



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MARINOBUFAGINA: AÇÃO ANTINEOPLÁSICA *in vitro* E *in vivo*
E PERFIL TOXICOGENÉTICO**

Lívia Queiroz de Sousa

Teresina – Piauí
2017

Lívia Queiroz de Sousa

**MARINOBUFAGINA: AÇÃO ANTINEOPLÁSICA *in vitro* E *in vivo*
E PERFIL TOXICOGENÉTICO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Teresina – Piauí

2017

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

S725m Sousa, Livia Queiroz de.
Marinobufagina : ação antineoplásica *in vitro* e *in vivo* e perfil toxicogenético / Livia Queiroz de Sousa. -- 2017.
182 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.
“Orientação : Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.”
Bibliografia

1. Bufadienólídeos. 2. Marinobufagina. 3. Atividade antitumoral. 4. Toxicidade pré-clínica. I. Título. II. Universidade Federal do Piauí – Teresina.

CDD 615.36

Lívia Queiroz de Sousa

MARINOBUFAGINA: AÇÃO ANTINEOPLÁSICA *in vitro* E *in vivo* E PERFIL TOXICOGENÉTICO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ / ____ / ____

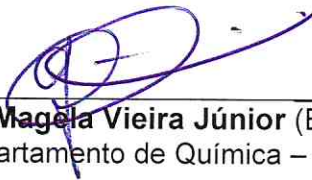
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Orientador)
Departamento de Biofísica e Fisiologia – UFPI



Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Examinadora externa)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC



Prof. Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior (Examinador externo)
Departamento de Química – UFPI



Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Co-orientador)
Departamento de Ciências Biológicas – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria das Graças e Francisco Lopes,
meus exemplos de amor, respeito,
cuidado e dedicação ao que se ama.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pai de infinita misericórdia, pelo dom da vida e todas as graças alcançadas ao longo da minha caminhada e à **Nossa Senhora**, pelo amparo e constante intercessão junto a Deus.

À minha família, em especial aos meus amados pais, **Maria das Graças** e **Francisco Lopes**, pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos transmitidos, sobretudo, baseados no caráter e respeito e aos meus irmãos, **Jamile** e **Igor Queiroz**, pelo companheirismo, amizade e todos os momentos compartilhados. Meu eterno carinho e gratidão!

Ao meu noivo, **Rodrigo Ulisses**, por se manter sempre presente, compreensivo e paciente, além de tudo, pelo seu persistente apoio, cuidado e preocupação.

Ao meu orientador, professor **Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, exemplo de amor, entusiasmo e dedicação à pesquisa, por todas as orientações, cobranças, palavras de incentivo e auxílio nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. **Dr. Gerardo Magela Vieira Junior**, pela imensurável contribuição para o desenvolvimento deste trabalho com a disponibilização do composto estudado.

À profa. **Dra. Cláudia do Ó Pessoa** e **Msc. Daisy Jereissati Barbosa Lima** do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pela parceria e contribuição na pesquisa desenvolvida.

Aos pesquisadores do Instituto Gonçalo Moniz (Fundação Oswaldo Cruz, Bahia): **Dr. Daniel Pereira Bezerra**, **Dra. Milena Botelho Pereira Soares** e **Ana Carolina Borges da Cruz Rodrigues**, pela contribuição na execução do estudo antitumoral em modelo xenográfico.

À professora **Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante** e ao professor **Dr. João Marcelo de Castro e Sousa**, pelo incentivo e apoio no desenvolvimento dos experimentos. Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Genética

Toxicológica (LAPGENIC), em especial ao **Marcus Vinicius**, pelo auxílio nos experimentos e por se mostrar sempre solícito.

À **Dra. Lidiane da Silva Araújo**, pela disponibilidade e ajuda incondicional na realização deste trabalho.

Às professoras **Dra. Adriana Maria Viana Nunes Pinheiro**, **Dra. Márcia dos Santos Rizzo** e à doutoranda **Emanuelle Karine Frota Batista**, bem como seu **Manoel**, técnico em patologia do CCA/UFPI, pela valiosa contribuição nos testes histológicos.

Ao **Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes**, por atender sempre da melhor maneira possível às minhas solicitações de auxílio nos experimentos realizados.

Aos parceiros do Laboratório de Cancerologia Experimental (Labcâncer), que muito contribuíram nesta jornada, tornando-a mais agradável. Ao pós-doutorando **Dr. José Roberto Ferreira**, por sua dedicação à pesquisa, compromisso ao laboratório e auxílio nas dificuldades. Aos doutorandos **Amanda Almeida**, **Jurandy Nascimento** e **Kátia Machado** por transformarem as dificuldades diárias em verdadeiros momentos de descontração, à mestranda **Nárcia Fonseca** e aos estudantes de graduação **Ian Jhemes**, **Débora** e **Denise** pela disponibilidade e constante auxílio.

Aos meus “bons amigos que nasceram pela fé”: **Luiza “Lulu”**, **Nandinha**, **Deusa “dinda”**, **Joe**, **Camila**, **Luiza** e **Ananddha**, por todos os momentos já vivenciados. E aos meus amigos da vida, em especial **Tamyres** e **Kássia**, por compreenderem a minha ausência em muitos momentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(Na ⁺ /K ⁺)-ATPase	Bomba de sódio e potássio atpase
ANOVA	<i>Analysys of Variance</i> (Análise de Variância)
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CMSP	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCT-8	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HL-60	Linhagem celular de leucemia prómielocítica humana
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L-929	Linhagem celular de fibroblastos murinos
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
OVCAR-8	Linhagem celular de carcinoma ovariano
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> (Tampão Fosfato)
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Rosswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro bovino fetal
SF-295	Linhagem celular de glioblastoma
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados no ano de 2016 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma 18
- Figura 2** – Fármacos de origem marinha aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e EMEA (*European Medicines Agency*), suas fontes biológicas, estruturas químicas e utilização terapêutica 20

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Distribuição natural dos membros da família Bufonidae..... 33
- Figura 2** – Anfíbios da Amazônia Brasileira..... 34
- Figura 3** – Moléculas dos venenos de sapos historicamente relatadas 36
- Figura 4** – Estrutura química geral dos Bufadienólídeos. 39
- Figura 5** – Bufadienólídeos comumente encontrados no extrato do veneno de *Rhinella marina* 41
- Figura 6** - Alguns compostos isolados a partir das secreções da pele de espécies *Rhinella* e *Rhaebo* 45
- Figura 7** – Esteróides Cardiotônicos 47
- Figura 8** – Apresentação das principais vias de morte celular desencadeadas por dois bufadienólídeos conhecidos: bufalina e cinobufagina 55

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Estrutura molecular da marinobufagina..... 78
- Figura 2** – Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da marinobufagina em camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180.. 84
- Figura 3** – Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da marinobufagina em camundongos imunodeficientes inoculados com células de carcinoma de colón humano HCT-116..... 85
- Figura 4** – Efeito do composto marinobufagina isolado do veneno de sapo *Rhinella marina* sobre a viabilidade celular de Sarcoma 180 (S180) determinada por exclusão do azul de tripan após 24, 48 e 72 h de exposição (A). Após 24 h de tratamento, o meio de cultura foi substituído por um novo, sem adição da marinobufagina (B). O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição da substância. O quimioterápico Doxorubicina (D, 1 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes, realizados em triplicata. * p < 0.05 comparado ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls; ** p < 0.05 comparado ao tratamento por 24h por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls. 90
- Figura 5** – Análise de eventos apoptóticos da marinobufagina isolada do veneno de *Rhinella marina* em células tumorais do tumor murino Sarcoma 180 realizada pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) após 72 h de incubação. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição da substância.

O quimioterápico Doxorrubicina (D, 1 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes, realizados em triplicata. * p < 0.05 comparado ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls.....	92
Figura 6 – Efeito da marinobufagina isolada do veneno de <i>Rhinella marina</i> nas alterações cromossômicas de células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorrubicina (D, 1 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * p < 0.05 quando comparado ao controle negativo (C) por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.....	93
Figura 7 – Tamanho das raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com marinobufagina durante 72h de exposição. O controle negativo foi exposto à água desclorificada e o controle positivo, ao sulfato de cobre 0,6 µg/mL. Os valores são expressos em média ± E.P.M. Números em percentual representam a inibição do crescimento radicular. * p < 0.05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman-Keuls.....	96
Figura 8 - Fotomicrografias de microscopia óptica células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações de marinobufagina após 72 h de exposição. (A) células sem alterações cromossômicas expostas a água desclorificada (controle negativo); (B) micronúcleo; (C) atraso cromossômico; (D) C-metáfase; (E) ponte cromossômica; (F) quebra cromossômica. Aumento de 400X	101
Figura 9 – Atividade antitumoral da marinobufagina em camundongos Swiss fêmeas transplantadas com o Sarcoma 180 e tratadas por via intraperitoneal (2,5 e 5 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.). * p < 0.05 comparado com o controle negativo por análise de variância (ANOVA), seguido de Student Newman-Keuls	103
Figura 10 – Análise histológica dos tumores Sarcoma 180 de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2,5 (C) e 5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 100x.....	105
Figura 11 – Análise histológica dos tumores HCT-116 de camundongos imunodeficientes tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 15 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2,5 (C) e 5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 100x.....	108

CAPÍTULO III

Figura 1 – Estrutura molecular da marinobufagina.....	125
Figura 2 – Isolamento de CMSP por meio da tecnologia de Ficoll Paque® Plus.....	128
Figura 3 – Avaliação do trânsito intestinal de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante 7 dias consecutivos via intraperitoneal nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO	

5%). Como controles positivos, foram usados Bisacodil 5 mg/kg oral e Atropina 3 mg/kg, i.p. Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n= 7/grupo). *p > 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls.....	147
Figura 4 – Análise histológica do fígado de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.....	149
Figura 5 – Análise histológica do fígado de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x	151
Figura 6 – Análise histológica dos rins de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.....	154
Figura 7 – Análise histológica dos rins de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x	155
Figura 8 – Análise histológica do coração de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.....	156
Figura 9 – Análise histológica do coração de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x	157

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Potencial hemolítico de extratos de veneno de sapos e atividade citotóxica em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de acordo com Ferreira et al. (2013)	42
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT	79
Tabela 2 - Atividade citotóxica do composto Marinobufagina em linhagens tumorais de células e sobre culturas primárias do tumor murino Sarcoma 180 avaliada pelos ensaios de MTT e Alamar Blue, respectivamente, após 72 h de incubação.....	88
Tabela 3 – Efeito citotóxico do composto Marinobufagina isolado do veneno do sapo <i>Rhinella marina</i> em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 72 h de exposição	98
Tabela 4 – Alterações cromossômicas causadas pelo composto Marinobufagina isolado do veneno do sapo <i>Rhinella marina</i> em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 72 h de exposição	100
Tabela 5 – Efeito da marinobufagina após 15 dias de tratamento via intraperitoneal sobre a massa tumoral de camundongos CB17 SCID inoculados com células de carcinoma de cólon HCT-116	106

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade do MTT.....	126
Tabela 2 – Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagina em células normais avaliados pelo ensaio do MTT ou Alamar Blue após 72 h de incubação.....	135
Tabela 3 – Efeitos tóxicos agudos do composto marinobufagina isolado de <i>Rhinella marina</i> após administração intraperitoneal em camundongos adultos Swiss	137
Tabela 4 – Peso relativo dos órgãos de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%)	139
Tabela 5 – Peso relativo dos órgãos de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).....	140
Tabela 6 – Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante 7 dias consecutivos via intraperitoneal nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).	141
Tabela 7 – Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante 15 dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia por via intraperitoneal. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).....	142

Tabela 8 – Perfil hematológico de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%) 145

Tabela 9 – Perfil hematológico de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%)..... 145

LÍVIA QUEIROZ DE SOUSA. **Marinobufagina: ação antineoplásica *in vitro* e *in vivo* e perfil toxicogenético.** Orientador: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017.

RESUMO

O câncer é considerado a segunda maior causa de morte no mundo. Nesse contexto, os produtos naturais têm se mostrado uma importante fonte de compostos farmacologicamente ativos, inclusive de quimioterápicos contra tumores sólidos e hematológicos. Dessa forma, as secreções da pele de anfíbios aparecem como uma recente fonte de exploração de novas moléculas, com destaque para a marinobufagina, um bufadienolídeo cardiotônico e natriurético que apresenta uma maior afinidade pela subunidade α_1 da Na^+/K^+ -ATPase resistente à ouabaina. O presente estudo teve por objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a capacidade anticâncer dos bufadienolídeos e avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e toxicológica do composto marinobufagina, isolado do extrato do veneno do sapo *Rhinella marina*. A revisão de literatura demonstrou que a classe dos bufadienolídeos surge como uma incrível fonte natural de biodiversidade química com uma seletividade moderada contra células tumorais. A marinobufagina foi avaliada quanto à atividade citotóxica *in vitro* frente a diferentes linhagens de células normais e tumorais utilizando os ensaios de MTT e frente à cultura primária do tumor Sarcoma 180 (S180), pelo ensaio Alamar Blue, após 72 h de exposição. Para complementação da avaliação citotóxica, foi realizado o ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) em células do S180 e a toxicidade por meio do modelo vegetal *Allium cepa*. Para a avaliação do potencial antitumoral *in vivo*, a marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, durante 7 dias e 15 dias consecutivos em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e camundongos imunodeficientes transplantados com células de carcinoma de cólon humano (HCT-116), respectivamente. Assim, o composto estudado apresentou potente ação antiproliferativa com valores de CI_{50} entre 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (HL-60) e 2.94 $\mu\text{g/mL}$ (HEP-2) e foi citotóxico para células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP, 4.35 $\mu\text{g/mL}$). A marinobufagina também inibiu o crescimento das raízes de *Allium cepa*, revelando toxicidade macroscópica ($p < 0.05$) e mostrou ações clastogênicas semelhantes em células de S180 e meristemáticas de raiz *A. cepa*. Nos testes *in vivo*, o composto reduziu somente o crescimento de tumores humanos (HCT-116) com percentuais de inibição de 26.3 e 46.5% nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, respectivamente e foi incapaz de interferir no crescimento do tumor S180. Os camundongos imunodeficientes tratados com marinobufagina na dose de 5 mg/kg apresentaram uma redução significativa na massa corpórea final e aumento significativo dos níveis séricos de creatinina ($p < 0.05$). Em conjunto com as análises teciduais, os resultados dos testes toxicológicos *in vivo* revelaram alterações histológicas renais e hepáticas reversíveis e ação epileptogênica na dose de 10 mg/kg. Dessa forma, a marinobufagina mostrou potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra células tumorais humanas e fraca atividade contra células murinas, com indício de toxicidade branda e ausência de comprometimento funcional severo nos animais tratados com o composto.

Palavras-chave: Bufadienolídeos. Marinobufagina. Atividade antitumoral. Toxicidade pré-clínica.

LÍVIA QUEIROZ DE SOUSA. **Marinobufagin: *in vitro* and *in vivo* antineoplastic action and toxicogenetic profile.** Supervisor: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Master's dissertation. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 2017.

ABSTRACT

Cancer is considered the second leading cause of death in the world. In this context, natural products have an important source of pharmacologically active compounds, including chemotherapeutics against solid and hematologic tumors. Thus, amphibian skin secretions appear as a recent source of exploration of new molecules, especially marinobufagin, a cardiotonic and natriuretic bufadienolide that has a higher affinity for the $\alpha 1$ subunit of ouabain-resistant Na^+/K^+ -ATPase. The aim of the present study was to review the literature on the anticancer capacity of bufadienolide and to evaluate the cytotoxic, antitumor and toxicological activities of the compound marinobufagin, isolated from extracts of the *Rhinella marina* frog poison. The literature review has shown that bufadienolide class appears as an incredible natural source of chemical biodiversity with a moderate selectivity against tumor cells. Marinobufagin was evaluated for cytotoxic activity *in vitro* against different lineages of normal and tumor cells using the MTT assays and against the Sarcoma 180 (S-180) tumor primary culture by the Alamar Blue assay, after 72 h of exposure. To complement the cytotoxic evaluation, the cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) in S180 cells and the toxicity by means of the vegetal model *Allium cepa* were carried out. To evaluate the *in vivo* antitumor potential, the marinobufagin was administered intraperitoneally at doses of 2.5 and 5 mg/kg/day for 7 and 15 consecutive days in mice transplanted with Sarcoma 180 tumor and immunodeficient mice transplanted with carcinoma cells of human colon (HCT- 116), respectively. Therefore, the studied compound showed potent antiproliferative action with IC_{50} values between 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HL-60) and 2.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HEP-2) and cytotoxic to human peripheral blood mononuclear cells, 4.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Marinobufagin also inhibited the root growth of *Allium cepa*, revealing macroscopic toxicity ($p < 0.05$) and showed similar clastogenic actions on S180 and meristematic cells of *A. cepa* root. The compound reduced only the growth of human tumors (HCT-116) in the *in vivo* tests, with inhibition percentages of 26.3 and 46.5% at doses of 2.5 and 5 mg/kg/day, respectively, and was unable to interfere with the growth of S180 tumor. Immunodeficient mice treated with 5 mg/kg of marinobufagin showed a significant reduction in final body mass and a significant increase in serum creatinine levels ($p < 0.05$). The combination of the tissue analyzes and the *in vivo* test results revealed reversible renal and hepatic histological changes and epileptogenic action at a dose of 10 mg/kg. Thereby, marinobufagin showed *in vitro* and *in vivo* antitumor potential against human tumor cells and poor activity against murine cells, with evidence of mild toxicity and absence of severe functional impairment in the animals treated with the compound.

Keywords: Bufadienolide. Marinobufagin. Antitumor activity. Preclinical toxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
CAPÍTULO I - Bufadienólídeos de anfíbios: uma fonte promissora de protótipos anticâncer para inovação radical, ativação da apoptose e inibição da Na⁺/K⁺-ATPase		26
RESUMO		28
ABSTRACT		29
1	Produtos naturais como protótipos com propriedades semelhantes a fármacos.	30
2	Família Bufonidae: classificação, distribuição, componentes das secreções glandulares e fatores ambientais	31
2.1	A diversidade química dos venenos está em risco de extinção?	37
3	Bufadienólídeos e Cardenólídeos: ocorrência, síntese e mecanismos de citotoxicidade.	38
3.1	Análise de citotoxicidade	41
3.2	Cardenólídeos e bufadienólídeos são capazes de bloquear Na ⁺ /K ⁺ -ATPase em células tumorais e normais?	45
3.3	Bufalina e Cinobufagina como moléculas promissoras	50
4	Conclusões finais e perspectivas futuras	56
REFERÊNCIAS		57
CAPÍTULO II - Ação antiproliferativa do bufadienólídeo Marinobufagina em células animais e vegetais		72
RESUMO		74
ABSTRACT		75
1	INTRODUÇÃO	76
2	MATERIAIS E MÉTODOS	77
2.1	Coleta, isolamento e identificação do composto	77
2.2	Cultivo celular	78
2.3	Animais	79
2.4	Avaliação do potencial citotóxico	80
2.5	Mecanismo de ação <i>in vitro</i>	81
2.6	Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal de <i>Allium cepa</i>	82
2.7	Análise da atividade antitumoral <i>in vivo</i> no tumor Sarcoma 180	83
2.8	Ensaio de eficácia antitumoral <i>in vivo</i> em modelo xenográfico	84
2.9	Análises estatísticas	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1	Potencial citotóxico e antiproliferativo	86
3.2	Atividade antitumoral <i>in vivo</i>	102

4 CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS	110
CAPÍTULO III - Toxicidade da molécula Marinobufagina: parâmetros celulares e sistêmicos	120
RESUMO	122
ABSTRACT	123
1 INTRODUÇÃO.....	124
2 MATERIAIS E MÉTODOS	125
2.1 Coleta, isolamento e identificação do composto	125
2.2 Determinação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	126
2.3 Estudo de toxicidade <i>in vivo</i>	129
2.4 Observações histopatológicas	132
2.5 Avaliação do trânsito intestinal.....	132
2.6 Análises Estatísticas	133
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
3.1 Citotoxicidade	133
3.2 Toxicidade sistêmica e parâmetros fisiológicos.....	135
4 CONCLUSÃO	158
REFERÊNCIAS	158
ANEXOS.....	15967

1 INTRODUÇÃO

Os países em desenvolvimento já concentram 80% da carga de enfermidades não transmissíveis no mundo e o câncer será a principal causa de morbimortalidade nas próximas décadas (BRAY et al., 2012; BARBOSA et al., 2015). A estimativa para o biênio 2016-2017 indica a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer no Brasil, sendo 6.450 novos casos somente no estado do Piauí. Com exceção dos casos de câncer de pele não melanoma, entre os tipos de câncer mais frequentes em homens estão próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Nas mulheres, se destacam os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago (**Figura 1**) (INCA, 2016).


Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1 – Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados no ano de 2016 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA (2016).

Dessa forma, o desenvolvimento de terapias efetivas contra o câncer é um objetivo importante e presente nas ciências biomédicas modernas, sendo um grande investimento para os setores público e privado. A disponibilidade limitada de sistemas pré-clínicos preditivos obscurece a capacidade de selecionar tratamentos que possam apresentar sucesso ou eventuais falhas durante a investigação clínica (PANTALEAO; LUCHS, 2010; COOK; JODRELL; TUVESON, 2012).

A quimioterapia, juntamente com a cirurgia e a radioterapia constituem as principais modalidades entre as diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer (KUMAR et al., 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011), porém, o uso de muitos agentes quimioterápicos disponíveis é limitado na prática clínica devido a um estreito índice terapêutico, significativa toxicidade e resistência frequentemente adquirida (VANNEMAN; DRANOFF, 2012). Deste modo, é de grande importância a busca e desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos mais

seletivos, como maior potência terapêutica (principalmente contra tumores resistentes), sempre levando em consideração a redução dos efeitos adversos (SCHIJNS et al., 2014; PRAXEDES, 2016).

Os produtos naturais são a principal fonte de compostos terapêuticos inovadores e farmacologicamente ativos para doenças infecciosas (bacterianas e fúngicas), distúrbios lipídicos, dores, imunomodulação, e como quimioterápicos contra tumores sólidos e hematológicos (CLARDY; WALSY, 2004; FERREIRA et al., 2014, PEREIRA et al., 2015). Porém, após a introdução da química combinatória e da síntese de alto rendimento, os produtos naturais tornaram-se uma fonte menos significativa para obtenção de fármacos. Embora os gastos globais em pesquisa com medicamentos tenham dobrado desde 1991, o número de novos fármacos aprovados anualmente diminuiu em 50% ou mais. Para mudar essa situação, a indústria farmacêutica transferiu seu interesse novamente para produtos naturais. É comumente aceito que estes são inerentemente melhor tolerados no organismo e apresentam vantagens inatas para o desenvolvimento de medicamentos e síntese de produtos químicos (ZAID et al., 2010).

O Brasil detém uma expressiva biodiversidade na sua fauna e flora, seja ela terrestre ou marinha, da qual grande parte ainda não foi investigada em diversos aspectos, demonstrando seu potencial para exploração de produtos naturais disponíveis (COSTA-NETO, 2005). Em comparação com os compostos de formas de vida terrestres, os produtos naturais obtidos de marinhos mostram uma grande incidência de bioatividade, o que torna os animais fontes importantes de metabólitos secundários estruturalmente diversificados e biologicamente ativos (KONG; JIANG; ZHANG, 2010; ZHANG et al., 2016). Nas últimas décadas, os esforços para obter compostos terapêuticos a partir de animais foram recompensados pela introdução de pelo menos oito fármacos no mercado (**Figura 2**), dezenas de candidatos sob avaliação pré-clínica e clínica e expressivo número de moléculas que aguardam investigação (ZHANG et al., 2016).

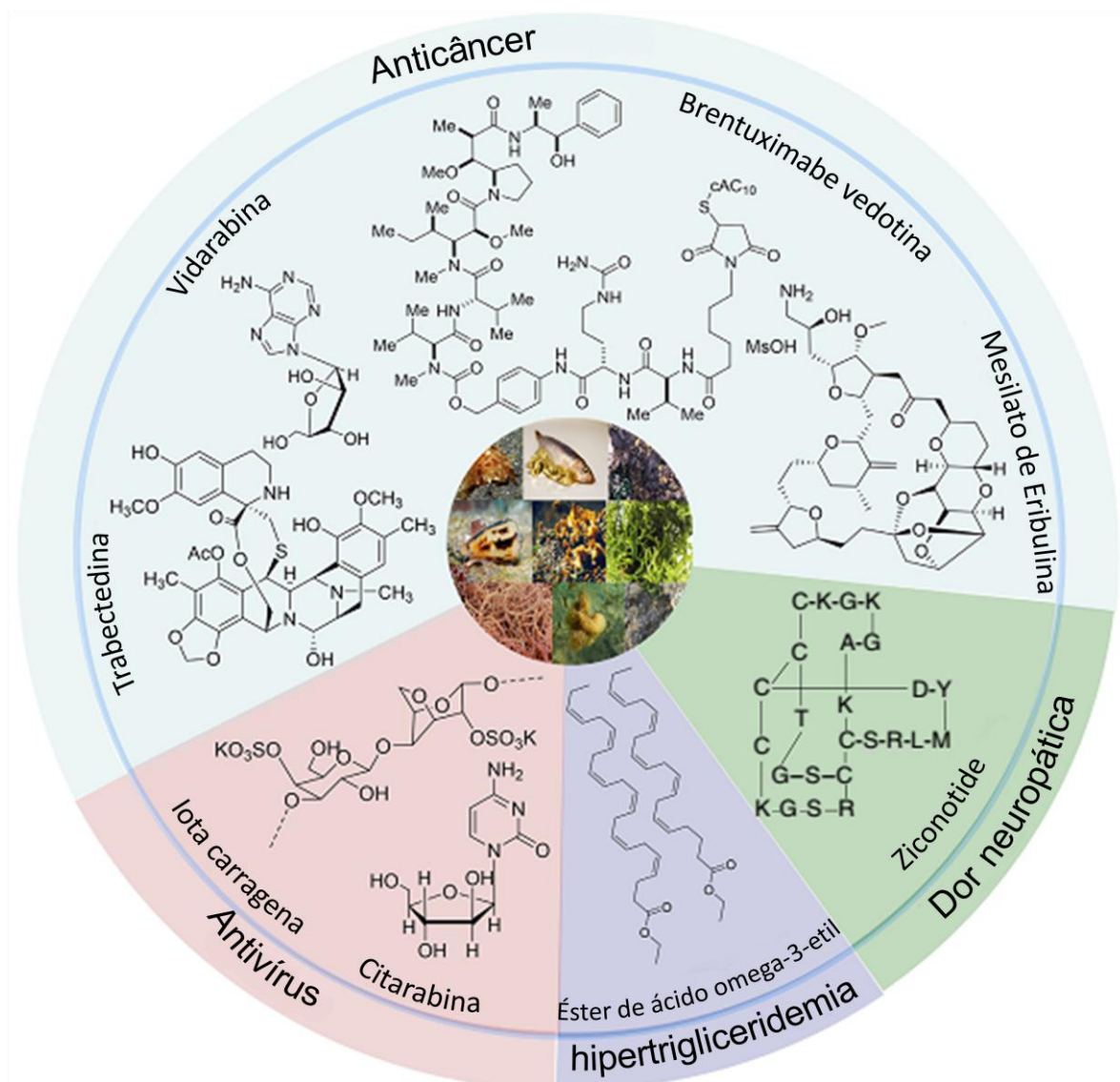


Figura 2 – Fármacos de origem marinha aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e EMEA (*European Medicines Agency*), suas fontes biológicas, estruturas químicas e utilização terapêutica. Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2016).

