113 - YAMASHITA, Y.; KAWADA, S.; NAKANO, H. **Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by non-intercalative flavonoids, genistein and orobol.** *Biochem. Pharmacol.*, 39, 737-744, 1990.

114 - YANG, X. *et al.* **DNA topoisomerase II β and neural development.** *Science*, 287, 131-134, 2000.

115 - VOLOGODSKII, A. V.; COZZARELLI, N. R. **Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA.** *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 609-643, 1994.

116 - XU, Y. X.; MANLEY, J. L. **The prolyl isomerase Pin 1 functions in mitotic chromosome condensation.** *Mol. Cell*, 26, 287-300, 2007.

117 - ZANIN, S.; LORDELLO, A. L. L. **Alcalóides aporfinóides em espécies do gênero *Ocotea* (Lauraceae).** *Quím. Nova*, 30, 92-97, 2007.

ANEXO

Artigo em fase de submissão

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Neolignans and cyclolignans from *Licaria chrysophylla* and *Licaria aurea* with DNA topoisomerase II- α inhibitory activity

Amanda de Melo Bezerra¹ (PG), Antônio Cláudio da Silva Lins¹ (PG), Vanessa da Silva Luna¹(PQ), Celso Amorim Camara² (PQ), Tania Maria Sarmiento Silva² (PQ), José Maria Barbosa-Filho³ (PQ), Creusioni Figueredo dos Santos^{1*} (PQ).
cfsantos@dbm.ufpb.br

^{1*}Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-970, João Pessoa, Paraíba. Fone/Fax: (83) 32167787

²Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco.

³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, CEP 58051-970, João Pessoa, Paraíba.

Keywords: *neolignans, cyclolignans, DNA topoisomerase II- α , Licaria chrysophylla, Licaria aurea*

Running title: Neolignans and cyclolignans as topoisomerase inhibitors...