Venenos provenientes de animais correspondem a uma mistura complexa de compostos (KING, 2011). O isolamento de compostos bioativos a partir desses venenos representa uma abordagem farmacológica graças à alta potência e especificidade para alvos moleculares (CÓRDOVA et al., 2016). Nos anos de 2000 a 2013, aproximadamente 1.453 novos medicamentos foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, mas apenas alguns medicamentos foram derivados ou inspirados em toxinas animais (HARVEY, 2014; KINCH et al., 2014; ZAMBELLI et al., 2016).

Entre os animais que têm ganhado atenção estão os anfíbios. A mudança do ambiente aquático para o terrestre exigiu aquisições graduais de adaptações morfofuncionais, como o surgimento de glândulas exócrinas multicelulares na pele para evitar a desidratação (TOLEDO; JARED, 1995; RUPPERT et al., 2005). Portanto, os venenos das glândulas parotóides são considerados um reservatório promissor de moléculas inexploradas, apresentando substâncias farmacologicamente ativas, principalmente aminas biogênicas, bufadienolídeos, alcalóides, peptídeos e proteínas com funções principais de protegê-los contra infecções de microorganismos e defendê-los contra predadores (DALY, 1995; DUELLMAN; TRUEB, 1996; CLARKE, 1997; SCIANI et al., 2012; KAMBOJ et al., 2013).

Os bufadienolídeos, classe de substâncias com ação cardiotônica, compreendem um dos grupos mais interessantes de substâncias bioativas presentes em secreções de anfíbios e têm revelado promissora atividade antitumoral (IMAI et al., 1965; CUNHA-FILHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; CÓRDOVA et al., 2016). Um membro amplamente estudado dessa classe é a marinobufagina, agente cardiotônico e natriurético que possui afinidade pela subunidade α_1 da Na^+/K^+ -ATPase resistente à ouabaína (BAGROV et al., 2009; LENAERTS et al., 2013).

Diante do exposto, essa dissertação intitulada “Marinobufagina: ação antineoplásica *in vitro* e *in vivo* e perfil toxicogenético”, foi estruturada em capítulos com intuito de realizar uma revisão bibliográfica da classe dos bufadienolídeos e sua promissora atividade anticâncer (capítulo 1), abordar o potencial citotóxico e antitumoral do composto marinobufagina, bufadienolídeo escolhido e isolado com base em estudos realizados previamente da atividade antiproliferativa do extrato do veneno do sapo *Rhinella marina* (capítulo 2) e, finalmente, fornecer informações quanto aos parâmetros fisiológicos e toxicológicos do mesmo composto (capítulo 3).

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, I. R.; DE SOUZA, D. L. B.; BERNAL, M. M.; COSTA, I. C. C. Cancer mortality in Brazil: Temporal Trends and Predictions for the Year 2030. **Medicine**, v. 94, p. 1–6, 2015.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.
- BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008 – 2030): a population-based study. **Lancet Oncology**, v. 13, p. 790–801, 2012.
- CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions: Their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews**, v. 72, p. 365-379, 1997.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.
- COOK, N.; JODRELL, D. I.; TUVESON, D. A. Predictive *in vivo* animal models and translation to clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 253–260, 2012.
- CÓRDOVA, W. H. P.; LEITÃO, S. G.; CUNHA-FILHO, G.; BOSCH, R. A.; PEREDAMIRANDA, R.; GERVOU, R.; TOUZA, N. A.; QUINTAS, L. F.; NOEL, F. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na⁺/K⁺-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27-34, 2016.
- COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 33–43, 2005.
- CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R.; RODRIGUES, F. A.; DOS SANTOS, M. L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339–348, 2010.
- DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 9-13, 1995.
- DUELLEMAN, W. E.; TRUEB, L. **The biology of amphibians**. New York: MacGraw-Hill, 1996.
- FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASI, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SINHORIN, A. P.; PESSOA, C.;

VIEIRA JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43-51, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C. G.; LIMA, D. J. B.; COSTA, N. D. J.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 112–125, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, 2014.

IMAI, S.; MURASE, H.; KATORI, M.; OKADA, M.; SHIGEI, T. A study on the structure–activity relationship of the cardiotoxic steroids. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 62–71, 1965.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

KAMBOJ, A. J.; RATHOUR, A.; KAUR, M. Bufadienolides and their medicinal utility: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 20-27, 2013.

KINCH, M. S.; HAYNESWORTH, A.; KINCH, S. L.; HOYER, D. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827–2013. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 1033–1039, 2014.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, p. 1469–1484, 2011.

KONG, D. X.; JIANG, Y. Y.; ZHANG, H. Y. Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 884–886, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Diseases**. China: WB Saunders, 2004.

LENAERTS, C.; DEMEYER, M.; GERBAUX, P.; BLANKERT, B. Analytical aspects of marinobufagenin. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 193–201, 2013.

PANTALEAO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 439–445, 2010.

PEREIRA, J. B. A.; RODRIGUES, M. M.; MORAIS, I. R.; VIEIRA, C. R. S.; SAMPAIO, J. P. M.; MOURA, M. G.; DAMASCENO, M. F. M.; SILVA, J. N.; CALOU, I. B. F.; DEUS, F. A.; PERON, A. P.; ABREU, M. C.; MILITÃO, G. C. G.; FERREIRA, P. M. P. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais no centro-sul piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 550-556, 2015.

PRAXEDES, L. K. S. **Desenvolvimento de terapia alternativa usando adjuvantes nanoestruturados no tratamento do tumor experimental**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2016.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Roca, 2005.

SCHIJNS, V.; TARTOUR, E.; MICHALEK, J.; STATHOPOULOS, A.; DOBROVOLSKIENĚ, N. T.; STRIOGA, M. M. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. **Cytotherapy**, v. 16, p. 427-439, 2014.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ JUNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 10-18, 2012.

TOLEDO, R. R.; JARED, R. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 111, p. 1–29, 1995.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 237–251, 2012.

ZAID, H.; RAIYN, J.; NASSER, A.; SAAD, B.; RAYAN, A. Physicochemical Properties of Natural Based Products versus Synthetic Chemicals. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 3, p. 194-202, 2010.

ZAMBELLI, V. O.; PASQUALOTO, K. F.; PICOLO, G.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; CURY, Y. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 30–36, 2016.

ZHANG, G.; LI, J.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Advanced tools in marine natural drug Discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 13–23, 2016.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica, antitumoral e toxicológica do composto marinobufagina isolado do extrato do veneno do sapo *Rhinella marina*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão de literatura sobre a capacidade anticâncer dos bufadienólídeos extraídos de venenos de anfíbios da família Bufonidae;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do composto marinobufagina em células normais e tumorais utilizando ensaios colorimétricos e morfológicos;
- Determinar a citotoxicidade e genotoxicidade da marinobufagina no modelo vegetal de *Allium cepa*;
- Determinar a atividade antitumoral *in vivo* em camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 e com células de carcinoma de cólon humano;
- Realizar um *screening* do perfil de toxicidade aguda da marinobufagina em camundongos;
- Analisar o trânsito intestinal, o perfil bioquímico e hematológico, além de possíveis alterações histopatológicas de órgãos-chave de animais tratados com a marinobufagina.

CAPÍTULO I

Bufadienolídeos de anfíbios: uma fonte promissora de protótipos anticâncer para inovação radical, ativação da apoptose e inibição da Na^+/K^+ -ATPase

(Artigo publicado: *Toxicon* – Qualis B1)

Bufadienólídeos de anfíbios: uma fonte promissora de protótipos anticâncer para inovação radical, ativação da apoptose e inibição da Na^+/K^+ -ATPase

Lívia Queiroz de Sousa^a, Kátia da Conceição Machado^a, Samara Ferreira de Carvalho Oliveira^b, Lidiane da Silva Araújo^c, Evaldo dos Santos Monção-Filho^c, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^a, Gerardo Magela Vieira-Júnior^c, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,d*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

^b *Departamento de Ciências Biológicas, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, da Universidade Federal do Piauí, 64607-670, Picos, Piauí Brasil.*

^c *Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

^d *Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

RESUMO

Os anfíbios apresentam em sua pele moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas farmacologicamente ativas como defesa contra microorganismos, predadores e infecções, tais como esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados de guanidina, proteínas e peptídeos. Com base no potencial bioativo descoberto dos bufadienolídeos, este trabalho revisou a contribuição de anfíbios, especialmente dos membros da família Bufonidae, como fonte de novas moléculas citotóxicas e antitumorais, destacando os mecanismos responsáveis por tais incríveis potencialidades biológicas. Os estudos antitumorais *in vitro* realizados com secreções da pele e seus componentes isolados (especialmente marinobufagina, telocinobufagina, bufalina e cinobufagina) das espécies *Rhinella* e *Rhaebo* têm demonstrado notável ação biológica em linhagens de células tumorais humanas hematológicas, sólidas, sensíveis e/ou resistentes. Alguns compostos revelaram uma maior seletividade contra as linhagens neoplásicas em comparação com células normais e algumas moléculas podem associar-se bioquimicamente com Na^+/K^+ -ATPase havendo semelhança estrutural com os complexos digoxina- e ouabaína- Na^+/K^+ -ATPase, o que implica em um mecanismo semelhante de inibição da Na^+/K^+ -ATPase por cardenolídeos e bufadienolídeos. Alguns bufadienolídeos também reduzem os níveis de proteínas antiapoptóticas e síntese de DNA, causam alterações morfológicas (condensação da cromatina, fragmentação nuclear, retração do citoplasma, vacúolos citoplasmáticos, redução da viscosidade e corpos apoptóticos), parada do ciclo celular na fase S ou G_2/M , despolarização mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de Bax e caspases (-3, -9, -8 e -10), aumento da expressão da proteína associada ao domínio de morte – Fas (FADD), inibição da topoisomerase II, fragmentação do DNA, diferenciação celular, inibição da angiogênese, reversão da resistência a múltiplos fármacos e regulação da resposta imunológica. Então, os bufadienolídeos isolados de anfíbios, alguns deles em risco de extinção, surgem como uma incrível fonte natural de biodiversidade química com uma moderada seletividade contra células tumorais humanas e fraca atividade contra células murinas, provavelmente devido a diferenças estruturais entre as subunidades de Na^+/K^+ -ATPase de humanos e camundongos.

Palavras-chave: Secreção de sapo. Diversidade química. Morte celular. Função cardiovascular. Estudos Clínicos.

Bufadienolides from amphibians: a promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition

ABSTRACT

Amphibians present pharmacologically active aliphatic, aromatic and heterocyclic molecules in their skin as defense against microorganisms, predators and infections, such as steroids, alkaloids, biogenic amines, guanidine derivatives, proteins and peptides. Based on the discovered bioactive potential of bufadienolides, this work reviewed the contribution of amphibians, especially from members of Bufonidae family, as source of new cytotoxic and antitumor molecules, highlighting the mechanisms responsible for such amazing biological potentialities. *In vitro* antitumor studies performed with skin secretions and its isolated components (specially marinobufagin, telocinobufagin, bufalin and cinobufagin) from *Rhinella* and *Rhaebo* species have shown remarkable biological action on hematological, solid, sensitive and/or resistant human tumor cell lines. Some compounds revealed higher selectivity against neoplastic lines when compared to dividing normal cells and some molecules may biochemically associate with Na⁺/K⁺-ATPase and there is structural similarity to the digoxin- and ouabain-Na⁺/K⁺-ATPase complexes, implying a similar mechanism of the Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cardenolides and bufadienolides. Some bufadienolides also reduce levels of antiapoptotic proteins and DNA synthesis, cause morphological changes (chromatin condensation, nuclear fragmentation, cytoplasm shrinkage, cytoplasmic vacuoles, stickiness reduction and apoptotic bodies), cell cycle arrest in G₂/M or S phases, mitochondrial depolarization, cytochrome c release, activation of Bax and caspases (-3, -9, -8 and -10), increased expression of the Fas-Associated protein with Death Domain (FADD), induce topoisomerase II inhibition, DNA fragmentation, cell differentiation, angiogenesis inhibition, multidrug resistance reversion, and also regulate immune responses. Then, bufadienolides isolated from amphibians, some of them at risk of extinction, emerge as a natural class of incredible chemical biodiversity, has moderate selectivity against human tumor cells and weak activity on murine cells, probably due to structural differences between subunits of human and mice Na⁺/K⁺-ATPases.

Keywords: Toad secretion. Chemical diversity. Cell death. Cardiovascular role. Clinical studies.

1 Produtos naturais como protótipos com propriedades semelhantes a fármacos.

Entre 1981 e 2010, 1.073 novas entidades químicas (*New Chemical Entities* - NCEs) foram aprovadas como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e 64% são moléculas naturais, derivadas ou sintetizadas com base em compostos naturais. Apesar do interesse na modelagem molecular, na química combinatória e outras técnicas de síntese química, os produtos naturais permanecem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra infecções fúngicas ou bacterianas, vetores de doenças, câncer, dislipidemias e imunomodulação (BUTLER, 2004; BALUNAS; KINGNORN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2012; FARIAS et al., 2013; SANTOS et al., 2013; PEREIRA et al., 2015; SIMÕES et al., 2015; FERREIRA et al., 2016).

Há muito tempo é reconhecido que as estruturas de produtos naturais apresentam características de elevada diversidade química, especificidade bioquímica, flexibilidade molecular e outras propriedades moleculares que as tornam estruturas promissoras para a descoberta de fármacos, ajudando-nos a diferenciá-las de bibliotecas de compostos sintéticos e combinatórios. Além disso, a fração de estruturas de produtos naturais com duas ou mais violações da "regra dos cinco de Lipinski" é bastante baixa ($\approx 10\%$) e semelhante à de fármacos comerciais (LIPINSKI et al., 1997; FEHER; SCHMIDT, 2003; FERREIRA et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012, PASCOLUTTI; QUINN, 2014). Todas estas vantagens explicam parcialmente por que cerca de 60% dos NCEs introduzidos como escolhas farmacêuticas são direta ou indiretamente baseados em compostos naturais. Definitivamente, esses NCEs que imitam os farmacóforos de produtos naturais já foram selecionados e validados ao longo de milhares de anos por condições ambientais e possuem propriedades semelhantes a fármacos comumente encontrados em moléculas naturais.

Entre os recursos ambientais, os animais produtores de toxinas fazem parte da medicina tradicional em vários países ao redor do mundo. Os anfíbios, especialmente da família Bufonidae, apresentam moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas farmacologicamente ativas em sua pele com uma diversificada gama de esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados de guanidina, proteínas e peptídeos como defesa contra microorganismos, predadores e infecções (CLARKE, 1997; DALY, 1995; DUELLMAN; TRUEB, 1996; PRATES; BLOCH-JUNIOR, 2000;

DALY et al., 2004; COSTA-NETO, 2005; GUTIERREZ, 2016). Os venenos desses animais apresentam diferentes atividades biológicas, como tripanocida, leishmanicida, antibacteriana, antifúngica (RIERA et al., 2003; CUNHA-FILHO et al., 2005; TEMPONE et al., 2008), antiproliferativa (CUNHA-FILHO et al., 2010; GAO et al., 2011; BANULS et al., 2013a; FERREIRA et al., 2013; SCIANI et al., 2013), inseticida (SUPRATMAN et al., 2000), antiviral (WANG et al., 2011) e cardiotônica (IMAI et al., 1965; MIJATOVIC et al., 2012).

Nesse contexto, os cardenolídeos como ouabaína e digoxina são os esteróides cardiotônicos mais amplamente estudados e a base de dados *PubMed* (NCBI, EUA) oferece cerca de 39.739 referências sobre cardenolídeos. Assim, com base no grande e recém-descoberto potencial bioativo de bufadienolídeos, este trabalho revisa de uma forma sistemática e crítica, a contribuição dos anfíbios, especialmente dos membros da família Bufonidae, como fonte de novas moléculas citotóxicas e antitumorais, destacando os mecanismos responsáveis por incríveis potencialidades biológicas.

2 Família Bufonidae: classificação, distribuição, componentes das secreções glandulares e fatores ambientais

Os anfíbios surgiram no final do período Devoniano com a mudança do ambiente aquático para o terrestre devido às adaptações comportamentais e morfofuncionais progressivas (TOLEDO; JARED, 1995).

Do ponto de vista quantitativo, há uma incrível diversidade global de espécies de anfíbios. O Brasil e a Colômbia, com 789 e 642 espécies, respectivamente, têm o maior número de espécies. A China (335 espécies) tem o maior número de espécies no Velho Mundo. A República Democrática do Congo (215) tem o maior número da África continental e 239 espécies são registradas em Madagáscar. Austrália e Papua-Nova Guiné têm 225 e 289 espécies, respectivamente. Na América do Norte, o México tem o maior número de espécies (357), mas há 291 espécies nos Estados Unidos (WAKE; VREDENBURG, 2008).

Os anfíbios (Classe *Amphibia*, Subclasse Lissamphibia) inclui sapos, rãs, pererecas (Ordem Anura, ≈ 5.600 espécies atualmente reconhecidas), salamandras (Ordem Caudata, ≈ 570 espécies) e cecílias (Ordem Gymnophiona, ≈ 175 espécies), com até 6.345 espécies (VITT; CALDWELL, 2014). A ordem Anura corresponde ao maior grupo da classe *Amphibia* (**Figura 1**). A maioria deles vive nos trópicos e

aproximadamente 600 espécies vivem na bacia amazônica. Eles são bem adaptados e estão entre os vertebrados mais abundantes e presentes em uma grande diversidade de habitats. Outros anfíbios, tais como salamandras e cecílias são representados por algumas espécies na região amazônica e são também encontrados no México, Costa Rica, Ásia, África e Europa (GOWER; WILKINSON, 2005; HASEYAMA; CARVALHO, 2011; JIA; GAO, 2016).

A Família Bufonidae contém cerca de 51 gêneros e 596 espécies distribuídas em todo mundo, exceto na Austrália, regiões oceânicas, Deserto do Saara, Madagascar, Ártico e Antártico (**Figura 1**). Devido às relações filogenéticas, recentemente, vários estudos revisaram essa família. Conseqüentemente, com base em dados moleculares, nomenclaturas de táxon foram alteradas, como o gênero *Bufo*. Por exemplo, Chaparro et al. (2007) sugeriram que a maior parte das espécies de *Bufo* da América do Sul fossem colocadas no gênero *Rhinella* (FROST et al., 2006; PRAMUK, 2006; CHAPARRO et al., 2007; FROST, 2015).

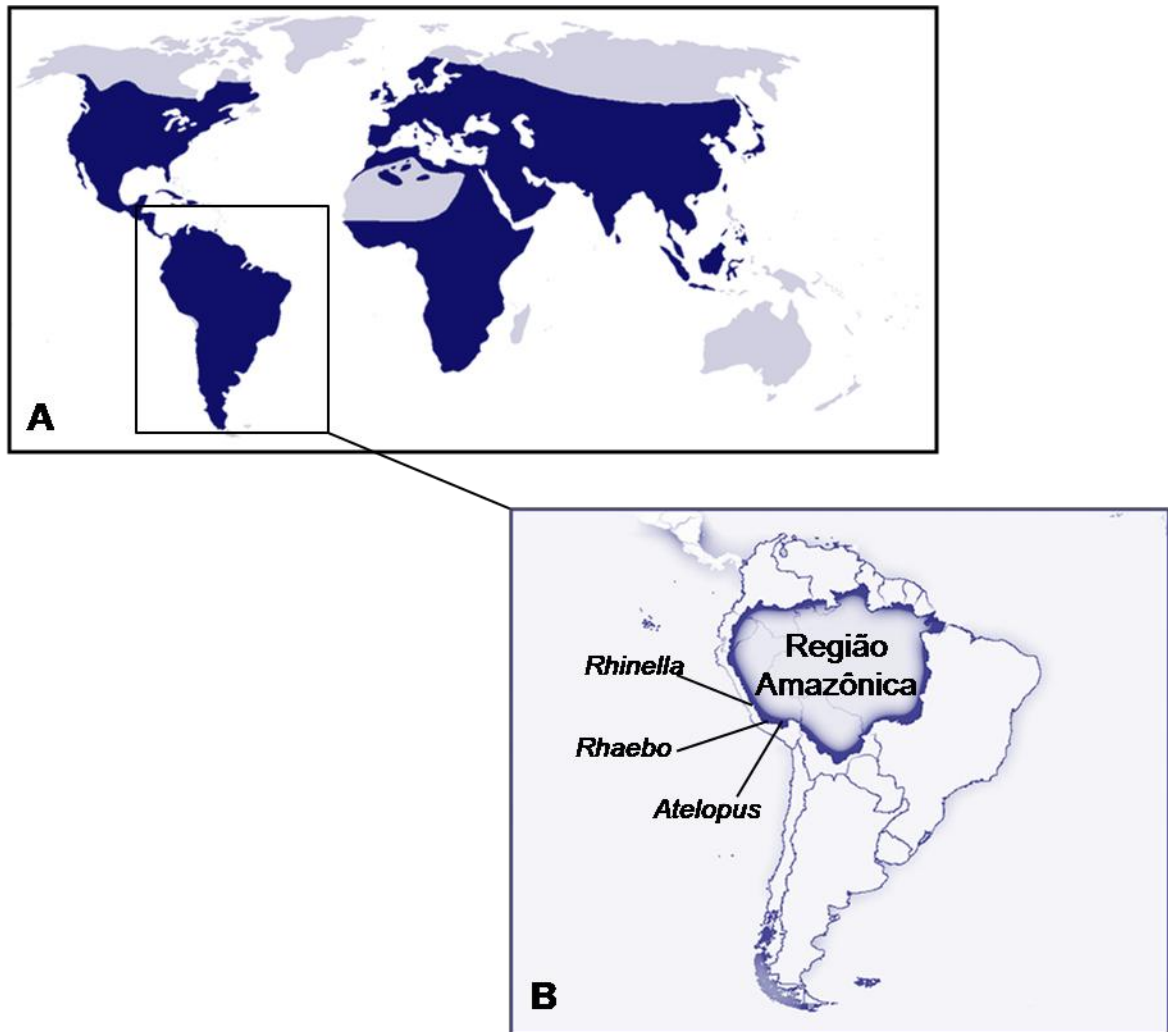


Figura 1 – Distribuição natural dos membros da família Bufonidae. A - Bufonidae tem aproximadamente 51 gêneros e 596 espécies distribuídas em todo o mundo (em azul escuro), com exceção da Austrália, regiões oceânicas, Deserto do Saara, Madagascar, região Ártica e Antártica (cinza). B – No Brasil, *Rhinella* é o gênero mais representativo, seguido pelos gêneros *Rhaebo* e *Atelopus*. (EASTEAL, 1963; FROST et al., 2006; PRAMUK, 2006; CHAPARRO et al., 2007; LIMA et al., 2012; FROST, 2015).

No Brasil, a família Bufonidae é representada por sete gêneros, sendo *Rhinella* o mais representativo com cerca de 40 espécies. São comumente conhecidos pelo nome genérico de "sapo-cururu" (do tupi *kuru'ru*, que significa sapo grande). Uma das espécies mais analisadas na região amazônica é a *Rhinella marina* (**Figura - 2A**), antigo *Bufo marinus* (EASTEAL, 1963). Outros espécimes encontrados na bacia do Amazonas são *Leptodactylus labyrinthicus*, Leptodactylidae (**Figura - 2B**), *Rhaebo guttatus*, Bufonidae (**Figura - 2C**) e *Phyllomedusa camba*, Hylidae (**Figura - 2D**).



Figura 2 – Anfíbios da Amazônia Brasileira. *Rhinella marina*, Bufonidae (A), liberando sua secreção da pele; *Leptodactylus labyrinthicus*, Leptodactylidae (B); *Rhaebo guttatus*, Bufonidae (C) e *Phyllomedusa camba*, Hylidae (D). Fonte: Arquivos pessoais.

Os principais mecanismos fisiológicos adaptativos estão relacionados à pele, que certamente desempenhou um papel extraordinário para prevenir a desidratação e permitiu a evolução orgânica e ajustes sistêmicos. Além disso, a pele dos anfíbios tem funções extremamente importantes, incluindo a regulação respiratória, o transporte de água e solutos, controle da temperatura corporal e pressão arterial e a produção de compostos com atividade antibiótica para proteger os animais de predadores e infecções fúngicas, virais e bacterianas, considerado este um dos principais fatores que asseguraram a sobrevivência e a permanência desses animais em ambientes terrestres (DUELLMAN, 1992; CLARK, 1997).

Muitos desses compostos são sintetizados por glândulas cutâneas distribuídas por toda a pele. Nos bufonídeos, glândulas exócrinas multicelulares são localizadas atrás dos olhos, formando um par de estruturas postorbitais, conhecidas como macroglândulas paratóides (DUELLMAN, 1992; DALY, 1995; TOLEDO; JARED, 1995; PERRY, 2000; JARED et al., 2011). Curiosamente, alguns compostos

também são responsáveis pela excreção de Na^+ e as composições da secreção e seus níveis dependem da salinidade e do clima ambiental (LICHTSTEIN et al., 1991).

O veneno das espécies de sapo do gênero *Phyllobates* ficou historicamente conhecido por seu uso por tribos indígenas da Amazônia Colombiana, uma vez que envenenavam as extremidades dos dardos das zarabatanas para a prática da caça (HICKMAN JÚNIOR et al., 2009). Batracotoxina [BTX **(1)**, **Figura 3**] de *Phyllobates* *terribilis* e *P. bicolor*, responsável pela paralisia e morte, é uma das mais poderosas toxinas encontradas na natureza. É um alcalóide que se liga ao canal de Na^+ e causa persistente ativação do potencial de repouso da membrana das células excitáveis por meio de um mecanismo que bloqueia o canal de sódio e causa mudança de voltagem para potenciais mais negativos. Cerca de 2 mg/kg de peso corporal é uma dose letal, cujo valor é equivalente a dois grãos de sal. Apenas um sapo possui BTX suficiente para matar 8 indivíduos (CATTERALL et al., 2007). BTX e Bufalina **(2)** (**Figura 3**) inibem a propagação do estímulo doloroso (KRENN; KOPP, 1998; BOSMANS et al., 2004). Comparativamente, as propriedades analgésicas do alcalóide Epibatidina **(3)** (**Figura 3**) isolada a partir de *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae) são consequências biológicas da sua ligação a receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina (DALY et al., 2004; FITCH et al., 2010).

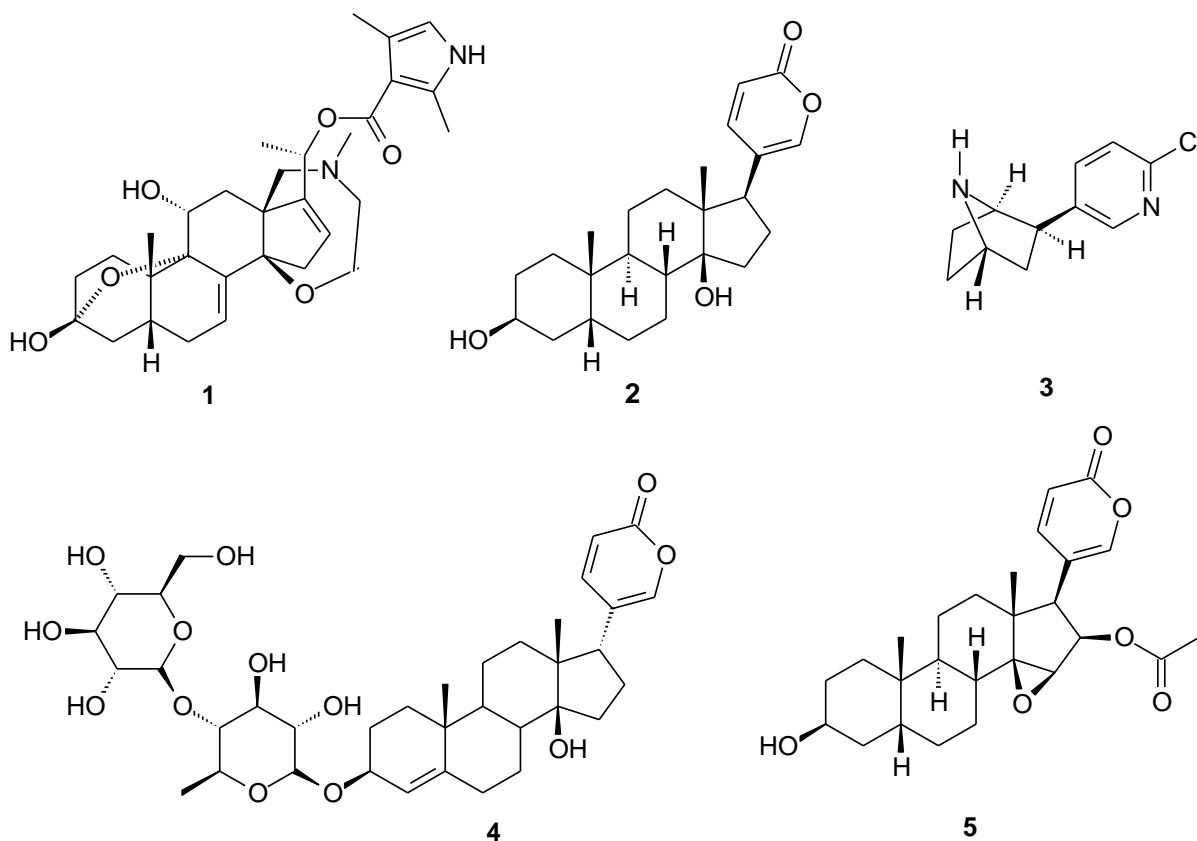


Figura 3 – Moléculas dos venenos de sapos historicamente relacionadas. Batracotoxina (1). Bufalina (2). Epibatidina (3). Cilareno A (4). Cinobufagina (5). Fonte: Arquivos pessoais.

Cerca de 28 classes estruturais de alcalóides são conhecidas em venenos de sapos. Do ponto de vista ambiental, a maioria deles funciona como uma defesa química contra predadores. Argumenta-se que algumas espécies não sintetizam seus venenos, mas sequestram substâncias químicas de artrópodes, como formigas, centopéias e ácaros - a hipótese da dieta-toxicidade (DALY et al., 1994; DARST et al., 2005). Assim, os animais criados em cativeiro não possuem níveis significativos de toxinas, uma vez que eles não contêm alcalóides seqüestrados por membros selvagens. Acredita-se que o comportamento materno de algumas espécies em depositar ovos não fertilizados, que contenham alcalóides, para alimentar os girinos se deve possivelmente ao fato das glândulas cutâneas (locais de armazenamento de alcalóides) amadurecem antes da metamorfose, indicando a introdução de venenos em um estágio prematuro do desenvolvimento do embrião, como visto com dendrobatídeos. As glândulas aumentam ao longo do desenvolvimento, particularmente na maturidade sexual. No entanto, alguns predadores demonstraram a capacidade de superar a toxicidade de venenos, como o *Leimadophis epinephelus* (Colubridae), uma cobra nativa da floresta amazônica

que desenvolveu imunidade ao veneno (SAPORITO et al., 2007; STYNOSKI et al., 2014).

2.1 A diversidade química dos venenos está em risco de extinção?

Detalhando esta pergunta: Seria uma primordial fonte de moléculas com propriedades fármaco-similar (*drug-like*) e arranjo estrutural em risco de aniquilação?

As alterações climáticas globais (por exemplo, o aquecimento) e muitos outros fatores responsáveis pelos eventos de extinção, como epidemias de doenças infecciosas e modificação de habitats, estão diretamente relacionados com as atividades humanas. Nas últimas três décadas, os anfíbios têm recebido considerável atenção devido a uma maior proporção de espécies em risco de extinção comparadas as de outros táxons (STUART et al., 2004).

Em relação aos anfíbios, há muitas razões pelas quais eles podem ser vulneráveis aos atuais problemas ambientais. Seu ciclo de vida envolve o desenvolvimento aquático de ovos e larvas e atividade terrestre como adultos, expondo-os a uma ampla gama de circunstâncias: i) larvas de sapo são herbívoros, enquanto adultos são carnívoros, submetendo-os assim a uma grande diversidade de alimentos, predadores e parasitas; ii) a respiração cutânea é mais importante do que a troca de gás pulmonar de CO₂ e O₂; iii) sua pele bem vascularizada coloca-os em contato direto com o ambiente, tornando-os anfíbios vulneráveis a alterações na qualidade da água ou do ar resultantes de diversos poluentes; e iv) são animais poiquilotérmicos, tornando-os mais sensíveis às mudanças de temperatura ambiental, especialmente para espécies tropicais que experimentam pouca variação de temperatura. Então, a maioria das espécies possui fraca capacidade de aclimação após rápidas flutuações ambientais. Assim, a Avaliação Global de Anfíbios (*Global Amphibian Assessment*) acredita que 20 a 30% das espécies conhecidas de anfíbios estão "globalmente ameaçadas" e 43% das espécies têm populações em declínio, particularmente aquelas das regiões tropicais e 785 estão extintas (STUART et al., 2004; WAKE; VREDENBURG, 2008).

A perda de espécies significa necessariamente um desaparecimento irreparável de compostos não descobertos com potencial para Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de medicamentos pioneiros com potencial farmacológico notável? Alguns compostos são comumente encontrados em espécies distintas, mas

outros são específicos de uma espécie, devido a condições ambientais específicas, tais como temperatura, alimentação e adaptações morfológicas (DUELLMAN, 1992; TOLEDO; JARED, 1995; FERREIRA et al., 2013). Um sapo da Índia é tão distinto que foi colocado em uma nova família (BIJU; BOSSUYT, 2003) e uma salamandra da Coreia do Sul é o único membro asiático da família Plethodontidae (MIN et al., 2005). Assim, se a biodiversidade perdida é um prejuízo grave para a natureza e para os ciclos de vida, também reduz a miscelânea molecular bioativa e a possibilidade de utilização de ferramentas com finalidades terapêuticas inovadoras.

3 Bufadienólídeos e Cardenólídeos: ocorrência, síntese e mecanismos de citotoxicidade.

Os componentes químicos e propriedades farmacológicas das secreções das glândulas paratóides e pele dos membros da família Bufonidae tem sido estudados ao longo do tempo (CHEN; CHEN, 1933). Os egípcios são considerados a primeira civilização a utilizar cila (*Scilla maritima*), uma planta que contém o composto cilareno A (**4, Figura 3**). Este foi o primeiro bufadienólídeo identificado cuja estrutura foi elucidada em 1933 e explorada em distúrbios cardíacos. As culturas asiáticas (os chineses foram os primeiros) manipulam diferentes secreções de pele de sapo para preparar medicamentos populares (KRENN; KOPP, 1998). *Chan'Su*, o veneno seco do sapo *Bufo bufo gargarizans* e do *Bufo melanostictus*, é distribuído em várias regiões chinesas e outros países asiáticos e extensivamente utilizado devido as suas propriedades anestésicas, anti-inflamatórias, cardiotônicas, diuréticas e hemostáticas. Bufalina (**2**) e cinobufagina (**5**) (**Figura 3**) são dois importantes bufadienólídeos componentes do *Chan'Su*, os quais tem sido amplamente usados na terapia clínica do câncer na China (STEYN; HEERDEN, 1998; YE et al., 2004; LI et al., 2015).

Todos os bufadienólídeos são esteróides com 24 átomos de carbono polihidroxiados sob a forma livre ou conjugada na posição C-3 com sulfatos, ésteres dicarboxílicos e aminoácidos, formados a partir do colesterol e caracterizados por conter um anel lactona insaturado e um grupo 2-pirona ligado na posição C-17 do núcleo peridrofenantreno (**6, Figura 4**) (TOLEDO; JARED, 1995; STEYN; HEERDEN, 1998; NOGAWA et al., 2001; BICK et al., 2002; DMITRIEVA et al., 2000; XU-TAO et al., 2009; YANG et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; CÓRDOVA et al., 2016).

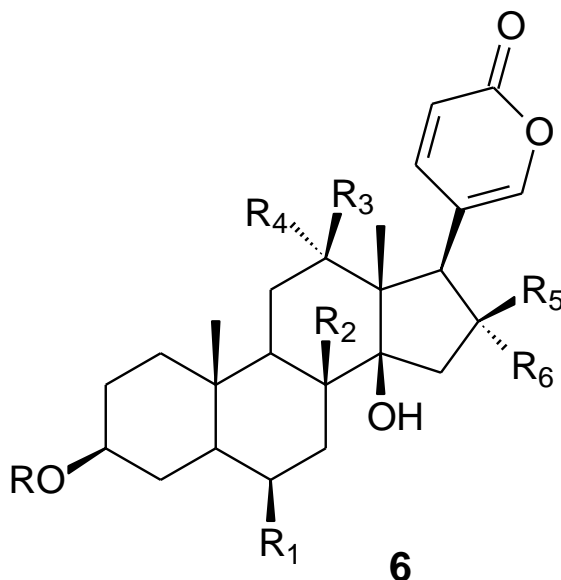


Figura 4 – Estrutura química geral dos Bufadienólídeos.

Foram identificados cerca de 250 bufadienólídeos a partir de plantas (famílias Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae e Santalaceae) e animais, tais como *Rhinella* (anteriormente *Bufo*), *Rhaebo* e *Peltophryne*, cobras (*Rhabdophis tigrinus*) e artrópodes (*Photinus*) (EISNER et al., 1978; KRENN; KOPP, 1998; HUTCHINSON et al., 2007; CUNHA-FILHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; CÓRDOVA et al., 2016). A grande variedade de compostos conhecidos é principalmente devido ao número e a posição dos substituintes (MENG et al., 2001; LENAERTES et al., 2013). Os estudos da relação estrutura-atividade destes compostos têm demonstrado atividade cardiotônica (IMAI et al., 1965; LICHTSTEIN et al., 1991; FEDOROVA et al., 1997; HAUCK; FRISHMAN, 2012), antiviral (KAMANO et al., 1988; WANG et al., 2011), citotóxica (CUNHA-FILHO et al., 2010; GAO et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; SCIANI et al., 2013), antibacteriana (CUNHA-FILHO et al., 2005), antiparasitária (TEMPONE et al., 2008), inseticida (SUPRATMAN et al., 2000), antiangiogênica, hipertensiva, imunossupressora e anti-endometriose (CUNHA-FILHO et al., 2010).

Em plantas e algumas classes de animais (por exemplo, répteis), bufadienólídeos e cardenólídeos têm fontes similares, uma vez que as células de tais organismos os sintetizam por meio da via independente do mevalonato. A condensação de acetil-CoA e acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é catalisada pela enzima HMG-CoA sintase. HMG-CoA é

irreversivelmente reduzida por uma redução enzimática com nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH + H⁺) na presença de água, obtendo-se ácido (R)-mevalônico, que é convertido em pirofosfato de isopentenila ativo ou isopreno (C5), a unidade básica de terpenos. Portanto, terpenos também são designados como isoprenóides (BLOCH, 1992; ZOGRAFOS, 2016). Pirofosfato de isopentenila isomeriza na presença de uma isomerase contendo grupos SH a pirofosfato de dimetilalila. O grupo CH alílico eletrofílico de pirofosfato de dimetilalila e o grupo metileno nucleofílico do pirofosfato de isopentenila ligam-se para formar pirofosfato de geranila como monoterpene (C10). A reação de difosfato de geranila com um equivalente de difosfato de isopentenila produz difosfato de farnesila como um sesquiterpene (C15). Pirofosfato de geranila como um diterpene (C20) surge a partir da ligação da “cabeça” nucleofílica de pirofosfato de isopentenila com a “cauda” de pirofosfato de farnesila. A síntese de sesterpenos (C25) envolve uma ligação cabeça-cauda de pirofosfato de isopentenila (C5) com pirofosfato de geranilgeranila (C20). Uma ligação cauda-cauda de dois equivalentes de pirofosfato de farnesila leva a formação de esqualeno como triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). A partir de esqualeno, cicloartenol origina colesterol como um precursor de esteróides (C21), o qual será utilizado como substrato para síntese de cardenolídeos (C23) e bufadienolídeos (C24) (BLOCH, 1992; ADAM et al., 2002; ZOGRAFOS, 2016).

A análise do perfil cromatográfico de extratos dos venenos de espécimes machos e fêmeas coletados de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* no sul da Amazônia revelou quatro bufadienolídeos em *R. marina* [bufalina (**2**), telocinobufagina (**7**), marinobufagina (**8**) e resinobufogenina (**9**), **Figura 5**] e um bufadienolídeo nos extratos de veneno de *R. guttatus* (marinobufagina).

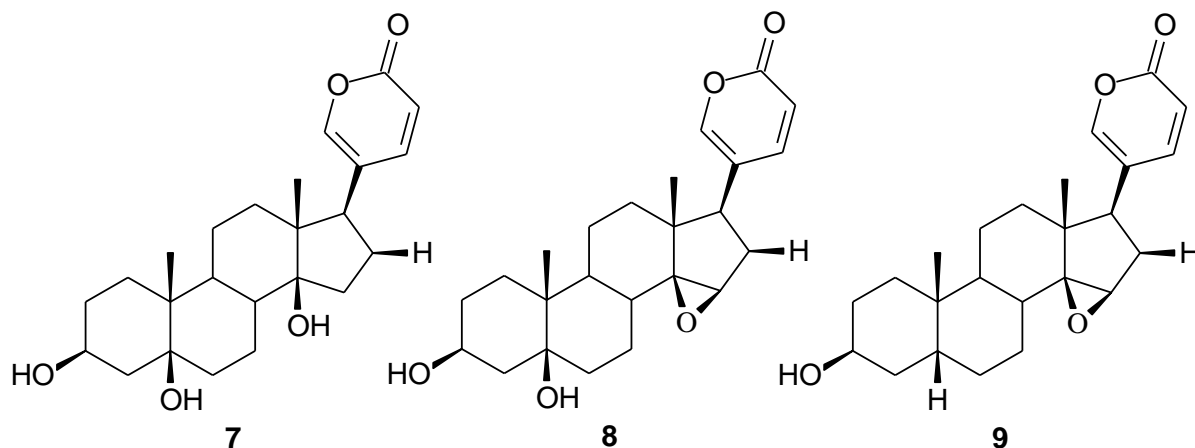


Figura 5 – Bufadienólídeos comumente encontrados no extrato do veneno de *Rhinella marina*. Telocinobufagina (7). Marinobufagina (8). Resinobufogenina (9). Fonte: Arquivos pessoais.

Em mamíferos, os esteróides também são derivados do colesterol e a tradicional biossíntese de esteróides biologicamente ativos começa por meio da clivagem da cadeia lateral do colesterol pela enzima CYP11A1 do citocromo P450 e consequente conversão em pregnenolona, embora esta via não esteja diretamente envolvida na biossíntese da marinobufagina (DMITRIEVA et al., 2000; PAYNE; HALES, 2004; MURRELL et al., 2005). Esteroidogênese adicional, que também produz marinobufagina endogêna (8), por exemplo, inclui via cascata de síntese dos ácidos biliares iniciada pela enzima CYP27A1, mas não pela CYP11A1. O silenciamento do mRNA do CYP27A1 por siRNA (pequenos RNAs de interferência) em culturas de células adrenocorticais reduziu os níveis de ácidos biliares totais e os níveis de marinobufagina, indicando a participação da via de síntese dos ácidos biliares na produção de marinobufagina (THOMAS et al., 2008; UNO et al., 2014; FEDOROVA et al., 2015).

3.1 Análise de citotoxicidade

A análise da citotoxicidade por ensaios de tetrazólio tem sido utilizada em programas de rastreio de alto rendimento (*High-Throughput Screening* - HTS) para selecionar substâncias com ação antineoplásica, devido à sua rapidez, sensibilidade e baixo custo (MOSMANN, 1983; BERRIDGE et al., 1996; FERREIRA et al., 2013; MONÇÃO et al., 2015). Estes métodos analisam a viabilidade celular e

o estado metabólico com base na conversão de sal (MTT, XTT, MTS, WST-1) em formazan por enzimas mitocondriais (tais como succinil desidrogenase) presentes apenas em células viáveis. Estudos citotóxicos por este método permitem facilmente avaliar a viabilidade, mas não indica o mecanismo de ação pelo qual atua a substância (BERRIDGE et al., 1996; NILES et al., 2008). Alguns extratos de veneno de *R. marina* e *R. guttatus* foram avaliados por ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio] e revelaram atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais humanas, especialmente aquelas dos extratos de *R. marina*, cujos valores CI_{50} foram semelhantes aos obtidos com a doxorrubicina (**Tabela 1**), um fármaco amplamente utilizado em ensaios clínicos contra carcinomas de mama e cólon. Assim, todos os extratos do veneno de *R. marina* revelaram maior ação citotóxica quando comparados com os de *R. guttatus*, com valores de CI_{50} que variaram de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (HL-60, leucemia promielocítica) a 0,23 $\mu\text{g/mL}$ (OVCAR-8, carcinoma do ovário) (FERREIRA et al., 2013). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer Americano (NCI-EUA), extratos com valores de CI_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/ml}$ são considerados promissores para estudos de purificação de moléculas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Tabela 1 - Potencial hemolítico de extratos de veneno de sapos e atividade citotóxica em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de acordo com Ferreira et al. (2013).

Extrato	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$ **	Seletividade***
	Eritrócitos humanos	CMSP	
RMF-1	> 200	0.8 (0.6 – 0.9)	80
RMF-2	> 200	0.5 (0.3 – 0.7)	10
RMF-3	> 200	0.4 (0.2 – 0.6)	40
RMF-4	> 200	0.3 (0.2 – 0.4)	30
RMM-5	> 200	1.1 (0.5 – 2.4)	15.6
RGF-6	33.7 (28.1 – 40.5)	0.8 (0.6 – 0.9)	0.3
RGF-7	30.8 (27.7 – 34.2)	16.0 (10.6 – 24.3)	3.5
RGF-8	20.8 (15.8 – 27.4)	13.1 (11.1– 15.4)	3.6
RGM-9	27.9 (22.8 – 34.3)	13.9 (11.0 – 17.6)	2.8

Rhinella marina fêmea / macho (RMF / RMM); *Rhaebo guttatus* fêmea / macho (RGF / RGM).

* Os dados são apresentados como valores de CE_{50} e intervalo de confiança de 95% para eritrócitos humanos, após 1 h de exposição. Triton x-100 (1%) foi utilizado como controle positivo.

** Os dados são apresentados como valores de CI_{50} e intervalo de confiança de 95% para CMSP após 72 h de exposição. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

*** Coeficiente de seletividade determinada pela CI_{50} em PBMC / CI_{50} em células HL-60.

Os extratos etanol/clorofórmico (8:2) de *R. marina* e *R. guttatus* mostraram baixa citotoxicidade nas células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP) isoladas de voluntários adultos saudáveis com idades entre 18 e 35 anos, não-fumantes e que não usaram qualquer medicamento durante pelo menos 15 dias antes da coleta. Alguns extratos foram até 80 vezes mais seletivos contra células leucêmicas, quando comparado com leucócitos normais em divisão (FERREIRA et al., 2013), uma vantagem muito desejada para novas moléculas alvo anticancerígenas. Recentemente, o extrato etanólico obtido da pele e das glândulas paratípidas de *Bufo bufo gargarizans* Cantor mostrou promissora citotoxicidade contra células cancerígenas (MCF-7, Jurkat T e A-549), confirmados por eletroforese em gel de célula única (Ensaio do cometa), ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) e conteúdo sub-G₁ de DNA, demonstrando leves efeitos sobre a viabilidade de CMSP (LEE et al., 2014).

No contexto da terapia antineoplásica, a avaliação do potencial toxicológico sobre as células normais recebeu grande atenção devido aos efeitos adversos que estão frequentemente relacionados com uma estreita janela terapêutica, resistência à múltiplas drogas e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas. Dessa forma, torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, especialmente em pacientes em estágios avançados, quando os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios e aumento da sobrevivência não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (ANAZETTI et al. 2003; KAMB, 2005; SOUZA et al. 2007; SANTOS et al., 2010). Cunha-Filho et al. (2010) e Sciani et al. (2013) não identificaram atividade hemolítica em secreções da pele dos anfíbios de *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri* e *R. major* na concentração de 50 µg/mL, sugerindo que o mecanismo de citotoxicidade está provavelmente relacionado com uma forma mais específica e não está associada com o dano direto à membrana, embora a ruptura da membrana celular foi demonstrada após 1h de incubação em extratos de *R. jimi*, *R. margaritifer*, *R. guttatus* e *Phyllomedusa hipocondrialis*. Resultados divergentes foram vistos com extratos do veneno de *R. guttatus*, ao passo que todos eles exibiram potencialidade hemolítica (FERREIRA et al., 2013), um achado contraditório quando comparado com o descrito por Sciani et al. (2013), que reportou injúrias à membrana, provavelmente a diferença está correlacionada com a gama de concentrações utilizadas.

Em estudos antitumorais *in vitro* realizados com espécies do gênero *Rhinella* e *Rhaebo* (*B. melanosticus*, *R. schneideri*, *R. marina*, *R. margaritifer*, *R. hipocondrialis*, *R. major*, *R. crucifer* e *R. jimi*), incluindo as secreções da pele e seus componentes, tais como bufotalina (10), helebrina (11), epoxi-marinobufagina (12), bufalina (2), 3 β -acetoxi-bufalina (13), helebregenina (14), helebregenina 3-acetato (15), marinobufagina (8), marinobufagina 3-acetato (16), cinofagina (17), telocinobufagina (7), 3 β -acetoxi-marinobufagina (18), 3 β -acetoxi-telocinobufalina (19) e gamabufotalina ramnosídeo (20) (Figura 6), alcalóides, derivados metabólicos e bufadienolídeos isolados do medicamento tradicional da China, *Chan'Su*, mostraram atividade contra diversas linhagens tumorais humanas, tais como cólon (26-L5), leucemias (K-562, U-937 ML-1, Jukart T, HL-60), melanoma (MDA/MB-435, SKMEL-28), mama (MCF-7, MDA/MB-231), glioblastoma (U-373), oligodendroglioma (Hs-683), adenocarcinoma de estômago (AGS), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP), bexiga (BIU-87, J82), osteossarcoma (MG-63), carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma de pulmão (A-549, SK-MES-1) e carcinoma primário de fígado (PLC/PRF/5) (ZHANG et al., 1998; NOGAWA et al., 2001; OGASAWARA et al., 2001; KAMANO et al., 2002;. YEH et al., 2003; SU et al., 2009; CUNHA-FILHO et al., 2010; QI et al., 2011; SCIANI et al., 2013; BANULS et al., 2013a; LEE et al., 2014; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014; WANG; BI, 2014).

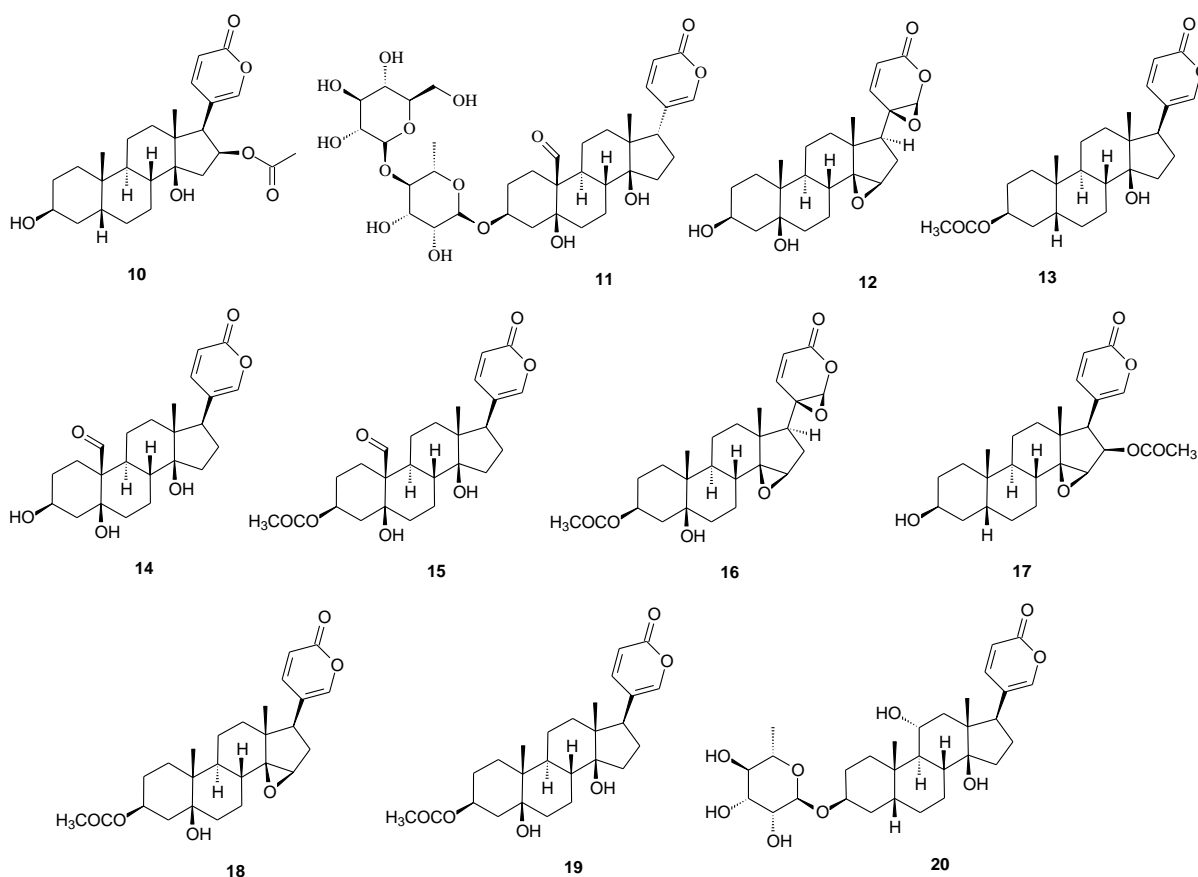


Figura 6 - Alguns compostos isolados a partir das secreções da pele de espécies *Rhinella* e *Rhaebo*. Bufotalina (**10**). Helebrina (**11**). Epoxi-marinobufagina (**12**). 3β -acetoxi-bufalina (**13**). Helebregenina (**14**). Helebregenina 3-acetato (**15**). Marinobufagina 3-acetato (**16**). Cinofagina (**17**). 3β -acetoxi-marinobufagina (**18**). 3β -acetoxi-telocinobufalina (**19**). Gamabufotalina ramnosídeo (**20**). Fonte: Arquivos pessoais.

3.2 Cardenólídeos e bufadienólídeos são capazes de bloquear Na^+/K^+ -ATPase em células tumorais e normais?

Uma vez que esteroides cardiotônicos (cardenólídeos e bufadienólídeos) ligam-se especificamente às subunidades da Na^+/K^+ -ATPase, acredita-se que a ativação de morte celular pelos bufadienólídeos está associada à inibição dessa bomba (NEWMAN et al., 2008; GAO et al., 2011).

Os cardiotônicos são esteroides que se distinguem por interagir com a principal proteína transportadora das células eucarióticas, a bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+ -ATPase). Esta bomba é uma proteína heterodimérica integrante da membrana plasmática com duas subunidades [α (subunidade catalítica) e β (subunidade regulatória)], pertencentes à família das ATPases do tipo P e

conservadas em células eucarióticas (invertebrados, vertebrados e protozoários) (BAGROV et al., 2009; MIJATOVIC et al., 2012). Existem quatro isoformas da subunidade α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) e três isoformas da subunidade β (β_1 , β_2 e β_3), o que aumenta a diversidade funcional da Na^+/K^+ -ATPase (LINGREL, 2010). Associadas a estas subunidades, existem proteínas de membrana pertencentes à família FXYD, e pelo menos cinco dos sete membros desta família (tipos FXYD 1, 2, 3, 4 e 7) são subunidades auxiliares de Na^+/K^+ -ATPase e regulam a atividade de Na^+/K^+ -ATPase via tecido-específico e isoforma específica, explicando, pelo menos em parte, a alta complexidade da regulação dos níveis de Na^+ e K^+ pela bomba em várias situações fisiológicas ou patológicas (por exemplo, reabsorção renal de Na^+ , contratilidade muscular e excitabilidade neuronal) (GEERING, 2006; LINGREL, 2010).

Na^+/K^+ -ATPase funciona como um transportador eletrogênico de íons Na^+ e K^+ entre os meios extracelular e intracelular (conservando o potencial de membrana celular), executa transporte de nutrientes e aminoácidos acoplados ao Na^+ e mantém equilíbrio osmótico e a regulação do volume celular. A regulação da Na^+/K^+ -ATPase em tecidos humanos é controlada por hormônios como a aldosterona, hormônio da tireóide, catecolaminas e insulina. A regulação de longo prazo exercida pelo hormônio da tireóide e aldosterona é mediada por alterações na expressão gênica, enquanto que a regulação de curto prazo exercida pelas catecolaminas é mediada por fosforilação reversível da subunidade catalítica da bomba. Devido à versatilidade de transdução de sinais, ainda participa na adesão celular, expressão protéica anormal e no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de cânceres (EWART; KLIP, 1995; AIRES, 2011; MIJATOVIC et al., 2012.; BAÑULS et al., 2013b).

A ouabaína (**21**, **Figura 7**) tem quase 1000 vezes menos afinidade à Na^+/K^+ -ATPase de roedores quando comparada à bomba de células humanas, provavelmente devido à presença de mutações na porção extracelular da subunidade α . Esta descoberta nos ajuda a compreender a sensibilidade aproximadamente 1000 vezes menor de células de camundongos aos esteroides cardiotônicos (MIJATOVIC et al.; 2007; YANG et al.; 2009). Algumas linhagens humanas tumorais de gliomas (HFU-251, U-251) e melanoma (BRO) que mostraram maior capacidade para formar colônias apresentaram maior expressão da subunidade α_1 da Na^+/K^+ -ATPase, sugerindo que essa subunidade está envolvida no crescimento tumoral e na sobrevivência celular. Esta subunidade se apresenta

superexpressa em carcinoma de não pequenas células, gliomas, melanomas e cânceres renais, enquanto a subunidade α_3 foi encontrada superexpressa em carcinomas de cólon (LEFRANC et al., 2008; YANG et al., 2009; MIJATOVIC et al., 2012). Assim, alguns estudos demonstraram ação relativamente mais seletiva sobre as células tumorais, porque estas células apresentam maior expressão e atividade catalítica de Na^+/K^+ -ATPase.

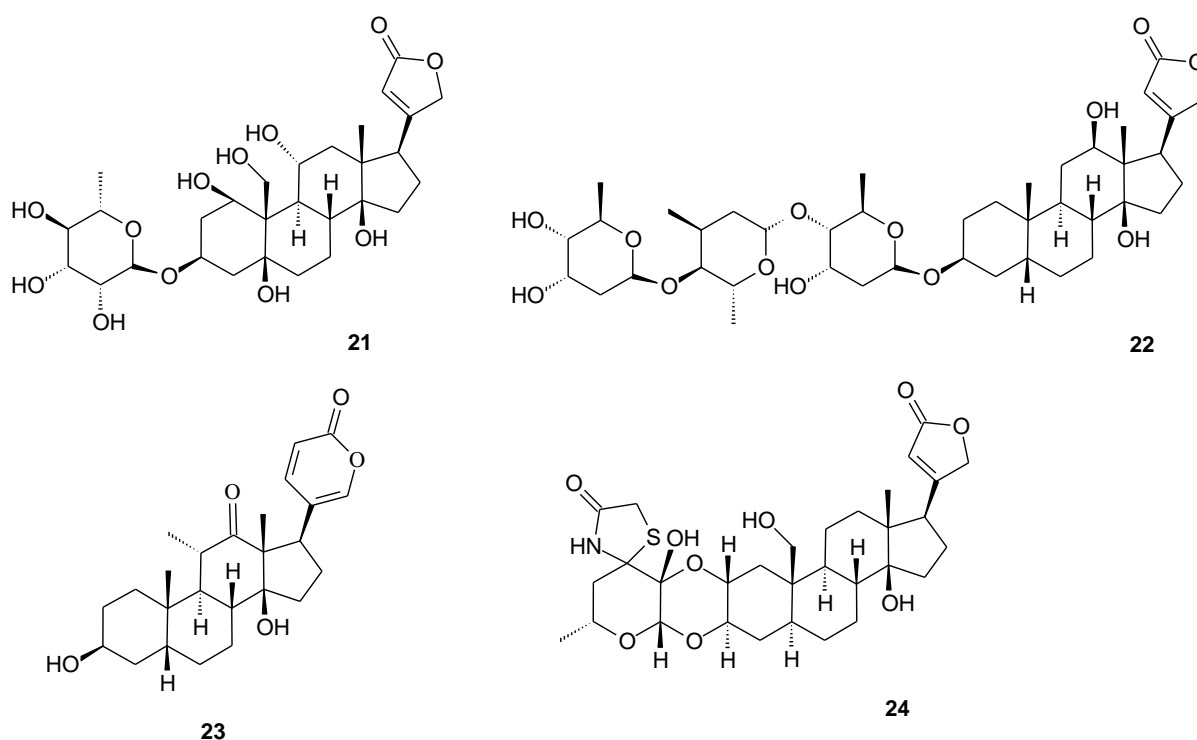


Figura 7 – Esteróides Cardiotônicos. Ouabaína (21). Digoxina (22). Arenobufagina (23). 19-hidroxi-2-oxovoruscarina (24). Fonte: Arquivos pessoais.

Recentemente, a arenobufagina (**23**) foi o primeiro bufadienólídeo isolado de venenos de bufonídeos endêmicos das Antilhas, especificamente da espécie *Peltophryne fustiger*. Foi capaz de inibir Na^+/K^+ -ATPase em níveis semelhantes à bufalina (**2**) e telocinobufagina (**7**) (TOUZA et al., 2011; LAURSEN et al., 2015). Laursen et al. (2015) também definiu a estrutura do complexo constituído por bufalina- Na^+/K^+ -ATPase de rim suíno na presença de K^+ , cuja estrutura é semelhante aos complexos de digoxina- e ouabaína- Na^+/K^+ -ATPase. Estes achados sugerem um mecanismo semelhante para inibição da Na^+/K^+ -ATPase por cardenólídeos e bufadienólídeos. A substituição na posição C-14 da bufalina por

radical hidroxila contribui para formação de ligações estáveis no complexo enzimático suíno. Em relação ao grupo lactona, este alcança mais profundamente no sítio de ligação catiônica da enzima suína do que ouabaína e digoxina (LAURSEN et al., 2015). Tal forma de ligação da molécula bufalina indicou a relevância da hidroxila em C-14 e da lactona de seis membros para inibir a Na^+/K^+ -ATPase suína, a qual apresenta 98,1% de homologia com a enzima humana. Dessa forma, a inibição da enzima renal humana por bufalina, telocinobufagina e arenobufagina provavelmente tem um mecanismo de ação semelhante. Certamente, demonstraram ação seletiva relativamente melhor em células tumorais, porque têm maior expressão e atividade catalítica de Na^+/K^+ -ATPase (BAÑULS et al., 2013b).

Estudos específicos também demonstraram que muitos esteroides cardiotônicos são: i) capazes de sensibilizar células cancerígenas resistentes à apoptose a estímulos pró-apoptóticos; ii) induzir apoptose em células leucêmicas e linfomatosas; iii) causar a morte de células tumorais por meio de inibição de Src- ou MAPK, indução da expressão de p53, inibição da síntese proteica, síntese geral de HIF-1a e autofagia irreversível; iv) superar o fenótipo MDR (resistente a múltiplos fármacos) (DINARA et al., 2003; JOHNSON et al., 2002; FRESE et al., 2006; ZHANG et al., 2008; LEFRANC et al., 2008; PERNE et al., 2009; SIMPSON et al., 2009; WANG et al., 2009; DONG et al., 2011; JUNCKER et al., 2011). De fato, enquanto a ouabaína ativa o fenótipo MDR, a 19-hidroxi-2-oxovoruscarina (**24**), helebrina (**11**) e helebrigenina (**14**) exibem semelhante e marcada atividade anticâncer em células tumorais quimiossensíveis contra MDR. Helebrina (**11**) e helebrigenina (**14**) exibem seletividade para subunidade α_1 da Na^+/K^+ -ATPase, apresentando 2 vezes maior afinidade para α_1 do que para as subunidades α_2 e α_3 (MIJATOVIC et al., 2012; BAÑULS et al., 2013b). Além disso, estudos prévios também mostraram que 19-hidroxi-2-oxovoruscarina e gamabufotalina ramnosídeo/gamabufotalina e helebrina/helebrigenina diminuem a $[\text{ATP}]_i$ em linhagens cancerígenas, enquanto que os efeitos mais fracos foram observados em células normais (LEFRANC et al., 2008; MIJATOVIC et al., 2012; BAÑULS et al., 2013b).

Bañuls et al. (2013b) apresentou gamabufotalina ramnosídeo (**20**) como 100 vezes mais potente contra linhagens de células tumorais (Hs-683, MCF-7, PC-3, A-549, U-373, SKMEL-28; valores de CI_{50} menores que $1\ \mu\text{M}$) em comparação com os cardenólídeos ouabaína (**21**) e digoxina (**22**) ($\text{CI}_{50} > 10.000\ \mu\text{M}$) (**Figura 7**). Por outro lado, os compostos bufotalina (**10**) e helebrina (**11**) foram mais ativos que

ouabaína e digoxina, porém aproximadamente 10 vezes menos citotóxicos que o gamabufotalina ramnosídeo. Essa molécula foi o único composto com potencial citotóxico contra linhagens neoplásicas murinas [CT26.WT (cólon), B-16/F-10 (melanoma)] com valores de CI_{50} consideravelmente maiores (877 e 659 μM), um achado interessante que enfatiza a ação antiproliferativa dos bufadienolídeos em células humanas e sua ausência ou baixa citotoxicidade em células de camundongos.

Os esteróides do tipo digitálicos podem desempenhar um papel hormonal e/ou modulador do sistema nervoso e cardiovascular e estão envolvidos em achados fisiológicos de hipertensão (MANUNTA et al., 2001). Por exemplo, foram detectados altos níveis de marinobufagina (**8** - 3β , 5β -dihidroxi-14,15-epoxibufadienolídeo - também chamada de marinobufagenina) em estados de hipertensão, doenças cardíacas e em pacientes com insuficiência renal e que exibe uma maior afinidade para a subunidade $\alpha 1$ da Na^+/K^+ -ATPase resistente à ouabaína, a principal isoforma da bomba de sódio encontrada nos túbulos renais (FEDOROVA et al., 1997; HAUCK; FRISHMAN, 2012). Por outro lado, a resibufagenina é conhecida por diminuir hipertensão em modelos animais durante quadros de pré-eclâmpsia (VU, 2006).

É possível que a marinobufagina (**8**) não apenas participe da regulação da pressão sanguínea, mas também da indução de fibrose cardíaca e vascular, característica do envelhecimento cardiovascular, hipertensão resistente e doença renal crônica. A administração de anticorpos monoclonais anti-marinobufagina em modelos de hipertensão sal-sensível reduz a pressão sanguínea, reverte a inibição de Na^+/K^+ -ATPase induzida por pré-eclâmpsia, e reverte potencialmente a fibrose cardíaca em ratos urêmicos, todas as condições de quando os níveis de marinobufagina estão aumentados (KENNEDY et al., 2006; FEDOROVA et al., 2008; AIRES, 2011; KOLMAKOVA et al., 2011; HALLER et al., 2012).

Apesar dos bufadienolídeos, ligandos da bomba de sódio, surgirem como alvos terapêuticos potencialmente importantes, ratos hipertensos sal-sensíveis apresentaram aumento dos níveis plasmáticos e adrenocorticais de marinobufagina (**8**), o que foi acompanhado pela inibição da Na^+/K^+ -ATPase e elevação da pressão arterial. A angiotensina II estimula a produção de marinobufagina por células do córtex adrenal e a adrenalectomia em roedores diminuiu a imunorreatividade similar à digoxina plasmática e os níveis de marinobufagina, estabelecendo as glândulas

supra-renais como a principal fonte de marinobufagina e de outros esteróides cardiotônicos em mamíferos (FEDOROVA et al., 2002; FEDOROVA et al., 2005; KENNEDY et al., 2006; ELKAREH et al., 2007). A marinobufagina também pode estar relacionada com a dependência ao etanol, pois atenuou a busca por álcool por meio da interação com Na^+/K^+ -ATPase no córtex cerebral de modelos animais (KASHKIN et al., 2002).

O silenciamento pós-transcricional do gene CYP27A1 em trofoblasto humano e células adrenocorticais de rato reduziu a expressão de RNAm de CYP27A1 em 70%, reduziu os níveis de ácidos biliares totais e os níveis de marinobufagina (**8**) em 67% quando comparados com células não tratadas ou transfectadas com siRNA não segmentado. Modelos experimentais *in vivo* Dahl-sal sensível, mostraram que ratos machos e fêmeas desenvolveram hipertensão após 4 semanas submetidos a uma dieta com elevado teor de NaCl. Os níveis plasmáticos de marinobufagina dobraram e a expressão de RNAm de CYP27A1 adrenocortical aumentou significativamente. Curiosamente, os níveis circulantes de marinobufagina foram 2 vezes menores em fêmeas do que em machos. Possivelmente, o menor nível circulante em fêmeas se deve a um mecanismo adaptativo pois, durante a gravidez, marinobufagina adicional é sintetizada na placenta. Esses achados explicam parcialmente como essa substância é sintetizada na placenta de mamíferos e no córtex adrenal a partir do colesterol por meio da via de síntese de ácidos biliares (FEDOROVA et al., 2015) e nos ajudam a entender o papel dos bufadienolídeos endógenos nas doenças cardiovasculares humanas.

3.3 Bufalina e Cinobufagina como moléculas promissoras

Estudos tem demonstrado que algumas secreções da pele obtidas a partir de *Rhinella crucifer*, *R. major*, *R. schneideri*, *R. margaritifer*, *Phyllomedusa hypocondrialis*, *Rhaebo guttatus*, *R. crucifer*, *R. margaritifer*, *R. major* and *P. Hypocondrialis* são uma fascinante fonte de bufalina (**2**), telocinobufagina (**7**), helebrina (**11**) e cinobufagina (**17**), substâncias que reduzem os níveis de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, diminuem a viabilidade celular e a síntese de DNA, além de causar alterações morfológicas (condensação da cromatina, fragmentação nuclear, retração do citoplasma, vacúolos citoplasmáticos, redução de aderência,

bolhas de membrana e corpos apoptóticos) em carcinomas de mama humano (MDA/MB-231 e MCF-7) (YEH et al., 2003; SCIANI et al., 2013).

Bufadienólídeos de *B. bufo gargarizans* - bufalina (**2**) e cinobufagina (**17**, sinônimo: cinobufacina) - induziram a morte de células HepG2 após 24h de exposição e causaram a redução da viabilidade celular e o aumento de células apoptóticas devido a liberação de citocromo *c*, despolarização mitocondrial, clivagem de PARP [poli(ADPribose)polimerase] e Bid, aumento dos níveis de Bax e redução dos níveis de Bcl-2, ativação das caspases -3, -9, -8 e -10 e aumento da expressão da proteína associada ao domínio de morte Fas (FADD) (QI et al., 2011).

Na medicina tradicional chinesa, *Chan'Su*, um extrato etanólico da pele e do veneno das glândulas paratíreas de *Bufo bufo gargarizans* Cantor e amplamente utilizado na terapia do câncer, apresenta como compostos majoritários a bufalina (**2**) e cinobufagina (**17**). Esse extrato exibiu resultados semelhantes sobre as linhagens tumorais MCF-7, A-549 e leucemia de células T (Jukart T) após 48 h de tratamento, incluindo a diminuição na viabilidade celular, aumento do percentual de células apoptóticas, ruptura dos filamentos de cadeia simples e dupla do DNA (detectadas pelo ensaio cometa) e indução da formação de micronúcleos (LEE et al., 2014). Hashimoto et al. (1997) mostraram que a bufalina é eficiente em inibir a topoisomerase II (Topo II), enzima responsável pela estabilização do complexo de clivagem do DNA e alvo de muitos fármacos antitumorais. A inibição da Topo II promove a fragmentação do DNA, um atributo importante para apoptose das células tumorais.

Bufalina (**2**) foi capaz de ativar caspases iniciadoras (-9), efetoras (-3) e aumentar os níveis da $[Ca^{2+}]_i$ em células cancerígenas de próstata (LNCaP, DU-145, and PC-3) após 24h de incubação (YEH et al., 2003). Quando administrada no modelo tumoral ortotópico de carcinoma hepatocelular humano (BEL-7402) em doses de 1,5 mg/kg, 1 mg/kg e 0,5 mg/kg, ela reduziu o crescimento do tumor (35,2, 49,8 e 83,9%), aumentou o tempo de sobrevivência em doses mais elevadas (1,5 mg/kg: 31,8%; 1 mg/kg: 29,4%), o índice de apoptose determinada por ensaio de TUNEL (10,6, 8,8 e 5,8%), a expressão do Bax (90, 80 e 80%) e reduziu as proteínas Bax (10, 10 e 20%, respectivamente), em tecidos tumorais de camundongos nude (HAN et al., 2007). Essa molécula também inibe a atividade migratória e invasiva do carcinoma de bexiga T24 em estudos *in vitro* (HONG et al., 2013), bem como a proliferação de adenocarcinoma de pulmão humano (A-549) por

indução da apoptose dose- e tempo-dependente, reduz a ativação de PI3K/Akt, regula a expressão de proteínas pro-apoptóticas e anti-apoptóticas e promove a ativação de caspase-3 (ZHU et al., 2012). De modo semelhante, em osteossarcoma humano (MG-63), a bufalina inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose de maneira dose- e tempo-dependente, efeitos justificados pela interrupção do potencial transmembrana mitocondrial, aumento das espécies reativas de oxigênio, *up-regulation* do Fator de ativação de protease apoptótica (Apaf-1), clivagem de PARP, ativação das caspase-3 e caspase-9 e aumento da relação Bax/Bcl-2 (WANG et al., 2014). A bufalina já tinha demonstrado efeitos inibidores sobre células endoteliais de aorta bovina, outro sinal sugestivo da sua atividade antiangiogênica (LEE et al., 1997).

A bufalina (**2**) causa apoptose nas células desse tecido de forma célula-específica e em um mecanismo distinto do que ocorre em diversas células tumorais (LEE et al., 1997). Análises toxicológicas revelaram que bufalina a 2 mg/kg causou convulsão transitória após 5 minutos da primeira administração intraperitoneal em metade dos animais e apatia de curto prazo após a segunda injeção, que foi restaurado ao normal a partir de 3 a 5 minutos depois. As reações adversas, mortes, alterações de peso, comportamento do apetite foram detectados nas doses inferiores (0,5 e 1,5 mg/kg) depois de 10 dias de administração (HAN et al., 2007). Curiosamente, Nasu et al. (2005) propuseram a utilização de bufalina como um agente terapêutico no tratamento da endometriose, uma condição que causa a proliferação exacerbada do tecido endometrial.

A cinobufagina (**17**) exibe significativa atividade antitumoral, incluindo a inibição da proliferação e diferenciação celular, indução da apoptose, parada do ciclo celular, inibição da angiogênese, reversão da resistência a múltiplos fármacos e regulação da resposta imune (ZHU; LIU, 2006). Em detalhes, induz a parada do ciclo celular nas fases G₂ e S na concentração de 200 µg/mL, inibiu a proliferação de células tumorais da bexiga (BIU-87) após 72h de incubação, reduziu a expressão de fatores antiapoptóticos (Bcl-2) e aumentou a transcrição de RNAm para caspase-3 e sua atividade catalítica (SU et al., 2009). Em um estudo pré-clínico, camundongos nude transplantados com carcinoma hepatocelular humano e tratados com a cinobufagina em associação com o trióxido de arsênio apresentaram ação sinérgica antitumoral com redução do número de vasos sanguíneos (efeito antiangiogênico) e

expressão de receptores dos fatores de crescimento endotelial vascular e epidérmico (VEGFr e EGFr, respectivamente) (LIU et al., 2011).

A cinobufagina (**17**) utilizada sozinha ou em combinação com outros agentes quimioterápicos (por exemplo, gencitabina e oxaliplatina) tem atividade antitumoral contra diversos tipos de cânceres humanos, como carcinoma hepatocelular, de pulmão, pâncreas e bexiga (CHEN et al., 2003; QIN et al., 2008; MENG et al., 2009). Estes estudos demonstraram a redução da taxa de crescimento tumoral, melhora na qualidade de vida e aumento do tempo de sobrevivência (NESHER et al., 2007). No caso de tumores hepáticos, o acompanhamento dos níveis de alfa-fetoproteína (α -FP) revelou quantidades superiores no grupo controle do que no grupo tratado com cinobufagina (CHEN et al., 2003). Essa proteína é normalmente formada por células hepáticas imaturas no feto. No nascimento, as crianças têm níveis relativamente altos desta proteína, que diminuem para níveis normais do adulto (inferior a 10 ng/mL) no primeiro ano de vida. O valor sérico associado à piora do prognóstico é de 200 ng/mL. Em adultos, níveis elevados (até 500 ng/mL) são encontrados em carcinomas hepatocelulares, tumores das células germinativas (testículos e ovários) e metástases hepáticas. Assim, a dosagem dessa proteína é o marcador tumoral mais amplamente utilizado para rastreamento e monitorização de carcinomas hepatocelulares. Níveis elevados da α -FP é fator de pior prognóstico em relação à agressividade da doença estando assim atrelada a tumores de diâmetros maiores e invasão vascular (ATAÍDE et al., 2011).

Os resultados acima descritos indicam que bufadienólídeos (por exemplo, bufalina e cinobufagina) podem induzir a apoptose por meio da ativação associativa da caspase-8, caspase-10 e receptor de morte Fas e disparo da caspase-9 por via mitocondrial. Assim, podem causar efeitos genotóxicos e morte celular por diferentes vias. A apoptose ocorre por duas vias gerais: extrínseca e intrínseca (**Figura 8**). Quando a via intrínseca é ativada, ocorre o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida da liberação de proteínas que estão normalmente localizadas no espaço intermembranar [citocromo *c*, fator de indução da apoptose, Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodide*), entre outros]. Assim, a permeabilização da membrana mitocondrial libera citocromo *c*, o qual se liga a Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) e forma um complexo multicatalítico chamado apoptossomo. Este complexo ativa a caspase-9 a partir de sua forma zimogênica

pró-caspase-9. Então, a caspase-9 cliva as caspases efetoras -3, -6 e -7, ativando-as para realizar a fragmentação do DNA. A caspase-3, a mais importante caspase efetora e uma enzima eficaz em clivar o DNA genômico entre nucleossomos, gera fragmentos de 180-200 pares de base (pb) e é capaz de degradar as proteínas do aparelho mitótico nuclear (por exemplo, laminina). Morfologicamente, as caspases e outras proteases ativadas durante a morte celular levam à condensação da cromatina, cariorréxis, rarefação e vacuolização citoplasmática e retração celular (KUMAR et al., 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A via de receptor de morte ou via extrínseca (**Figura 8**) envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor receptor* - rTNF). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana rTNF-1, FAS (CD95), TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma denominado de domínio de morte (*Death Domain* - DD) que contém uma sequência de 65 aminoácidos. Após a associação dos receptores de membrana ao seu correspondente DD, ocorre uma mudança conformacional nos receptores, o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora FAS que irá associar-se com o domínio de morte (DD) formando o FADD. Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a pró-caspase-8 (e cliva) e forma caspase-8 (MACFARLANE; WILLIAMS, 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; KRYSKO et al., 2008).

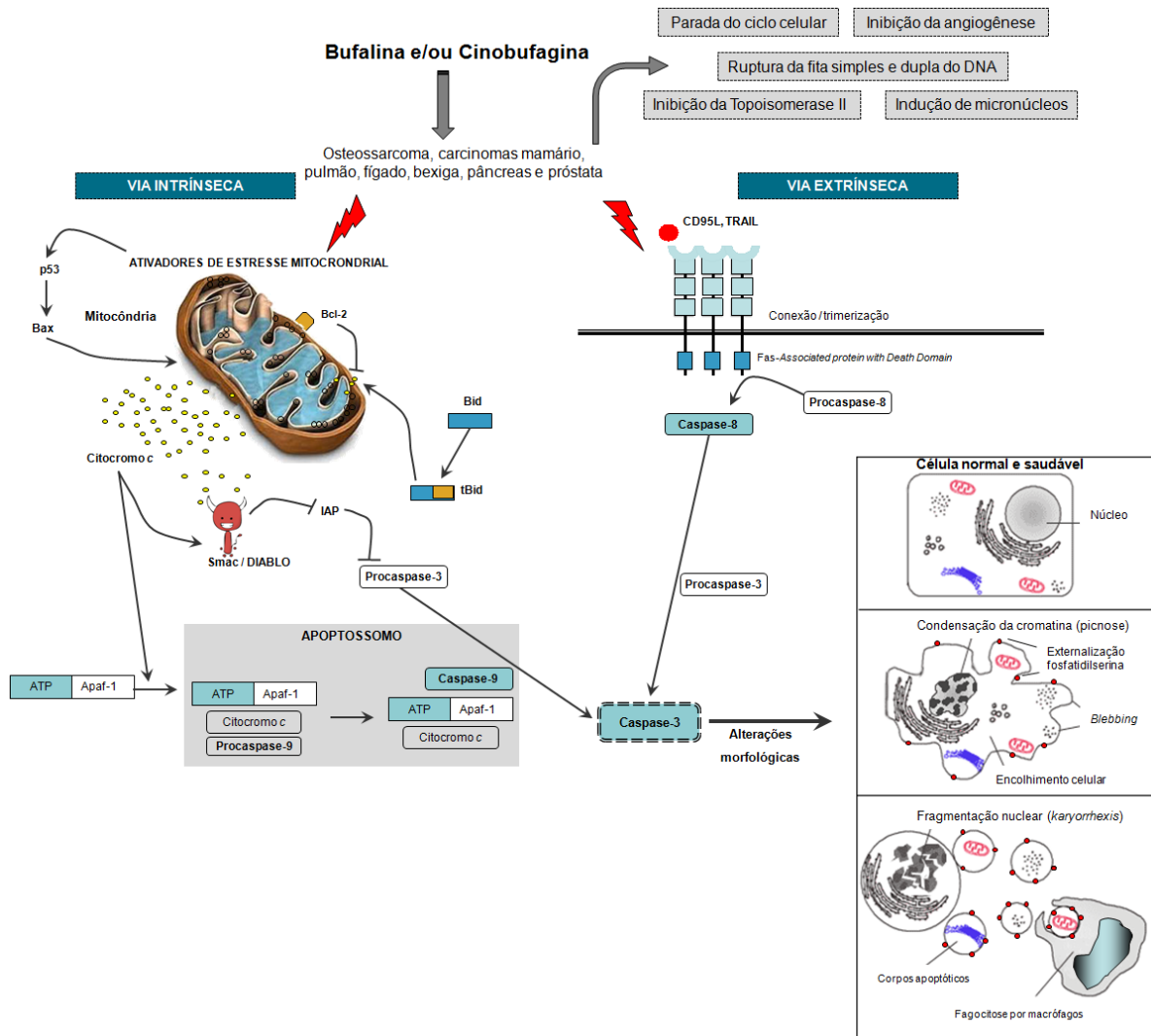


Figura 8 – Apresentação das principais vias de morte celular desencadeadas por dois bufadienolídeos conhecidos: bufalina e cinobufagina. Fonte: Adaptado de Mac Farlane e Williams (2004).

Além da caspase-3, as duas vias de ativação da apoptose podem estar interligadas através do Bid, uma proteína encontrada no citosol das células e que normalmente é clivada pela caspase-8, formando uma proteína truncada (tBid), a qual é translocada para a mitocôndria, onde ativa o Bax, iniciando a liberação do citocromo c e, conseqüentemente, a disfunção mitocondrial. Portanto, o processo de apoptose está totalmente interligado para a amplificação do sinal apoptótico e ativação das caspases, embora a essência da via intrínseca seja determinada pelo equilíbrio entre as moléculas proteicas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) que regulam a permeabilidade mitocondrial

(CHANG et al., 2002; MACFARLANE; WILLIAMS, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Um uso adicional dos bufadienolídeos no tratamento do câncer é o combate indireto da caquexia, uma condição caracterizada por excessiva produção de interleucina – 6 (IL 6) em pacientes com câncer, causando uma redução da resposta corporal que pode levar à morte (ENOMOTO et al., 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que até o ano de 2030 surgirão cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população. O continente da Oceania (Austrália e Nova Zelândia) apresenta cerca de 313 casos para cada 100 mil habitantes, a maior incidência de casos dentre todos os continentes. A América do Sul e Brasil apresentam 172 casos por 100 mil habitantes (INCA, 2014; WHO, 2014).

Na batalha contra o câncer, a quimioterapia continua a ser a mais importante linha de defesa em doenças hematológicas malignas e formas agressivas de tumores sólidos. Alguns protocolos clínicos que usam a combinação dos agentes antineoplásicos estão a alcançar resultados com taxas de cura de até 90%, porém a diversidade genética e a instabilidade genômica em células tumorais contribui para a ampla heterogeneidade fenotípica, dificultam o tratamento e facilitam a manifestação de resistência (s) e recaída (s) que possam ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MCCUBREY et al., 2015). Portanto, muitos tumores sólidos ainda não apresentam tratamentos quimioterápicos ou radioterápicos apropriados, tais como glioma, cânceres pancreáticos e esofágicos, melanomas e carcinomas de pulmão de não pequenas células (CPNPC). Estes cânceres têm diferentes níveis de resistência a estímulos pró-apoptóticos e fenótipo de resistência a múltiplas drogas para a maioria dos agentes citotóxicos atualmente utilizados na clínica (COSTA-LOTUFO et al., 2010; MIJATOVIC et al., 2012).

4 Conclusões finais e perspectivas futuras

A descoberta de novas moléculas, como os bufadienolídeos, é o principal objetivo da oncologia médica e farmacêutica, e associada a estudos químicos, farmacológicos, farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicogenéticos, pode nos

ajudar a projetar terapias-alvo como forma de superar a resistência, diminuir os efeitos colaterais e recorrências de doenças neoplásicas avançadas, escolha de método/via de administração, aliviar o sofrimento e, claro, para obter eficácia clínica contra neoplasias sólidas e hematológicas. Com essa perspectiva, a vulnerabilidade dos anfíbios aos desafios ambientais aumenta o risco de propagação e, conseqüentemente, reduz a miscelânea bioativa de moléculas e a possibilidade de utilizá-las como novas ferramentas com finalidades terapêuticas inovadoras.

Bufadienólídeos, especialmente bufalina, cinobufagina, telocinobufagina e marinobufagina, são as substâncias mais comuns em secreções da pele de sapo e mostraram notável potencial citotóxico e antitumoral desencadeado por apoptose dependente de caspase. Esta classe de compostos surge como uma incrível fonte natural de biodiversidade química com uma seletividade moderada contra células tumorais humanas e fraca atividade contra células murinas, provavelmente devido a diferenças estruturais entre subunidades da Na^+/K^+ -ATPases humanas e de camundongos, um centro viável para a ligação dos compostos e controle da proliferação celular desregulada.

REFERÊNCIAS

ADAM, P.; HECHT, S.; ISENREICH, W.; KAISER, J.; GRAWERT, T.; ARIGONI, D.; BACHER, A.; ROHDICH, F. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 99, p. 12108-12113, 2002.

AIRES, M. M. **Physiology**. Third ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2011. 1232 p.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.

ATAIDE, E. L.; MACHADO, R. R.; RIBEIRO, M. B. C.; MATTOSINHO, T. J. A. P.; ROMANI, F. A.; ESCANHONELA, C. A. F.; BOIN, I. F. S. Survival and tumor relapse rate according to alpha-fetoprotein level in patients submitted to liver transplantation. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, p. 43-47, 2011.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.

BALUNAS, M. J.; KINGNORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANULS, L. M.; URBAN, E.; GELBCKE, M.; DUFRASNE, F.; KOPP, B.; KISS, R.; ZEHL, M. E. Structure-activity relationship analysis of bufadienolide-induced *in vitro* growth inhibitory effects on mouse and human cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1078-1084, 2013a.

BANULS, L. M.; KATZ, A.; MIKLOS, W.; CIMMINO, A.; TAL, D. M.; AINBINDER, E.; ZEHL, M.; URBAN, E.; EVIDENTE, A.; KOPP, B.; BERGER, W.; FERON, O.; KARLISH, S.; KISS, R. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar *in vitro* growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na⁺/K⁺-Atpase. **Molecular Cancer**, v. 26, p. 12-33, 2013b.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemistry**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BICK, R. J.; POINDEXTER, B. J.; SWENEY, R. R.; DASGUPTA, A. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than Na,K-ATPase blocking. **Life Sciences**, v. 72, p. 699-709, 2002.

BIJU, S. D.; BOSSUYT, F. New frog family from India reveals an ancient biogeographical link with the Seychelles. **Nature**, v. 425, p. 711-713, 2003.

BLOCH, K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. **Steroids**, v. 57, p. 378-383, 1992.

BOSMANS, F.; MAERTENS, C.; VERDONCK, F.; TYTGAT, J. The poison Dart frog's batrachotoxin modulates Nav1.8. **FEBS Letters**, v. 577, p. 245-248, 2004.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CATTERALL, W. A.; CESTÉLE, S.; YAROV-YAROVOY, V.; YU, F.; KONOKI, K.; SCHEUER, T. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 124-141, 2007.

CHANG, W. K.; YANG, K. D.; CHUANG, H.; JAN, J. T.; SHAIQ, M. F. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. **Clinical Immunology**, v. 104, p. 151-160, 2002.

CHAPARRO, J. C.; PRAMUK, J.; GLUESENKAM, P. A. G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from the cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologica**, v. 63, p. 203-212, 2007.

CHEN, K. K.; CHEN, A. L. Notes on the poisonous secretions of twelve species of toads. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 47, p. 281-293, 1933.

CHEN, Z.; ZHAI, X. F.; SU, Y. H.; WAN, X. Y.; LI, J.; XIE, J. M.; GAO, B. Clinical observation of cinobufacini injection used to treat moderate and advanced primary liver cancer. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 1, p. 184-186, 2003.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions: their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews**, v. 72, p. 365-379, 1997.

CÓRDOVA, W. H. P.; LEITÃO, S. Z.; CUNHA-FILHO, G.; BOSCH, R. A.; ALONSO, I. P.; PEREDA-MIRANDA, R.; GERVOU, R.; TOUZA, N. A.; QUINTAS, L. E. M.; NOEL, F. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na⁺/K⁺-ATPase activity. **Toxicon**, v. 110, p. 27-34, 2016.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 33-43, 2005.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R. O.; RODRIGUES, F. A.; DOS SANTOS, M. L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339–348, 2010.

CUNHA-FILHO, G. A.; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S. S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES JR., O. P.; LEITE, J. R. S.; BLOCH JR., C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777-782, 2005.

DALY, J. W.; GUSOVSKY, F.; MYERS, C. W.; YOTSU-YAMASHITA, M.; YASUMOTO, T. First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*), with further reports for the bufonid genus *Atelopus*. **Toxicon**, v. 32, p. 279-285, 1994.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 92, p. 9-13, 1995.

DALY, J. W.; NOIMAI, N.; KONGKATHIP, B.; KONGKATHIP, N.; WILHAM, J. M.; GARRAFFO, H. M.; KANEKO, T.; SPANDE, T. F.; NIMIT, Y.; NABHITABHATA, J.; CHAN-ARD, T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon**, v. 44, p. 805-815, 2004.

DARST, C.; MENENDEZ-GUERREOR, P.; COLOMA, L.; CANNATELLA, D. Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs

(Dendrobatidae): a comparative analysis. **The American Naturalist**, v. 165, p. 56-69, 2005.

DINARA, D.; CANER, S.; KOPP, B.; OPELZ, G.; TERNESS, P. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1791-1801, 2003.

DMITRIEVA, R. I.; BAGROV, A. Y.; LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P.; STOCCO, D. M.; DORIS, P. A. Mammalian bufadienolides is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. **Hypertension**, v. 36, p. 442-448, 2000.

DONG, Y.; YIN, S.; LI, J.; JIANG, C.; YE, M.; HU, H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis**, v. 16, p. 394-403, 2011.

DUELLEMAN, W. E. Reproductive strategies of frogs. **Scientific American**, v. 267, p. 80-87, 1992.

DUELLEMAN, W. E.; TRUEB, L. **The biology of amphibians**. New York: MacGraw-Hill, v. 1, p. 670, 1996.

EASTEAL, S. "*Bufo marinus*" Catalogue of American Amphibians and Reptiles. **American Society Ichthyology Herpetology**, v. 395, p. 1-395, 1963.

EISNER, T.; WIEMER, D. F.; HAYNES, L. W.; MEINWALD, J. Lucibufagins: defensive steroids from the fireflies *Photinus ignitus* and *P. marginellus* (Coleoptera: Lampyridae). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, p. 905-908, 1978.

ELKAREH, J.; KENNEDY, D. J.; YASHASWI, B.; VETTETH, S.; SHIDYAK, A.; KIM, E. G.; SMAILI, S.; PERIYASAMY, S. M.; HARIRI, I. M.; FEDOROVA, L.; LIU, J.; WU, L.; KAHALEH, M. B.; XIE, Z.; MALHOTRA, D.; FEDOROVA, O. V.; KASHKIN, V. A.; BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. **Hypertension**, v. 49, p. 215-224, 2007.

ENOMOTO, A.; RHO, M.; KOMIYAMA, K.; HAYASHI, M. Inhibitory effects of bufadienolides on interleukin-6 in MH-60 cells. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2070-2072, 2004.

EWART, H. S.; KLIP, A. Hormonal regulation of the Na(+)-K(+)-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. 295-311, 1995.

FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities

of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FEDOROVA, O. V.; BAGROV, A. Y. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. **American Journal of Hypertension**, v. 10, p. 929-935, 1997.

FEDOROVA, O. V.; TALAN, M. I.; AGALAKOVA, N. I.; LAKATTA, E. G.; BAGROV, A. Y. Endogenous ligand of α_1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride-dependent hypertension. **Circulation**, v. 105, p. 1122-1117, 2002.

FEDOROVA, O. V.; AGALAKOVA, N. I.; TALAN, M. I.; LAKATTA, E. G.; BAGROV, A. Y. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signaling in NaCl-loaded Dahl-S rats. **Journal of Hypertension**, v. 23, p. 1515-1523, 2005.

FEDOROVA, O. V.; SIMBIRTSEV, A. S.; KOLODKIN, N. I.; KOTOV, A. Y.; AGALAKOVA, N. I.; KASHKIN, V. A.; TAPILSKAYA, N. I.; BZHELYANSKY, A.; REZNIK, V. A.; FROLOVA, E. V.; NIKITINA, E. R.; BUDNY, G. V.; LONGO, D. L.; LAKATTA, E. G.; BAGROV, A. Y. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 26, p. 2414-2425, 2008.

FEDOROVA, O. V.; ZERNETKINA, V. I.; SHILOVA, V. Y.; GRIGOROVA, Y. N.; JUHASZ, O.; WEI, W.; MARSHALL, C. A.; LAKATTA, E. G.; BAGROV, A. Y. Synthesis of an endogenous steroidal na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, p. 736-745, 2015.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 43, p. 218-227, 2003.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; NASCIMENTO, S. J.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASE, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SHINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43-51, 2013.

FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D. Integrating virtual and high-throughput screening: opportunities and challenges in drug research and development. **Química Nova**, v. 34, p. 1770-1778, 2011.

FITCH, R. W.; SPANDE, T. F.; GARRAFFO, H. M.; YEH, H. J.; DALY, J. W. Phantasmidine: anepibatidine congener from the ecuadorian poison frog *Epipedobates anthonyi*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 331-337, 2010.

FRESE, S.; FRESE-SCHAPER, M.; ANDRES, A. C.; MIESCHER, D.; ZUMKEHR, B.; SCHMID, R. A. Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. **Cancer Research**, v. 66, p. 5867-5874, 2006.

FROST, D. **Amphibian species of the world, an on line reference**. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.

FROST, D.; CONCEDER, T.; FAIVOVICH, J.; BAIN, R. H.; HAAS, A.; HADDAD, C. F. B.; DE SA, R. O.; CHANNING, A.; WILKINSON, M.; DONNELLAN, S. C.; RAXWORTHY, C. J.; CAMPBELL, J. A.; BLOTTO, B. L.; MOLER, P.; DREWES, R. C.; NUSSBAUM, R. A.; LYNCH, J. D.; GREEN, D. M.; WHEELER, W. C. Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 297, p. 1-370, 2006.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPP, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 953-969, 2011.

GEERING, K. FX1D proteins: new regulators of Na-K-ATPase. **American Journal of Physiology, Renal Physiology**, v. 290, p. 241-250, 2006.

GOWER, D. J.; WILKINSON, M. Conservation biology of Caecilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, p. 45-55, 2005.

GUTIERREZ, J. M. Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. **Toxicon**, v. 109, p. 51-62, 2016.

HALLER, S. T.; KENNEDY, D. J.; SHIDYAK, A.; BUDNY, G. V.; MALHOTRA, D.; FEDOROVA, O. V.; SHAPIRO, J. I.; BAGROV, A. Y. Monoclonal antibody against marinobufagenin reverses cardiac fibrosis in rats with chronic renal failure. **American Journal of Hypertension**, v. 25, p. 690-696, 2012.

HAN, K.; HUAN, G.; GU, W.; SU, Y. H.; HUANG, X. Q.; LING, C. Q. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 3374-3379, 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HASEYAMA, K. L. F.; CARVALHO, C. J. B. Padrões de distribuição da

biodiversidade Amazônica: um ponto de vista evolutivo. **Revista da biologia**, v. Especial Biogeografia, p. 35-40, 2011.

HASHIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZA, N.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leukemia Research**, v. 21, p. 875-883, 1997.

HAUCK, C.; FRISHMAN, W. H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺-ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. **Cardiology in Review**, v. 20, p. 130-138, 2012.

HICKMAN JÚNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. eleven ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HONG, S. H.; KIM, G. Y.; CHANG, Y. C.; MOON, S. K.; KIM, W. J.; CHOI, Y. H. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions. **International Journal of Oncology**, v. 42, p. 277-286, 2013.

HUTCHINSON, D. A.; MORI, A.; SAVITZKY, A. H.; BURGHARDT, G. M.; WU, X.; MEINWALD, J.; SCHOROEDER, F. C. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 104, p. 2265-2270, 2007.

IMAI, S.; MURASE, H.; KATORI, M.; OKADA, M.; SHIGEI, T. A study on the structure–activity relationship of the cardiostimulatory steroids. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 62-71, 1965.

INCA, 2014. **Estimativa 2014: Incidência do Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; VERDADE, V. K.; TOLEDO, L. F.; RODRIGUES, M. T. The Amazonian toad *Rhaebo guttatus* is able to voluntarily squirt poison from the paratoid macroglands. **Amphibia-Reptilia**, v. 32, p. 546-549, 2011.

JIA, J.; GAO, K. Q. A New basal Salamandroid (Amphibia, Urodela) from the Late Jurassic of Qinglong, Hebei Province, China. **PLoS One**, v. 11, p. 1-35, 2016.

JOHNSON, P. H.; WALKER, R. P.; JONES, S. W.; STEPHENS, K.; MEURER, J.; ZAJCHOWSKI, J. A.; LUKE, M. M.; EECKMAN, F.; TAN, Y.; WONG, L.; PARRY, G.; MORGAN JR, T. K.; MCCARRICK, M. A.; MONFORTE, J. Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: Screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 1293–1304, 2002.

JUNCKER, T.; CERELLA, C.; TEITEN, M. H.; MORCEAU, F.; SCHUMACHER, M.; GHELFI, J.; GAASCHT, F.; SCHNEKENBURGER, M.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death

in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 13–23, 2011.

KAMANO, Y.; SATOH, N.; NAKAYOSHI, H.; PETTIT, G. R.; SMITH, C. R. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 326-332, 1988.

KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; NOGAWA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SEGAWA, T.; YUKITA, A.; SAITO, K.; KATSUYAMA, M.; PETTIT, G. R. QSAR evaluation of the *Chan'Su* and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5440-5447, 2002.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KASHKIN, V. A.; BAGROV, A.; FEDEROVA, O. V.; BAGROV, Y. Y.; AGALOKOVA, N. I.; PATKINA, N. A.; ZARTAU, E. E. Marinobufagenin (MBG) suppression of ethanol-seeking behavior is associated with inhibition of brain cortex Na/K-ATPase in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 217-223, 2002.

KENNEDY, D. J.; VETTETH, S.; PERIYASAMY, S. M.; KANJ, M.; FEDOROVA, L.; KHOURI, S.; KHOURI, S.; KAHALEH, M. B.; XIE, Z.; MALHOTRA, D.; KOLODKIN, N. I.; LAKATTA, E. G.; FEDOROVA, O. V.; BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I. Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. **Hypertension**, v. 47, p. 488-485, 2006.

KOLMAKOVA, E. V.; HALLER, S. T.; KENNEDY, D. J.; ISACHKINA, A. N.; BUDNY, G. V.; FROLOVA, E. V.; PIECHA, G.; NIKITINA, E. R.; MALHOTRA, D.; FEDOROVA, O. V.; SHAPIRO, J. I.; BAGROV, A. Y. Endogenous cardiotonic steroids in chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, p. 2912-2919, 2011.

KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1-29, 1998.

KRYSKO, D. V.; VANDEN, B. T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004.

LAURSEN, M.; GREGERSEN, J. L.; YATIME, L.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. U. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺/K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 112, p. 1755-1760, 2015.

LEE, D. Y.; YASUDA, M.; YAMANOTO, T.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. **Life Sciences**, v. 60, p. 127-134, 1997.

LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y. J.; HAN, K-S.; CHUNG, H. W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of Chan Su, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 372-376, 2014.

LEFRANC, F.; MIJATOVIC, T.; KONDO, Y.; SAUVAGE, S.; ROLAND, I.; DEBEIR, O.; KRSTIC, D.; VASIC, V.; GAILLY, P.; KONDO, S.; BLANCO, G.; KISS, R. Targeting the alpha-1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. **Neurosurgery**, v. 62, p. 211-221, 2008.

LI, B. J.; TIAN, H. Y.; ZHANG, D. M.; LEI, Y. H.; WANG, L.; JIANG, R. W.; YE, W. C. Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufoargarizans*. **Fitoterapia**, v. 105, p. 7-15, 2015.

LICHTSTEIN, D.; GATI, I.; BABILA, T.; HAVER, E.; KATZ, U. Effect of salt acclimation on digitalis-like compounds in the toad. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073, p. 65-68, 1991.

LIMA, A. P.; ERDTMANN, L. K.; FERRÃO, M.; COSTEIRA, J. M.; OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, D. M. S.; SILVA, K. M. **SAPOTECA: library of sounds and videos from Amazon frogs**. CENBAM, Manaus, Amazonas, Brazil, 2012.

LINGREL, J. B. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 395-412, 2010.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIU, L.; CHEN, B. A.; QIN, S. K. Anti-angiogenesis effect of arsenic trioxide plus cinobufacin on human hepatocarcinoma transplantation model nude mice. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 31, p. 67-72, 2011.

MANUNTA, P.; HAMILTON, B. P.; HAMLYN, J. M. Structure-activity relationships for the hypertensinogenic activity of ouabain: role of the sugar and lactone ring. **Hypertension**, v. 37, p. 472-477, 2001.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Reports**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MCCUBREY, J. A.; ABRAMS, S. L.; FITZGERALD, T. L.; COCCO, L.; MARTELLI, A. M.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; SCALISI, A.; CANDIDO, S.; LIBRA, M.; STEELMAN, L. S. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 75-101, 2015.

MENG, Y.; WHITING, P.; SIK, V.; REES, H. H.; DINAN, L. Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborustorquatus* (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v. 57, p. 201-407, 2001.

MENG, Z.; YANG, P.; SHEN, Y.; BEI, W.; ZHANG, Y.; GE, Y.; NEWMAN, R. A.; COHEN, L.; LIU, L.; THORNTON, B.; CHANG, D. Z.; LIAO, Z.; KURZROCK, R. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, non small-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, v. 115, p. 5309–5318, 2009.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, p. 91-106, 2012.

MIN, M. S.; YANG, S. Y.; BONETT, R. M.; VIEITES, D. R.; BRANDON, R. A.; WAKE, D. B. Discovery of the first Asian plethodontid salamander. **Nature**, v. 435, p. 87-90, 2005.

MONÇÃO, N. B. N.; ARAUJO, B. Q.; SILVA, J. N.; LIMA, D. J. B.; FERREIRA, P. M. P.; AIROLDI, F. P. S.; PESSOA, C.; CITO, A. M. G. L. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpinifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpinifolia* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, p. 4204-4224, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MURRELL, J. R.; RANDALL, J. D.; ROSOFF, J.; ZHAO, J. L.; JENSEN, R. V.; GULLANS, S. R.; HAUPERTJR., G. T. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. **Circulation**, v. 112, p. 1301-1308, 2005.

NASU, K.; NISHIDA, M.; UEDA, T.; TAKAI, N.; BING, S.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Bufalin induces apoptosis and the G₀/G₁ cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p. 817-823, 2005.

NESHER, M.; SHPOLANSKY, U.; ROSEN, H.; LICHTSTEIN, D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. **Life Sciences**, v. 16, p. 2093–2107, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, R. A.; YANG, P.; PAWLUS, A. D.; BLOCK, K. I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Molecular Interventions**, v. 8, p. 36-49, 2008.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, p. 655-669, 2008.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G. R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug *Ch'an Su*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148-1152, 2001.

OGASAWARA, M.; MATSUBARA, T.; SUZUKI, H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 720-723, 2001.

PASCOLUTTI, M., QUINN, R. J. Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 215-221, 2014.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 947-970, 2004.

PEREIRA, J. B. A.; RODRIGUES, M. M.; MORAIS, I. R.; VIEIRA, C. R. S.; SAMPAIO, J. P. M.; MOURA, M. G.; DAMASCENO, M. F. M.; SILVA, J. N.; CALOU, I. B. F.; DEUS, F. A.; PERON, A. P.; ABREU, M. C.; MILITÃO, G. C. G.; FERREIRA, P. M. P. The therapeutic role of the Program Farmacia Viva and the medicinal plants in the center-south of Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 550-561, 2015.

PERNE, A.; MUELLNER, M. K.; STEINRUECK, M.; CRAIG-MUELLER, N.; MAYERHOFER, J.; SCHWARZINGER, I.; SLOANE, M.; URAS, I. Z.; HOERMANN, G.; NIJMAN, S. M.; MAYERHOFFER, M. Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. **PlosOne**, v. 4, p. 1-9, 2009.

PERRY, P. Proteins of parotoid gland secretions from toads of genus *Bufo*. **Contemporary Herpetology**, v. 2000, p. 1-3, 2000.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of south American toad *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined analyses. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, p. 407-452, 2006.

PRATES, M. V.; BLOCH-JÚNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos – alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30-36, 2000.

QI, F.; INAGAKI, Y.; GAO, B.; CUI, X.; XU, H.; KOKUDO, N.; LI, A.; TANG, W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways Cancer. **Sciences**, v. 102, p. 951–958, 2011.

QIN, T. J.; ZHAO, X. H.; YUN, J.; ZHANG, L. X.; RUAN, Z. P.; PAN, B. R. Efficacy and safety of Gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 5210–5216, 2008.

RIERA, A. S.; DAUD, A.; GALLO, A.; GENTA, S.; YBAR, M. A.; SANCHEZ, S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. **Biocell**, v. 27, p. 37–46, 2003.

SANTOS, A. C. B.; SILVA, M. A. P.; SANTOS, M. A. F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 442-458, 2013.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SAPORITO, R.; DONNELLY, M.; NORTON, R.; GARRAFFO, H.; SPANDE, T.; DALY, J. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, p. 8885-8890, 2007.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; SOUSA JUNIOR, P. T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new argininyl bufadienolide esters from the “Cururú” toad *Rhinella (Bufo) Schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1076–1085, 2014.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 10-18, 2013.

SIMOES, E. R. B.; SANTOS, E. A.; ABREU, M. C.; SILVA, J. N.; NUNES, N. M. F.; COSTA, M. P.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. P. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, p. 256-263, 2015.

SIMPSON, C. D.; MAWJI, I. A.; ANYIWE, K.; WILLIAMS, M. A.; WANG, X.; VENUGOPAL, A. L.; GRONDA, M.; HURREN, R.; CHENG, S.; SERRA, S.; BEHESTI-ZAVAREH, R.; DATTI, A.; WRANA, J. L.; EZZAT, S.; SCHIMMER, A. D. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. **Cancer Research**, v. 69, p. 2739–2747, 2009.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v. 3, p. 25-41, 2007.

STEYN, P. S.; HEERDEN, F. V. Bufadienolides of plant and animals origin. **Natural Products Reports**, v. 15, p. 397-413, 1998.

STUART, S.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinction worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

STYNOSKI, J.; TORRES-MENDOZA, Y.; SASA-MARIN, M.; SAPORITO, R. Evidence of maternal provisioning of alkaloid-based chemical defenses in the strawberry poison frog *Oophaga Pumilio*. **Ecology**, v. 95, p. 587-593, 2014.

SU, J.; XU, Z. J.; YE, M. S. An experimental study of bladder cancer cell apoptosis induced by cinobufacin. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 25, p. 351-353, 2009.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plants Biochemistry**, v. 6, p. 71–133, 1990.

SUPRATMAN, U.; FUGITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p.1310-1312, 2000.

TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D. C.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N. N.; DE ANDRADE JR., H. F.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. **Toxicon**, v. 52, p. 13–21, 2008.

THOMAS, C.; PELLICCIARI, R.; PRUZANSKI, M.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 678-693, 2008.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111, p. 1-29, 1995.

TOUZA, N. A.; PÓÇAS, E. S.; QUINTAS, L. E.; CUNHA-FILHO, G.; SANTOS, M. L.; NOEL, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on Na./K.-ATPase activity in human kidney membrane preparation. **Life Sciences**, v. 88, p. 39-42, 2011.

UNO, Y.; HOSAKA, S.; YAMAZAKI, H. Identification and analysis of CYP7A1, CYP17A1, CYP20A1, CYP27A1 and CYP51A1 in *Cynomolgus macaques*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, p. 1647-1650, 2014.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Frogs**. in: VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. (Ed.). Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. fourth ed. Academic Press, San Diego, p. 471-522, 2014.

VU, H.; IANOSI-IRIMIE, M.; DANCHUK, S.; RABON, E.; NOGAWA, T.; KAMANO, O.; PETTIT, G. R.; WIESE, T.; PUSCHETE, J. B. Resibufogenin corrects hypertension in a rat model of human preeclampsia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 215-220, 2006.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **PNAS**, v. 105, p. 11466-11473, 2008.

WANG, D.; BI, Z. Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway. **Tumor Biology**, v. 35, p. 4885-4890, 2014.

WANG, D. L.; QI, F. H.; TANG, W.; WANG, F. S. Chemical constituents and bioactivities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 559–567, 2011.

WANG, Z.; ZHENG, M.; LI, Z.; LI, R.; JIA, L.; XIONG, X.; SOUTHALL, N.; WANG, S.; XIA, M.; AUSTIN, C. P.; ZHENG, W.; XIE, Z.; SUN, Y. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. **Cancer Research**, v. 69, p. 6556–6564, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer). Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>.

XU-TAO, C.; DONG, W.; NA, W.; ZHENG, C. Water-soluble constituents from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, p. 181-183, 2009.

YANG, J.; ZHANG, Y. H.; MIAO, F.; ZHOU, L.; SUN, W. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch. **Fitoterapia**, v. 81, p. 636-639, 2010.

YANG, P.; MENTER, D. G.; CARTWRIGHT, C.; CHAN, D.; DIXON, S.; SURAKAR, M.; MENDOZA, G.; LIANSA, N.; NEWMAN, R. A. Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: importance of Na,K-ATPase alpha subunits as drug targets. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, p. 2319-2328, 2009.

YE, M.; QU, G.; GUO, H.; GUO, D. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, p. 87-98, 2004.

YEH, J. Y.; HUANG, W. J.; KAN, S. F.; WANG, P. S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p. 112-124, 2003.

ZHANG, H.; QIAN, D. Z.; TAN, Y. S.; LEE, K. A.; GAO, P.; REN, Y. R.; REY, S.; HAMMERS, H.; CHANG, D.; PILI, R.; DANG, C. V.; LIU, J. O.; SEMENZA, G. L. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1a synthesis and block tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 105, p. 19579-19586, 2008.

ZHANG, J. T.; YU, K. F. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. **JAMA**, v. 280, p. 1690-1691, 1998.

ZHU, X. Y.; LIU, L. M. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobutacini injection and its active ingredient. **Tumor Journal of World**, v. 5, p. 272-275, 2006.

ZHU, Z.; SUN, H.; MA, G.; WANG, Z.; LI, E.; LIU, Y.; LIU, Y. Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 2025-2035, 2012.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZOGRAFOS, A. L. **From biosynthesis to total synthesis: strategies and tactics for natural products**. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons, 2016.

CAPÍTULO II

Ação antiproliferativa do bufadienolídeo Marinobufagina em células animais e vegetais

(Previsão de submissão: *Journal of Ethnopharmacology* – Qualis A2)

Ação antiproliferativa do bufadienolídeo Marinobufagina em células animais e vegetais

Lívia Queiroz de Sousa^a, Daisy Jereissati Barbosa Lima^b, Janaina da Costa de Noronha^c, Domingos de Jesus Rodrigues^c, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante^a, João Marcelo de Castro e Sousa^{a,d}, Cláudia Pessoa^b, Manoel Odorico de Moraes^b, Gardenia Carmen Gadelha Militão^e, Daniel Pereira Bezerra^f, Mariana Helena Chaves^g, Gerardo Magela Vieira-Júnior^g, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,h*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

^b *Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brasil.*

^c *Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, 78557-267, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.*

^d *Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Picos, Piauí, Brasil.*

^e *Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Brasil.*

^f *Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 40296710, Bahia, Brasil.*

^g *Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

^h *Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.*

RESUMO

Os venenos de anfíbios são uma promissora fonte de substâncias bioativas. Estudos recentes apontam a marinobufagina como bufadienolídeo predominante em extratos do veneno de *Rhinella marina*, os quais mostraram efeitos letais e pronunciados em linhagens tumorais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e murinas, a ação antiproliferativa em células vegetais e o possível efeito antitumoral *in vivo* do composto marinobufagina. A atividade citotóxica *in vitro* da substância frente a linhagens de células tumorais humanas e à cultura primária de Sarcoma 180 (S180) foi avaliada por meio dos ensaios MTT e Alamar blue, respectivamente. Os resultados demonstraram que o composto apresentou potente ação antiproliferativa com a variação dos valores de CI_{50} entre 0.06 (HL-60) e 2.94 (HEP-2) $\mu\text{g/mL}$, após 72 h de exposição. Diferentemente, as células murinas (S180) não se mostraram sensíveis à ação citotóxica da marinobufagina, pelo ensaio Alamar blue. Em estudos de mecanismo de ação com S180, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão de azul de Tripán em dois protocolos. Primeiramente, a marinobufagina causou significativa redução no número de células viáveis, após 24, 48 e 72 h. No segundo protocolo, avaliou-se a viabilidade após 24h da substituição do meio de cultura por meio suplementado novo sem o acréscimo da substância e foi observado que apenas na menor concentração testada (0.01 $\mu\text{g/mL}$) houve redução das células viáveis ($20.8 \pm 2.5 \times 10^4$ células/mL). Pelos testes de CBMN, a marinobufagina aumentou a frequência de células apoptóticas (0.1 $\mu\text{g/mL}$: 72.5 ± 3.2 ; 0.5 $\mu\text{g/mL}$: 82.5 ± 2.6 ; 1 $\mu\text{g/mL}$: 133.5 ± 19.3 eventos apoptóticos), certamente relacionada à formação de micronúcleos, pontes e brotos nas concentrações de 0.5 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Em modelo *Allium cepa*, revelou toxicidade em parâmetro macroscópico, citotoxicidade com a redução do índice mitótico em todas as concentrações testadas (0.5, 1, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) e aumento de micronúcleos (12.5 ± 0.6 e 23.3 ± 3.1), atrasos (9.0 ± 2.1 e 10.8 ± 1.1) e C-metáfases (10.5 ± 1.4 e 10.5 ± 0.5) nas duas maiores concentrações. Esses resultados revelam ações clastogênicas semelhantes em células de S180 e meristemáticas de raiz de *A. cepa*. Para a avaliação do potencial antitumoral *in vivo*, a marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, durante 7 e 15 dias consecutivos em camundongos transplantados com o tumor S180 e camundongos imunodeficientes com células HCT-116, respectivamente. O composto reduziu somente o crescimento de tumores humanos (HCT-116) com maior percentual de inibição (46.5%) na dose de 5 mg/kg/dia. A avaliação histopatológica desses tumores revelou diminuição da população celular neoplásica devido à necrose entremeada por focos de hemorragia. Em suma, a molécula marinobufagina apresentou uma notável capacidade citotóxica contra linhagens tumorais humanas, inibiu a proliferação celular de raízes de *Allium cepa*, causou danos cromossômicos em células meristemáticas radiculares e de Sarcoma 180 *in vitro* e revelou, pela primeira vez, ação antitumoral *in vivo* contra células tumorais humanas, embora tenha sido ineficaz contra o crescimento *in vivo* do tumor Sarcoma 180.

Palavras-chave: *Allium cepa*. Atividade Antitumoral. Citotoxicidade. Marinobufagina.

Antiproliferative action of the bufadienolide marinobufagin in animal and plant cells

ABSTRACT

Amphibian poisons are a promising source of bioactive substances. Recent studies point to marinobufagin as the bufadienolide predominant in extracts of the poison of *Rhinella marina*, which showed lethal and pronounced effects on tumor lines. In this context, the present work aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxicity in human and murine tumor cells, the antiproliferative action in plant cells and the possible *in vivo* antitumor effect of the compound marinobufagin. The *in vitro* cytotoxic activity of the substance against human tumor cell lines and the primary culture of Sarcoma 180 (S180) were evaluated by MTT and Alamar Blue assays, respectively. The results showed that the compound had a potent antiproliferative action with a variation of IC_{50} values between 0.06 (HL-60) and 2.94 (HEP-2) $\mu\text{g/mL}$, after 72h of exposure. In contrast, murine cells (S180) were not sensitive to the cytotoxic action of marinobufagin by the Alamar Blue assay. In studies of mechanism of action with S180, cell viability was assessed by the Tripan blue exclusion method in two protocols. Firstly, the marinobufagin caused a significant reduction in the number of viable cells after 24, 48 and 72 h. In the second protocol, the viability was evaluated after 24 h of replacement of the culture medium by new supplemented medium without addition of the substance. It was observed that only at the lowest concentration tested (0.01 $\mu\text{g/mL}$) there was reduction of viable cells ($20.8 \pm 2.5 \times 10^4$ cells/mL). In the CBMN tests, the marinobufagin increased the frequency of apoptotic cells (0.1 $\mu\text{g/mL}$: 72.5 ± 3.2 ; 0.5 $\mu\text{g/mL}$: 82.5 ± 2.6 ; 1 $\mu\text{g/mL}$: 133.5 ± 19.3 apoptotic events) certainly related to the formation of micronuclei, bridges and shoots at the concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$. In the *Allium cepa* model was observed toxicity at macroscopic parameters, cytotoxicity with reduction of mitotic index at all tested concentrations (0.5, 1, 10 and 25 $\mu\text{g/mL}$) and increase of micronuclei (12.5 ± 0.6 and 23.3 ± 3.1), delays (9.0 ± 2.1 and 10.8 ± 1.1) and C-metaphases (10.5 ± 1.4 and 10.5 ± 0.5) at the two highest concentrations. These results revealed similar clastogenic actions in cells of S180 and meristematic root of *A. cepa*. For evaluation of the antitumor potential *in vivo*, the marinobufagin was administered intraperitoneally at doses of 2.5 and 5 mg/kg/day for 7 and 15 consecutive days in mice transplanted with S180 tumor and mice immunodeficient with HCT-116 cells, respectively. The compound reduced only the growth of human tumors (HCT-116) with higher percentage of inhibition (46.5%) at the dose of 5 mg/kg/day. The histopathological evaluation of these tumors revealed a decrease in the neoplastic cell population due to necrosis interspersed with foci of hemorrhage. In summary, the marinobufagin molecule showed remarkable cytotoxic ability against human tumor lines; inhibited the cell proliferation of *Allium cepa* roots; caused chromosomal damage in root meristematic cells and Sarcoma 180 *in vitro*; and revealed, for the first time, *in vivo* antitumor action against human tumor cells, although it has been ineffective against *in vivo* growth of Sarcoma 180 tumor.

Keywords: *Allium cepa*. Antitumor activity. Cytotoxicity. Marinobufagin.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado a segunda maior causa de morte no mundo (INCA, 2014). As projeções para o ano de 2030 apontam a ocorrência de 26 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes por câncer, quase sempre justificadas pelo crescimento demográfico e processo de envelhecimento das populações, principalmente nas regiões menos desenvolvidas (THUN et al., 2010). Por conseguinte, existe uma preocupação constante para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas mais seguras e mais seletivas para atender às crescentes necessidades de saúde pública (NUGENT, 2008; SULERIA et al., 2016).

Os produtos naturais desempenharam um papel importante na quimioterapia do câncer nos últimos 50 anos (KINGHORN et al., 2016). Muitos compostos bioativos foram obtidos a partir de fontes naturais, incluindo animais, microorganismos e plantas marinhas (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007; SULERIA et al., 2016). De 175 fármacos introduzidos na terapia anticâncer em países ocidentais durante um período de 70 anos, aproximadamente 49% foram obtidos diretamente de organismos ou derivados de produtos naturais (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

Os bufadienólídeos, compostos biologicamente ativos presente em plantas (famílias Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae e Santalaceae) e animais como os anfíbios da família Bufonidae e espécie de cobra *Rhabdophis tigrinus* foram extensamente avaliados quanto à sua atividade citotóxica frente a uma variedade de células cancerosas, visando à concepção de novos compostos de interesse farmacêutico (KRENN; KOPP, 1998; HUTCHINSON et al., 2007; GAO et al., 2011). Estudos revelaram que estes compostos têm a capacidade de regular o metabolismo de crescimento e diferenciação celular, apoptose e da glicose (BAGROV et al., 2009; DONG et al., 2011).

Dessa forma, as secreções animais se tornaram importantes ferramentas para o entendimento de diversos processos fisiológicos ou patológicos e na geração de inovações farmacológicas (RAJENDRA et al., 2004; COSTA-NETO, 2005). Extratos dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus*, espécies de anfíbios da família Bufonidae encontrados na Amazônia Meridional, apresentaram atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais em níveis comparáveis ao controle utilizado na clínica e menor toxicidade contra células normais, indicando

que os compostos presentes nesses extratos são promissores candidatos ao tratamento do câncer (FERREIRA et al., 2013). A quantificação de bufadienólídeos nesses venenos mostrou que a molécula marinobufagina corresponde a 60% do extrato do veneno de *R. marina* (KERKHOFF et al., 2016). Dessa forma, a secreção da pele do anfíbio conhecido como “sapo Cururu” é uma rica fonte para obtenção dessa substância para futuras avaliações farmacológicas (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2016, 2017). Nesse estudo, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* do composto marinobufagina em células tumorais, sua ação antiproliferativa em células meristemáticas de *Allium cepa* e seu possível efeito antitumoral *in vivo* em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e em modelo xenográfico heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes transplantados com carcinoma de cólon humano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta, isolamento e identificação do composto

A coleta da secreção do veneno de sapo de *Rhinella marina* foi realizada no estado do Mato Grosso. Os animais foram identificados pelo professor Dr. Domingos de Jesus Rodrigues (D.J.R. – IBAMA, SISBIO: número 30034-1). Modelos das espécies (*R. marina* - ABAM-H 1262) foram depositadas no Acervo Biológico da Amazônia Meridional (Sinop, Mato Grosso, Brasil). A extração e identificação da molécula marinobufagina (**Figura 1**) foram realizadas conforme Ferreira et al. (2013). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa Animal da Universidade Federal do Mato Grosso (#23108.700260/14-7) e estão em conformidade com as Diretrizes Brasileiras (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e internacionais sobre o tratamento e a utilização de animais em experimentação.

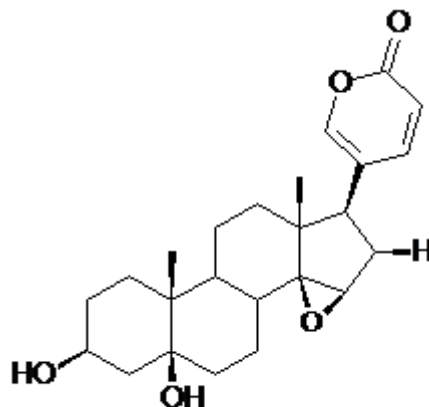


Figura 1 – Estrutura molecular da marinobufagina.

2.2 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas a partir do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT estão discriminadas na **Tabela 1**.

As linhagens celulares foram manuseadas em cabine biológica com ambiente estéril e mantidas em incubadora de células a 37 °C e 5% de CO₂. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos para uma concentração final de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão a cada 24 h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída em PBS.

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	0.3×10^6
K-562	Leucemia eritrocítica	Humana	0.3×10^6
MDA/MB-435	Melanoma	Humana	0.1×10^6
HCT-8	Carcinoma colorretal	Humana	0.7×10^5
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	0.7×10^5
SF-295	Glioblastoma	Humana	0.1×10^6
MCF-7	Adenocarcinoma mamário	Humana	0.1×10^6
NCIH-292	Carcinoma pulmonar	Humana	0.1×10^6
HEP-2	Carcinoma de Laringe	Humana	0.1×10^6
HEPG-2	Carcinoma de fígado	Humana	0.7×10^5
OVCAR-8	Carcinoma de ovário	Humana	0.1×10^6
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana	0.1×10^6
B16/F10	Melanoma	Murina	0.7×10^5

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss *Mus musculus* do sexo feminino, com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí para os estudos com o tumor Sarcoma 180.

Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantidos em gaiolas de acrílico de $30 \times 30 \text{ cm}^2$, com ciclo claro/ escuro de 12 h, receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - (Protocolo 133/16) da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina).

Para os estudos de modelo xenográfico e heterotópico de tumor humano, foram utilizados camundongos fêmeas imunodeficientes da linhagem CB17 SCID com 2 meses de idade. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela

Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA - Protocolo 006/2015) no uso de animais do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, FIOCRUZ, Bahia).

2.4 Avaliação do potencial citotóxico

2.4.1 Análise de citotoxicidade pelo ensaio do MTT em linhagens tumorais

A capacidade citotóxica foi determinada usando o método do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5- dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, pela atividade da enzima mitocondrial succinil-desidrogenase presente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; BERRIDGE et al., 1996), permitindo calcular indiretamente a quantidade de células vivas.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços em densidade ajustada para cada linhagem, como mostrado na **Tabela 1**. A substância marinobufagina (0,004 – 25 µg/mL) foi acrescentada e o quimioterápico Doxorrubicina (0,005 – 5,0 µg/mL) foi usado como controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se DMSO 0,1%. Após 69h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

2.4.2 Análise de citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue® em células de Sarcoma 180

A marinobufagina foi avaliada quanto à sua capacidade citotóxica frente à cultura primária de células do tumor S180 pelo ensaio de Alamar Blue. Assim como o MTT, o Alamar Blue sofre redução metabólica nas células vivas, sendo um indicador sensível da função mitocondrial, e pode ser utilizado para quantificar a viabilidade e a proliferação celular (O'BRIEN et al., 2000; RIOS, 2013). Para tanto, a

coleta das células foi realizada após eutanásia dos animais (Protocolo 133/16) sob condições de assepsia, e uma suspensão de células do tumor S180 da cavidade peritoneal de um camundongo mantido em condições padrões após 10 dias de manutenção. A suspensão foi centrifugada a 500 rpm por 5 min para obtenção de um pellet, o qual foi lavado três vezes com meio RPMI estéril. A concentração de células foi ajustada para $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Logo após o plaqueamento das células, a marinobufagina (0,004 – 25 µg/mL) foi adicionada e as placas transferidas para uma estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (PC), utilizou-se a seguinte fórmula: $PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$, onde A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (FERREIRA et al., 2015).

2.5 Mecanismo de ação *in vitro*

2.5.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripán

A viabilidade de células de tumor S180 isoladas e cultivadas como descrito acima foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan (RENZI et al., 1993). Na primeira bateria de experimentos, os tempos de 24, 48 e 72 h de exposição à marinobufagina (0.01, 0.1, 0.5 e 1 µg/mL) foram analisados. Em seguida, foram avaliados os tempos de 24h com marinobufagina e 24h das mesmas células sem marinobufagina. Para a troca dos meios de cultura, cada poço foi lavado com PBS estéril.

2.5.2 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) em células do Sarcoma 180.

Em condições de isolamento e cultivo como descrito acima, o teste de CBMN foi realizado em cultura primária de S180 de acordo com Fenech (2007). Marinobufagina (0.01, 0.1, 0.5 e 1 µg/mL) e Doxorubicina (1 µg/mL, controle positivo) foram adicionadas e a análise celular foi determinada após 72h. Ao final de 44h foram adicionados 3 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando-se os frascos para a incubadora de células por mais 28h. Ao final de 72h, as culturas foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 800 rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o corpo de fundo celular foi levemente agitado, sendo centrifugados novamente após a adição de 2mL de fixador (metanol:ácido acético na proporção 5:1) e 30 µL de formaldeído P.A. aos tubos. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Ao final, o sobrenadante foi descartado e 2 a 3 gotas da suspensão celular foram colocadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa (10, 25 e 50% + tampão fosfato, pH 7,4) por 5 min cada concentração. As lâminas previamente codificadas foram analisadas em teste cego, por meio de microscópio óptico, com aumento de 1000X, considerando os danos citogenéticos presentes em 2000 células por lâmina em duplicata.

2.6 Teste de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade no modelo vegetal de *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* tem sido utilizado para avaliar os danos aos cromossomos, tais como aberrações cromossômicas, micronúcleos e alterações no ciclo mitótico. Foram utilizadas cebolas de tamanho pequeno e uniforme de mesma origem, não germinadas e saudáveis. As raízes secas, as camadas extremas e o parênquima central da coroa de brotamento foram retirados para aumentar a absorção pelas raízes novas e para garantir a uniformidade de brotamento e crescimento radicular. Todas as cebolas foram lavadas em água corrente, por cerca de 20 min (FISKESJÖ, 1985).

Foram utilizados cinco bulbos para cada concentração da marinobufagina (0.5, 1, 10 e 25 µg/mL) e para os controles negativo (água desclorificada) e positivo (sulfato de cobre: 0.6 µg/mL). Posteriormente, foram colocados em frascos de vidro e o volume das amostras foi completado a cada 24 h para 5 mL finais. As cebolas

foram mantidas por 72 h no escuro a cerca de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o tempo de crescimento, as raízes foram removidas e mensuradas com auxílio de uma régua, sendo o tamanho das raízes utilizado como avaliação de toxicidade. Posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético na proporção de 3:1) por 24 h, depois estocadas em etanol a 70%, conservando-se sob refrigeração até o momento da preparação histológica das lâminas (FISKESJÖ, 1985).

Para o preparo das lâminas, as raízes coletadas foram lavadas em água destilada (3 banhos de 5 min), seguida de hidrólise com HCl 1N por 11 min a 60°C em banho-maria, sendo os tubos resfriados em água corrente, seguido de um novo banho de água destilada a temperatura ambiente. As raízes foram transferidas para frascos contendo o reativo de Schiff (1,5 g de fucsina básica, 4,5 g de metabissulfito de K ou Na, 45 mL de HCl 1N, 10 g de carvão ativado e 300 mL de H_2O), por aproximadamente 2 h. Logo depois, as raízes foram lavadas com água destilada até a total retirada do corante, foram colocadas sobre uma lâmina e uma incisão foi realizada para a separação da região meristemática. Aos materiais seccionados, foi adicionada uma gota de carmim acético 2% e as lâminas foram cobertas com lamínulas. Para análise, foi utilizado microscópio óptico em um aumento de 400X, sendo observadas 5.000 células por concentração (1000 células/lâmina), avaliando-se dados relacionados ao Índice Mitótico (IM) e alterações cromossômicas (micronúcleos, atrasos, C-metáfases, pontes e quebras).

2.7 Análise da atividade antitumoral *in vivo* no tumor Sarcoma 180

O modelo tumoral – tumor sólido Sarcoma 180 – foi utilizado após 10 dias de implantação na região intraperitoneal. O animal doador, ou da manutenção, foi eutanasiado por pentobarbital sódico (150 mg/kg). Em seguida, o líquido ascítico foi retirado da cavidade abdominal e uma suspensão de células com 5 mL de Ringer lactato, 100 μL de gentamicina (10 mg/mL) e 0.5 mL do líquido ascítico foi preparada. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 células/0.5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, os animais divididos em quatro grupos tiveram o tratamento iniciado e realizado durante sete dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 5%) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia). Para a marinobufagina, foram estabelecidas as doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia via intraperitoneal (i.p.).

Os animais foram pesados antes e após o tratamento e observados durante esse período quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, letargia e convulsões. No final do experimento, os animais foram eutanasiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg i.p.), e os tumores dissecados para avaliação da atividade antitumoral e observações morfológicas posteriores. O fluxograma de tratamento *in vivo* pode ser observado na **Figura 2**. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$, onde A corresponde à média dos pesos dos tumores no grupo controle e B à média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Imediatamente após a pesagem, os tumores foram armazenados em formalina tamponada 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool (70-100%), clarificados em xilol e impregnados em parafina. Os tumores parafinizados foram seccionados com 4 a 6 μm de espessura em micrótomo e lâminas foram preparadas, de acordo com o protocolo de métodos histológicos de rotina. Subsequentemente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em microscópio óptico (100x e 400x).

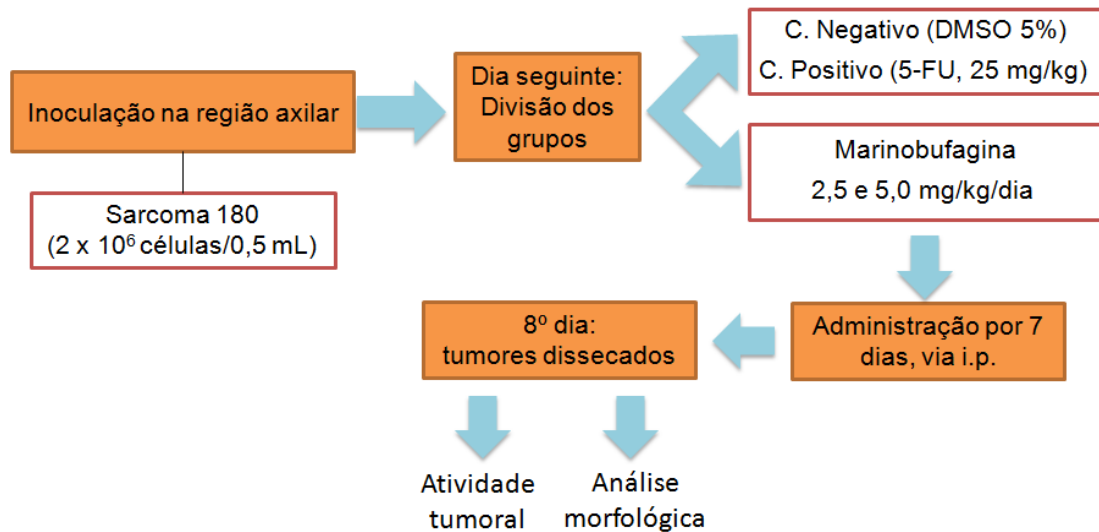


Figura 2 – Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da marinobufagina em camundongos transplantedados com células tumorais de Sarcoma 180.

2.8 Ensaio de eficácia antitumoral *in vivo* em modelo xenográfico

A eficácia antitumoral *in vivo* contra células tumorais humanas foi avaliada em modelo xenográfico e heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID fêmeas inoculados com células de carcinoma de colón

humano HCT-116 (10×10^6 células/500 μ L/animal) implantadas subcutaneamente na axila esquerda dos camundongos ($n=15$ /grupo). Os camundongos foram divididos em quatro grupos como se segue: controle negativo (tratados com o veículo DMSO a 5%), controle positivo (tratados com 5-FU 15 mg/kg) e animais tratados com marinobufagina (2,5 e 5 mg/kg). O tratamento foi iniciado no dia seguinte após a inoculação por via intraperitoneal e realizado durante 15 dias consecutivos. No 16^o dia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os tumores foram excisados e pesados. O efeito antitumoral foi expresso em percentagem comparado ao controle negativo como descrito anteriormente.

Imediatamente após a pesagem, os tumores foram armazenados em formalina tamponada 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool (70-100%), clarificados em xilol e impregnados em parafina. Os tumores parafinizados foram seccionados com 4 a 6 μ m de espessura em micrótomo e lâminas foram preparadas, de acordo com o protocolo de métodos histológicos de rotina. Subsequentemente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em microscópio óptico (100x e 400x).

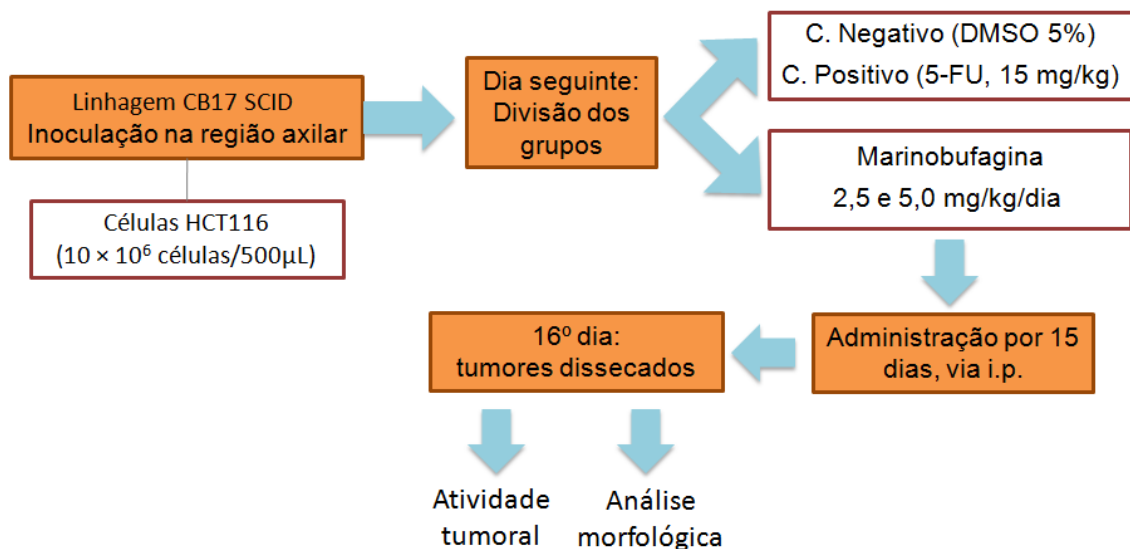


Figura 3 – Desenho experimental do estudo da atividade antitumoral *in vivo* da marinobufagina em camundongos imunodeficientes inoculados com células de carcinoma de cólon humano HCT-116.

2.9 Análises estatísticas

Para análise de valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e CE_{50} (concentração efetiva média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), a substância testada em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes ($n=2$), usou-se a regressão não-linear. Quanto aos valores expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), a ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos foi determinada por variância (ANOVA) seguida de Student-Newman-Keuls, usando o programa GraphPad Prism, versão 6.0, com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial citotóxico e antiproliferativo

Duas abordagens universais têm sido utilizadas nos testes pré-clínicos: sistemas celulares *in vitro* e modelos animais *in vivo*. Culturas de células *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a compreensão da biologia do câncer, na pesquisa de quimioterápicos e no desenvolvimento, estabelecimento e uso de ferramentas com terapêutica direcionada, o que coloca os modelos celulares como um dos principais pilares responsáveis pelos progressos na descoberta de novas alternativas para tratar tumores sólidos, displasias hematológicas e leucemias (COOK; JODRELL; TUVESON, 2012; FERREIRA et al., 2016). Portanto, no presente trabalho, primeiramente, a atividade citotóxica da marinobufagina foi avaliada em 13 linhagens tumorais após 72 h de incubação por meio do método de MTT e os valores das concentrações inibitórias (CI_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança foram determinados (**Tabela 2**).

A marinobufagina apresentou potente ação antiproliferativa com a variação dos valores de CI_{50} entre 0.06 (HL-60) e 2.94 (HEP-2) $\mu\text{g/mL}$. Além disso, em algumas linhagens (HL-60, K-562, MDA/MB-435, HCT-116, SF-295, MCF-7 e HEPG-2), o composto exibiu concentrações inibitórias semelhantes às encontradas para doxorrubicina, a qual foi escolhida como fármaco padrão ou controle positivo e mostrou considerável atividade contra todas as linhagens. Porém, é importante enfatizar que o composto teste foi mais ativo contra as células de carcinoma de ovário (OVCAR-8) do que o fármaco padrão (**Tabela 2**), confirmando estudos

prévios realizados com extratos provenientes dos venenos de *R. marina* que demonstraram acentuada atividade citotóxica contra células de leucemia (HL-60), glioblastoma (SF-295), carcinoma de cólon (HCT-116) e de ovário (OVCAR-8) (FERREIRA et al., 2013).

De fato, espécies dos gêneros *Rhinella* e *Rhaebo* (*B. melanosticus*, *R. schneideri*, *R. marina*, *R. margaritifera*, *R. hipochondrialis*, *R. major*, *R. crucifer* e *R. jimi*), incluindo as secreções da pele e seus componentes isolados, alcalóides, derivados metabólicos e bufadienolídeos isolados do fármaco tradicional da China, *Chan'Su*, tem demonstrado atividade citotóxica contra diversas linhagens tumorais humanas, tais como o cólon (26-L5), leucemias (K-562, U-937 ML-1, Jukart T, HL-60), melanomas (MDA/MB-435, SKMEL-28), mama (MCF-7, MCF-10A, MDA/MB-231), glioblastoma (U-373), oligodendroglioma (Hs-683), adenocarcinoma de estômago (AGS), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP), bexiga (BIU-87, J82), carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma de pulmão (A-549, SK-MES-1) e carcinoma primário de fígado (PLC/PRF/5) (ZHANG et al., 1998; NOGAWA et al., 2001; OGASAWARA et al., 2001; KAMANO et al., 2002; YEH et al., 2003; SU et al., 2009; CUNHA-FILHO et al., 2010; QI et al., 2011; SCIANI et al., 2013; BANULS et al., 2013a; LEE et al., 2014; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014; WANG; BI, 2014; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2016, 2017).

Com base nos promissores resultados obtidos pelo ensaio do MTT contra diferentes linhagens tumorais, realizou-se culturas primárias do tumor sólido murino Sarcoma 180 (S180) para analisar sua viabilidade celular após exposição à marinobufagina usando o ensaio Alamar Blue, visando usar os resultados *in vitro* como preditivos para estudos *in vivo*. Diferentemente dos resultados obtidos com células tumorais humanas, as células murinas não se mostraram sensíveis à ação citotóxica da marinobufagina (**Tabela 2**). Uma vez que cardenólídeos (ouabaína e digoxina) e alguns bufadienolídeos (arenobufagina, bufalina, telecinobufagina e helebrina) se ligam especificamente às subunidades da bomba de Na^+/K^+ -ATPase e tais subunidades são diferentes entre humanos e camundongos (MIJATOVIC et al., 2007; GAO et al., 2011; TOUZA et al., 2011; BANULS et al., 2013a, 2013b; LAURSEN et al., 2015), é provável que a atividade antiproliferativa da marinobufagina esteja associada a uma ação citotóxica espécie-específica.

Tabela 2 - Atividade citotóxica do composto Marinobufagina em linhagens tumorais de células e sobre culturas primárias do tumor murino Sarcoma 180 avaliada pelos ensaios de MTT e Alamar Blue, respectivamente, após 72 h de incubação.

Linhagens Celulares	Origem histológica	CI ₅₀ (µg/mL)*	
		Marinobufagina	Doxorrubicina**
HL-60	Leucemia humana	0.06 (0.05 – 0.07)	0.02 (0.01 – 0.02)
K-562	Leucemia humana	0.10 (0.08 – 0.12)	0.14 (0.09 – 0.23)
MDA/MB-435	Melanoma humano	0.21 (0.16 – 0.27)	0.48 (0.34 – 0.66)
HCT-8	Cólon humano	0.16 (0.13 – 0.22)	0.01 (0.01 – 0.02)
HCT-116	Cólon humano	0.06 (0.05- 0.08)	0.01 (0.01- 0.02)
SF-295	Glioblastoma humano	0.18 (0.15 – 0.21)	0.20 (0.18 – 0.25)
MCF-7	Mama humana	0.38 (0.27 – 0.55)	0.35 (0.28 – 0.51)
NCIH-292	Pulmão humano	1.10 (0.76 – 1.98)	0.20 (0.19 – 0.50)
HEP-2	Laringe humana	2.94 (2.00 – 4.10)	0.70 (0.30 – 1.40)
HEPG-2	Hepatocarcinoma	0.32 (0.23 – 0.43)	0.21 (0.15 – 0.30)
OVCAR-8	Ovário humano	0.10 (0.09 – 0.13)	1.30 (1.01 – 1.93)
PC3	Próstata humana	0.12 (0.07 – 0.17)	0.24 (0.21 – 0.27)
B-16/F-10	Melanoma murino	> 25	0.03 (0.02 – 0.04)
Sarcoma 180	Sarcoma murino	>25	1.90 (1.40 – 2.40)

*Valores de CI₅₀ apresentados em µg/mL calculados a partir de regressão não linear. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos através de três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo representados entre parênteses.

**O quimioterápico doxorrubicina foi usado como fármaco padrão (controle positivo).

Após demonstrar a atividade citotóxica da marinobufagina contra diversas linhagens tumorais humanas pelo teste MTT, decidiu-se analisar a viabilidade celular pelo método de exclusão de azul de Tripán, após 24, 48 e 72 h de exposição. Ao contrário do esperado, os resultados demonstraram que a marinobufagina diminuiu significativamente o número de células viáveis em todas as concentrações testadas, mas não interferiu na quantidade de não viáveis (não demonstrado na **Figura 4**) Logo após 24 h, o composto isolado do veneno de *Rhinella marina* (0.01, 0.1, 0.5 e 1 µg/mL) causou significativa redução no número de células viáveis (28.0 ± 1.0 , 16.8 ± 1.3 , 26.8 ± 2.0 e $24.8 \pm 1.4 \times 10^4$ células/mL) quando comparado ao controle negativo ($41.8 \pm 3.4 \times 10^4$ células/mL, $p < 0.05$) (**Figura 4A**). O quimioterápico doxorrubicina (1 µg/mL) foi utilizado como controle positivo, e também causou a redução das células viáveis ($21.8 \pm 2.0 \times 10^4$ células/mL). A redução de células viáveis também foi detectada após 48h e 72h de incubação quando comparadas aos seus respectivos controles negativos ($p < 0.05$).

Diante de tais resultados inesperados, visto que a citotoxicidade da marinobufagina em células de S180 não foi detectada pelo ensaio do Alamar Blue até a concentração de 25 µg/mL, avaliou-se os efeitos da marinobufagina após tratamento de 24h de incubação com marinobufagina e após 24h da substituição do meio de cultura por meio suplementado novo sem o acréscimo de marinobufagina. Assim, no primeiro protocolo experimental os efeitos acumulativos da presença da substância são avaliados, enquanto o segundo protocolo permite determinar a extensão dos efeitos e se as células de S180 são capazes de reverter o efeito citotóxico quando a substância teste é retirada. Comparando as duas situações (24h com a substância e 24h adicionais na ausência dela), foi possível perceber que, na presença da marinobufagina, no tempo de 48h de incubação, houve redução do número de células viáveis nas concentrações de 0.01, 0.5 e 1 µg/mL ($p < 0.05$) quando comparadas às mesmas concentrações no tempo de 24h na presença da marinobufagina (**Figura 4A**). Por outro lado, após 24h da troca do meio de cultura, apenas a menor concentração testada (0.01 µg/mL) mostrou redução da viabilidade celular para $20.8 \pm 2.5 \times 10^4$ células/mL quando comparada ao período de incubação de 24h ($33.3 \pm 1.7 \times 10^4$ células/mL) (**Figura 4B**). O controle positivo continuou diminuindo o número de células viáveis mesmo após a troca do meio ($10.8 \pm 1.5 \times 10^4$ células/mL) quando comparado ao período inicial de 24h na presença da doxorrubicina ($23.0 \pm 1.8 \times 10^4$ células/mL, $p < 0.05$)

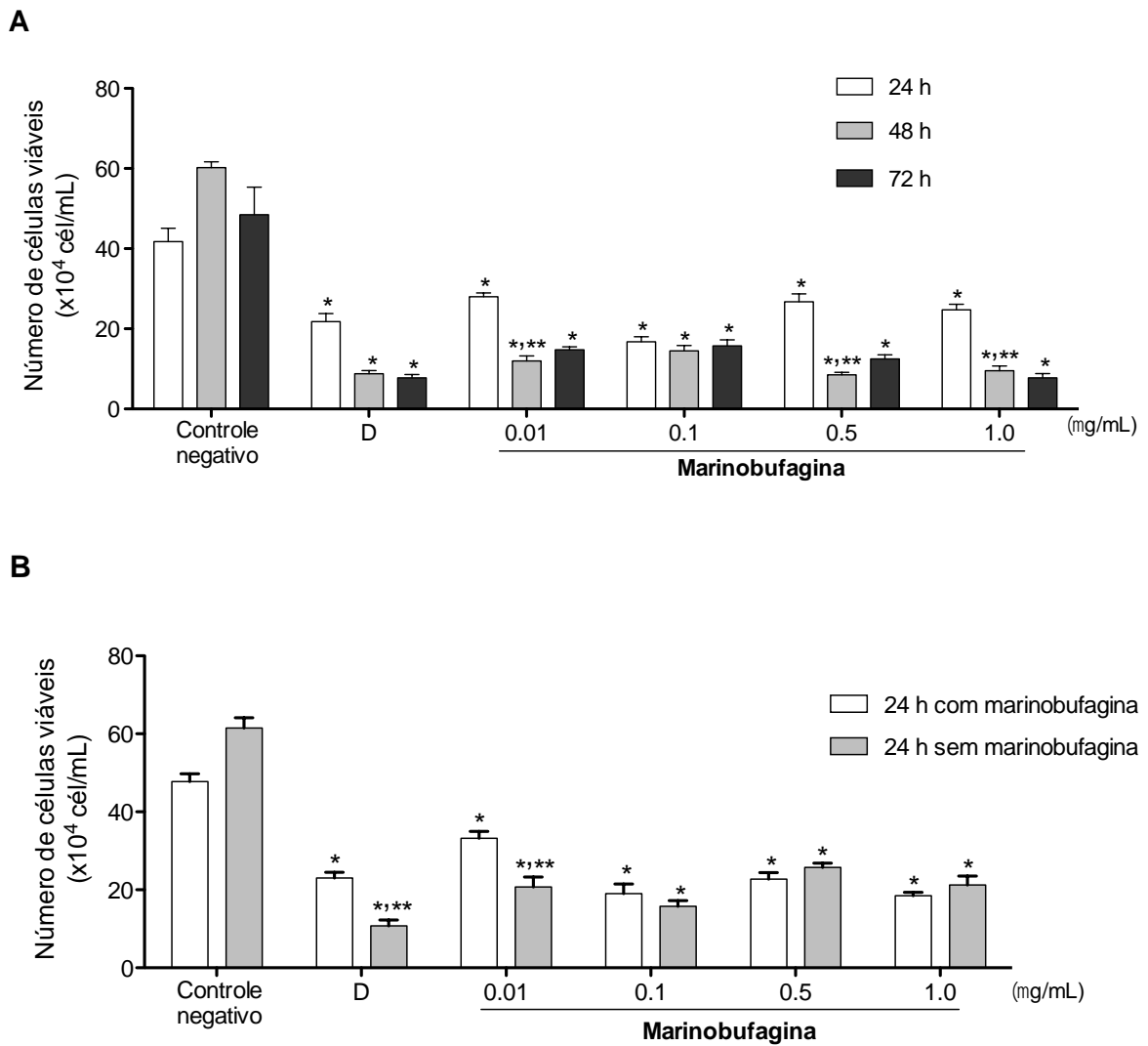


Figura 4 – Efeito do composto marinobufagina isolado do veneno de sapo *Rhinella marina* sobre a viabilidade celular de Sarcoma 180 (S180) determinada por exclusão do azul de tripan após 24, 48 e 72 h de exposição (A). Após 24 h de tratamento, o meio de cultura foi substituído por um novo, sem adição da marinobufagina (B). O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição da substância. O quimioterápico Doxorrubicina (D, 1 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0.05$ comparado ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls; ** $p < 0.05$ comparado ao tratamento por 24h por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls.

Em relação aos métodos de avaliação da citotoxicidade usados, há uma boa correlação entre os resultados obtidos com resazurina (nome comercial: Alamar Blue) e outros ensaios de metabolismo, como aqueles que usam sais de tetrazólio. Além disso, assim, como o MTT, a resazurina sofre redução metabólica nas células vivas e pode ser utilizada para quantificar a viabilidade e proliferação de forma indireta. Porém, os estudos mostram que a resazurina apresenta maior sensibilidade quando comparada com outros ensaios de citotoxicidade, uma vez que uma menor quantidade de células (~200 células/poço) e menos etapas são necessárias para revelação e quantificação, convertendo-se em um método adequado para avaliar a proliferação em culturas primárias de células e linhagens normais e tumorais de camundongos, ratos e humanos (AL-NASIRY et al., 2007; RAMPERSAD, 2012; SCHOONEN et al., 2012; FERREIRA et al., 2013). O fato de ser um método mais sensível foi outro motivo pelo qual a resazurina foi escolhida como revelador. Acredita-se que a redução celular da resazurina seja realizada por um conjunto de enzimas redutase ou tipo-diaforase derivadas de mitocôndrias e do citosol, muitas das quais também reduzem o MTT (NILES et al., 2008). Sabe-se que é possível que a própria substância teste seja capaz de inibir tais enzimas redutoras e causar erros na identificação de substâncias citotóxicas (NILES et al., 2008; RAMPERSAD, 2012), o que explicaria, pelo menos em parte, a incapacidade de detecção de citotoxicidade usando métodos que dependam de enzimas redutoras.

O teste com o corante vital azul de tripan se baseia no fato de que as células viáveis são capazes de bombear o corante para fora do citoplasma, enquanto as células mortas ou em necrose permitem que o corante entre na célula. Como o azul de tripan é um ácido fraco, ele tem maior afinidade para proteínas. A captação pelo núcleo, o qual se cora mais fortemente em azul, é geralmente maior devido à presença de histonas, enquanto o citoplasma permanece ligeiramente azulado (GRANKVIST et al., 1977; RENZI et al., 1993). Essa técnica foi capaz de demonstrar a diminuição *in vitro* de células viáveis do tumor S180, um achado não detectado pela resazurina e revelou que a presença da marinobufagina é necessária para a manutenção da redução contínua da viabilidade em três das quatro concentrações estudadas.

Nas mesmas condições de cultivo, a marinobufagina aumentou a frequência de células apoptóticas de forma concentração-dependente (0.01 µg/mL: 32.5 ± 7.2; 0,1 µg/mL: 72.5 ± 3.2; 0.5 µg/mL: 82.5 ± 2.6; 1µg/mL: 133.5 ± 19.3 eventos

apoptóticos) após 72h de incubação como determinado pelos testes de CBMN (**Figura 5**), uma vez que a marinobufagina causou diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo (11.5 ± 2.0 eventos apoptóticos) nas três maiores concentrações testadas. O quimioterápico doxorrubicina ($1 \mu\text{g/mL}$) também induziu apoptose (400.0 ± 34.1 eventos apoptóticos) e de uma forma bem mais intensa quando comparada à maior concentração da substância teste ($1 \mu\text{g/mL}$). Certamente, o aumento significativo dos eventos apoptóticos está relacionado com a formação de micronúcleos (19.5 ± 0.3 e 43.0 ± 2.3 micronúcleos), pontes nucleoplasmáticas (15.0 ± 17 e 22.5 ± 1.4 pontes) e brotos nucleares (9.0 ± 0.6 e 11.5 ± 0.9 brotos) nas concentrações de 0.5 e $1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 6**, $p < 0.05$). A doxorrubicina também aumentou o número de micronúcleos (77.0 ± 9.0), pontes (70.5 ± 25) e brotos nucleares (22.5 ± 2.5) em relação ao controle negativo (4.0 ± 1.0 , 2.5 ± 0.5 e 6.0 ± 1.0 , respectivamente, $p < 0.05$).

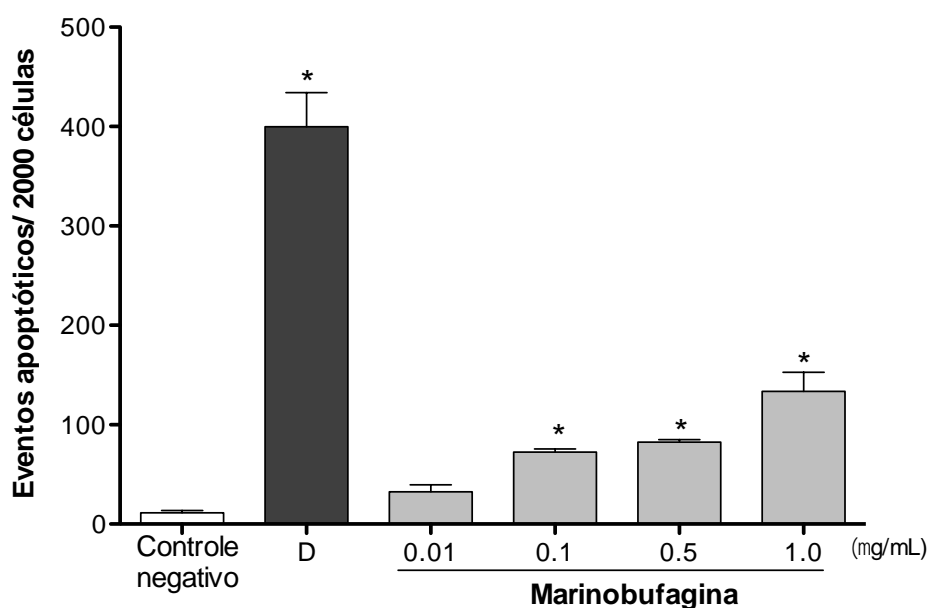


Figura 5 – Análise de eventos apoptóticos da marinobufagina isolada do veneno de *Rhinella marina* em células tumorais do tumor murino Sarcoma 180 realizada pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) após 72 h de incubação. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluição da substância. O quimioterápico Doxorrubicina (D, $1 \mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0.05$ comparado ao controle negativo por análise de variância (ANOVA) seguido de Student Newman-Keuls.

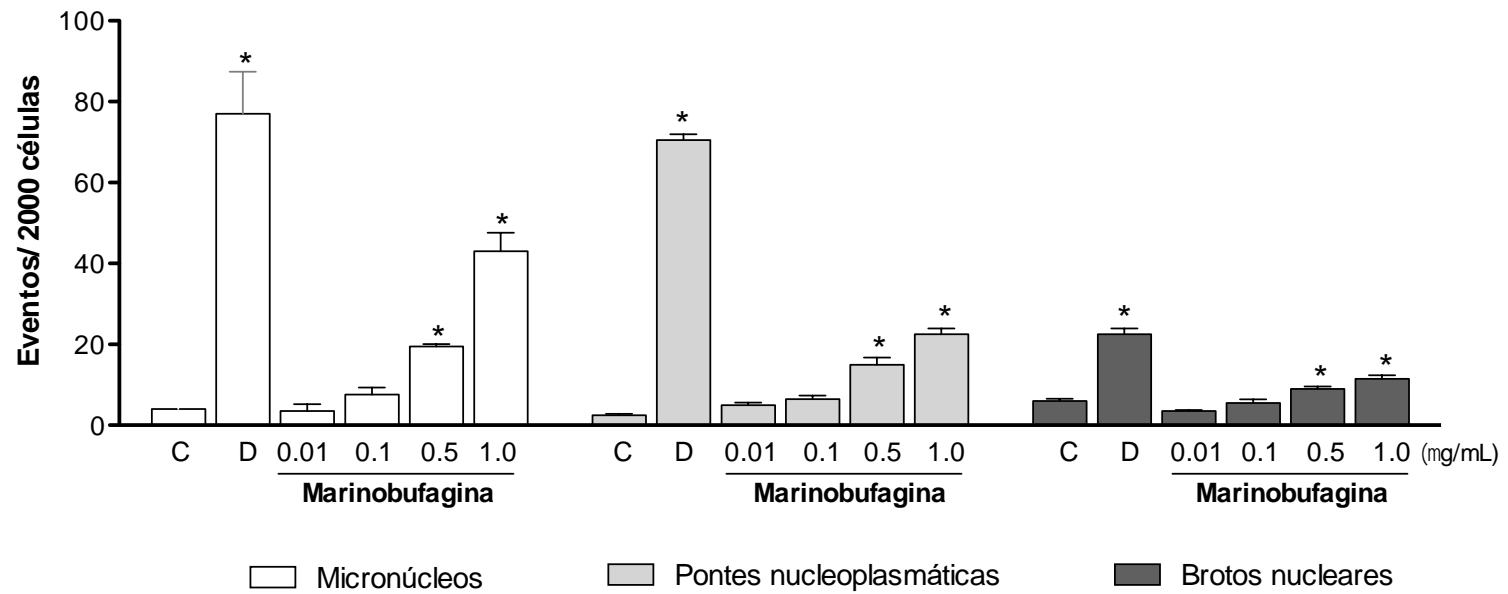


Figura 6 – Efeito da marinobufagina isolada do veneno de *Rhinella marina* nas alterações cromossômicas de células tumorais do Sarcoma 180, determinado pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, depois de 72h de incubação. O controle negativo (C) não recebeu tratamento. O quimioterápico Doxorubicina (D, 1 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n=2). * p < 0.05 quando comparado ao controle negativo (C) por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

O ensaio de CBMN costuma ser utilizado no monitoramento de populações expostas a substâncias mutagênicas e na avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos, mas também é empregado na elucidação do mecanismo de ação de agentes clastogênicos (HUMPAGE et al., 2000; BONASSI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003; CHEQUER, 2008). No presente trabalho, o teste de CBMN permitiu determinar a capacidade da marinobufagina em induzir citotoxicidade e instabilidade cromossômica. A citotoxicidade é avaliada pela presença de células apoptóticas e necróticas em conjunto com a marcação de células mono-, bi- e multinucleadas. Os danos ao DNA pode ser avaliados por meio da presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (FENECH, 2007; JACOBIUNAS et al., 2013).

Os micronúcleos são originados por perdas de cromossomos inteiros (ação aneugênica) ou por fragmentos cromossômicos acêntricos (ação clastogênica) na conclusão da telófase durante a mitose devido à incorreta segregação de cromátides irmãs na anáfase. Estes cromossomos deslocados ou fragmentados são eventualmente envoltos por uma membrana nuclear e, com exceção do tamanho (1/5 do tamanho do núcleo), são morfológicamente semelhantes ao núcleo. Assim, estes eventos somente podem ser observados em células com divisão completa, as quais são reconhecidas pela sua aparência binucleada, após o bloqueio da citocinese pela citocalasina B (FENECH, 2007; CHEQUER, 2008; FENECH et al., 2011), fato pelo qual usamos tal substância para inibir a polimerização da actina e, conseqüentemente, a clivagem da célula em duas células filhas (SALVADORI et al., 2003; SOUZA, 2013).

As pontes nucleoplasmáticas se originam durante a anáfase quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos migram para pólos opostos da célula. Na ausência de ruptura da ponte anafásica, a membrana nuclear é formada em torno dos núcleos e das pontes, as quais são, normalmente, quebradas durante a citocinese, mas podem ser acumuladas em células com citocinese bloqueada pela citocalasina B. Outra anomalia, conhecida como broto nuclear, tem sido associada a eventos de instabilidade cromossômica e caracteriza-se por possuir a mesma morfologia que um micronúcleo, com a exceção da ligação ao núcleo por um talo estreito ou largo de material nucleoplasmático (FENECH et al., 2011). Essa estrutura é formada como resultado da eliminação de DNA amplificado do núcleo durante a fase S do ciclo celular, ou seja, é indicativo do processo inicial de expulsão do

material genético e, conseqüentemente, podem estar relacionados com a formação de micronúcleos (SHIMIZU et al., 1998; FERNANDES et al., 2007).

O achado de alterações citogenéticas nas células de S180 explica, pelo menos parcialmente, a redução da proliferação celular, e somente danos mais intensos que levem à apoptose causam redução detectável do número de células, uma vez que danos citogenéticos estatisticamente significantes podem interferir com a divisão celular, causando parada do ciclo, por exemplo, mas sem causar morte celular, diminuindo a proliferação ao mesmo tempo em que a célula ainda é capaz de realizar processos metabólicos basais para sua sobrevivência (RIBEIRO et al., 2003; NILES et al., 2008; RAMPERSAD, 2012). Neste caso, é possível sugerir que a célula de S180 tratada com marinobufagina está passando por apoptose, que esta depende da formação de micronúcleos, pontes e brotos e que tais sinais citogenéticos refletem a presença ou ausência de mecanismos de reparo de DNA e/ou de controle de replicação de DNA (GALLUZZI et al., 2007; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). O que não se sabe ainda é até que ponto a severidade e não a especificidade do estímulo nocivo – Marinobufagina – determina a forma pela qual a morte se expressa. Assim, dependendo da concentração estipulada, diferentes processos podem ser influenciados e/ou alterados, mostrando que a regulação concentração-dependente dos processos celulares reflete a sinalização iniciada por moléculas bioativas. A necrose secundária (à apoptose) ocorre quando as células apoptóticas perdem a capacidade em manter a produção de ATP ou em controlar o estresse oxidativo (SCHEINICHEN et al., 2003; KRYSKO et al., 2008).

Além dos modelos *in vitro* com células animais, os testes de citotoxicidade utilizando bioensaios vegetais, de *Allium cepa* têm sido bastante utilizados por serem considerados modelos rápidos e sensíveis para detecção de compostos genotóxicos e mutagênicos e pelo fato de que alterações cromossômicas no ciclo celular de *A. cepa* podem ser usadas como indicativo de toxicidade de um determinado produto para a população humana (VICENTINI et al., 2001; BAGATINI et al., 2007; FACHINETTO et al., 2007; SABINI et al., 2011; PESNYA; ROMANOVSKY, 2013; NEVES et al., 2014).

No entanto, até o presente momento, não existem relatos na literatura com relação a estudos de citotoxicidade com secreções animais, como venenos de anfíbios e/ou constituintes destes, nesse sistema vegetal. Assim, raízes de *Allium cepa* (e seus tecidos meristemáticos) em crescimento foram expostas à

marinobufagina com o objetivo de obter dados de citotoxicidade (divisão celular e crescimento da raiz) e danos cromossômicos após 72h de exposição.

Bioensaios com *Allium cepa* permitem avaliar vários parâmetros citogenéticos e o mecanismo de ação de agentes naturais e sintéticos sobre o genoma dos organismos expostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MISIK et al., 2014). O composto marinobufagina inibiu significativamente o crescimento das raízes (48.9 ± 8.7 , 51.4 ± 6.1 , 70.4 ± 3.8 e 85.8 ± 3.1 %) em todas as concentrações testadas (0.5, 1, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) de forma dependente da concentração (0.58 ± 0.08 , 0.56 ± 0.06 , 0.45 ± 0.03 e 0.23 ± 0.03 cm, respectivamente) quando comparadas ao controle negativo (1.04 ± 0.06 cm, $p < 0.05$) e um valor de CE_{50} de 3.0 (1.2 - 7.8) $\mu\text{g/mL}$. O grupo tratado com a solução de sulfato de cobre 0,6 $\mu\text{g/mL}$ apresentou raízes com 0.36 ± 0.02 cm e inibição de 72.6 ± 2.7 % (**Figura 7**).

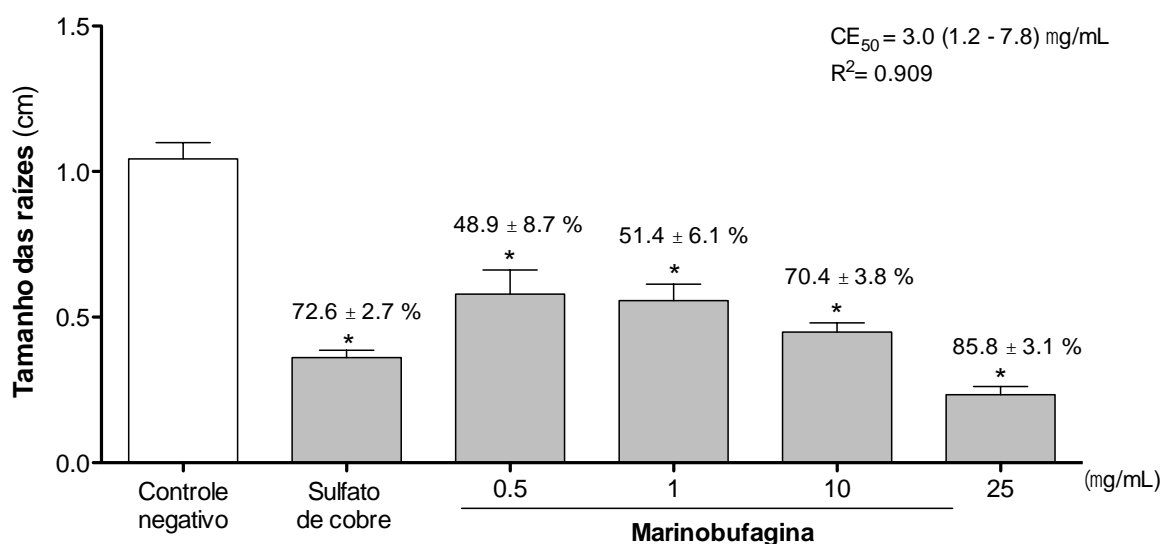


Figura 7 – Tamanho das raízes de *Allium cepa* tratadas com marinobufagina durante 72h de exposição. O controle negativo foi exposto à água desclorificada e o controle positivo, ao sulfato de cobre 0,6 $\mu\text{g/mL}$. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. Números em percentual representam a inibição do crescimento radicular. * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Newman-Keuls.

Confirmando a capacidade de inibição do crescimento radicular, a marinobufagina causou redução do índice mitótico (IM) em todas as concentrações testadas (0.5, 1, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) de forma dependente da concentração (43.8 ± 1.6 , 39.7 ± 1.4 , 31.0 ± 1.6 e 22.1 ± 0.5 %, respectivamente) em comparação com o

controle negativo (56.7 ± 1.0 %), e redução de células em todas as fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) ($p < 0.05$), semelhante aos resultados encontrados para o controle positivo (13.9 ± 0.6 %) (**Tabela 3**).

O Índice Mitótico (IM) é um importante indicador de proliferação celular e o nível de citotoxicidade de um agente pode ser determinado pelo aumento ou diminuição desse parâmetro (GADANO et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009; PRAJITHA; THOPPIL, 2016). A redução do índice mitótico está relacionada à inibição da síntese de DNA, parada ou bloqueio do ciclo em alguma fase ou indução de saída da célula do ciclo para G_0 , impedindo a célula de voltar para a divisão celular (SUDHAKAR et al., 2001; PANDEY; KUMAR; ROY, 2014). De fato, muitos compostos com ação antiproliferativa costumam induzir parada da divisão celular em alguma fase da mitose. O paclitaxel extraído de *Taxus brevifolia* e discodermolida, um derivado de esponja do mar (*Discodermia dissoluta*), possuem como principal modo de ação a estabilização dos microtúbulos, ao se ligar à tubulina sem permitir sua despolimerização. As podofilotoxinas, uma classe de lignana isolada inicialmente de *Podophyllum peltatum* e melhorados na forma de etoposídeo e tenoposídeo, causam parada do ciclo celular na metáfase devido ao bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II (SRIVASTAVA et al., 2005, RADJASA et al., 2011). Em muitos casos, a parada em alguma fase da mitose como parte do mecanismo de ação do composto citotóxico se deve a danos cromossômicos aneugênicos ou clastogênicos e ocorre de forma a dar oportunidade à maquinaria celular para corrigir o dano e tentar escapar da morte celular por apoptose (SANTANA et al., 2016).

Tabela 3 – Efeito citotóxico do composto Marinobufagina isolado do veneno do sapo *Rhinella marina* em células meristemáticas de *Allium cepa* após 72 h de exposição.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Intérfase	Fases da Mitose				Índice Mitótico** (%)
			Prófase (P)	Metáfase (M)	Anáfase (A)	Telófase (T)	
Controle negativo	-	433.3 ± 10.1	398.8 ± 3.9	77.3 ± 7.8	58.0 ± 2.9	32.8 ± 3.5	56.7 ± 1.0
Sulfato de cobre	0.6	861.0 ± 5.6*	104.5 ± 3.0*	12.0 ± 1.9*	11.0 ± 1.5*	11.5 ± 3.2*	13.9 ± 0.6*
Marinobufagina	0.5	558.0 ± 18.1*	390.8 ± 16.0	14.5 ± 2.1*	13.3 ± 2.2*	20.3 ± 4.3*	43.8 ± 1.6*
	1	602.5 ± 14.1*	358.0 ± 15.5	11.5 ± 1.6*	12.8 ± 1.6*	15.3 ± 1.8*	39.7 ± 1.4*
	10	689.8 ± 15.8*	259.0 ± 16.5*	17.8 ± 3.5*	15.8 ± 2.0*	17.8 ± 2.4*	31.0 ± 1.6*
	25	779.3 ± 5.1*	182.3 ± 6.5*	11.8 ± 0.9*	10.8 ± 1.1*	16.0 ± 0.8*	22.1 ± 0.5*

Os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 5000 células (n= 5 bulbos/grupo). *p < 0.05 quando comparado ao controle negativo (C) por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

**Índice mitótico é calculado: P+M+A+T / N° Total de células X 100.

A marinobufagina causou aumento significativo ($p < 0.05$) das alterações cromossômicas nas três maiores concentrações testadas (1 $\mu\text{g/mL}$: 15.8 ± 1.1 , 10 $\mu\text{g/mL}$: 36.5 ± 3.6 , 25 $\mu\text{g/mL}$: 47.0 ± 3.4 alterações) em relação ao controle negativo (7.3 ± 0.8 alterações) (**Tabela 4**). O sulfato de cobre induziu aumento de todas as formas de alterações cromossômicas [micronúcleos (11.5 ± 0.7), atrasos (13.0 ± 0.7), C-metáfases (16.3 ± 0.9), pontes (6.3 ± 0.6) e quebras (8.0 ± 10)] quando comparadas ao controle negativo (2.3 ± 0.3 , 2.0 ± 0.4 , 1.3 ± 0.3 , 1.3 ± 0.3 e 0.5 ± 0.3 , respectivamente), enquanto a marinobufagina aumentou a quantidade de micronúcleos (12.5 ± 0.6 e 23.3 ± 3.1), atrasos (9.0 ± 2.1 e 10.8 ± 1.1) e C-metáfases (10.5 ± 1.4 e 10.5 ± 0.5) nas concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente ($p < 0.05$), mas somente a quantidade de micronúcleos revelou ser concentração-dependente.

Como MNs representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou no aparelho mitótico, gerando fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal durante a telófase da mitose (FENECH, 2007), supõe-se que a marinobufagina possua ação genotóxica e/ou mutagênica tanto em células animais como vegetais, embora nem todo agente genotóxico é, necessariamente, mutagênico, pelo fato das lesões geradas no DNA poderem ser reparadas. Um exemplo é a investigação das propriedades tóxicas e genotóxicas agudas de fármacos citostáticos amplamente utilizados na clínica, como 5-fluorouracil, etoposídeo, cisplatina, carboplatina, sulfato de vincristina e ciclofosfamida monohidratada, em que foram observados efeitos como inibição do crescimento radicular e da divisão celular em células meristemáticas de *A. cepa* em concentrações menores comparadas com aquelas que causam danos mensuráveis ao DNA, sugerindo que os efeitos tóxicos agudos não são causados por danos do material genético (MISIK et al., 2014). No entanto, vale ressaltar que muitos medicamentos antitumorais são mutagênicos. Nesse caso, reduzir a mutagenicidade seria equivalente à redução da eficácia clínica do fármaco (VERSCHAEVE; VAN STADEN, 2008; PRAJITHA; THOPPIL, 2016).

Tabela 4 – Alterações cromossômicas causadas pelo composto Marinobufagina isolado do veneno do sapo *Rhinella marina* em células meristemáticas de *Allium cepa* após 72 h de exposição.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Alterações cromossômicas					Quantidade de alterações cromossômicas
		Micronúcleos	Atrasos	C-metáfases	Pontes	Quebras	
Controle negativo	-	2.3 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.3 ± 0.3	$1.3 \pm 0,3$	0.5 ± 0.3	7.3 ± 0.8
Sulfato de cobre	0.6	$11.5 \pm 0.7^*$	$13.0 \pm 0.7^*$	$16.3 \pm 0.9^*$	$6.3 \pm 0,6^*$	$8.0 \pm 1.0^*$	$55.0 \pm 2.0^*$
Marinobufagina	0.5	1.0 ± 0.4	5.5 ± 1.0	$4.3 \pm 0.6^*$	$0.5 \pm 0,3$	0.5 ± 0.5	11.8 ± 0.9
	1	3.5 ± 0.6	5.0 ± 1.2	$4.8 \pm 0.8^*$	2.0 ± 0.0	0.5 ± 0.3	$15.8 \pm 1.1^*$
	10	$12.5 \pm 0.6^*$	$9.0 \pm 2.1^*$	$10.5 \pm 1.4^*$	$4.5 \pm 0.5^*$	0.0 ± 0.0	$36.5 \pm 3.6^*$
	25	$23.3 \pm 3.1^*$	$10.8 \pm 1.1^*$	$10.5 \pm 0.5^*$	2.0 ± 0.8	0.5 ± 0.5	$47.0 \pm 3.4^*$

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 5000 células (n= 5 bulbos/grupo). * $p < 0.05$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de Student Newman-Keuls.

Na **figura 8** estão apresentadas as alterações cromossômicas mais comuns causadas pela marinobufagina: micronúcleo (**Figura 8B**), atraso cromossômico (**Figura 8C**), C-metáfase (**Figura 8D**), ponte cromossômica (**Figura 8E**) e quebra cromossômica (**Figura 8F**). A presença de atrasos cromossômicos pode estar relacionada à falha dos cromossomos “lesionados” em se deslocar para um dos pólos da célula. As pontes cromossômicas são resultantes de quebra e posterior fusão de cromossomos e cromátides ou devido à subsequente falha na separação de cromátides irmãs na anáfase, translocação desigual ou inversão de segmentos de cromossomos (GÖMÜRGEN et al., 2005; DE RAINHO et al., 2010). Os fragmentos ou quebras cromossômicas são consequência da ação clastogênica de compostos que provocam alterações estruturais nos cromossomos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

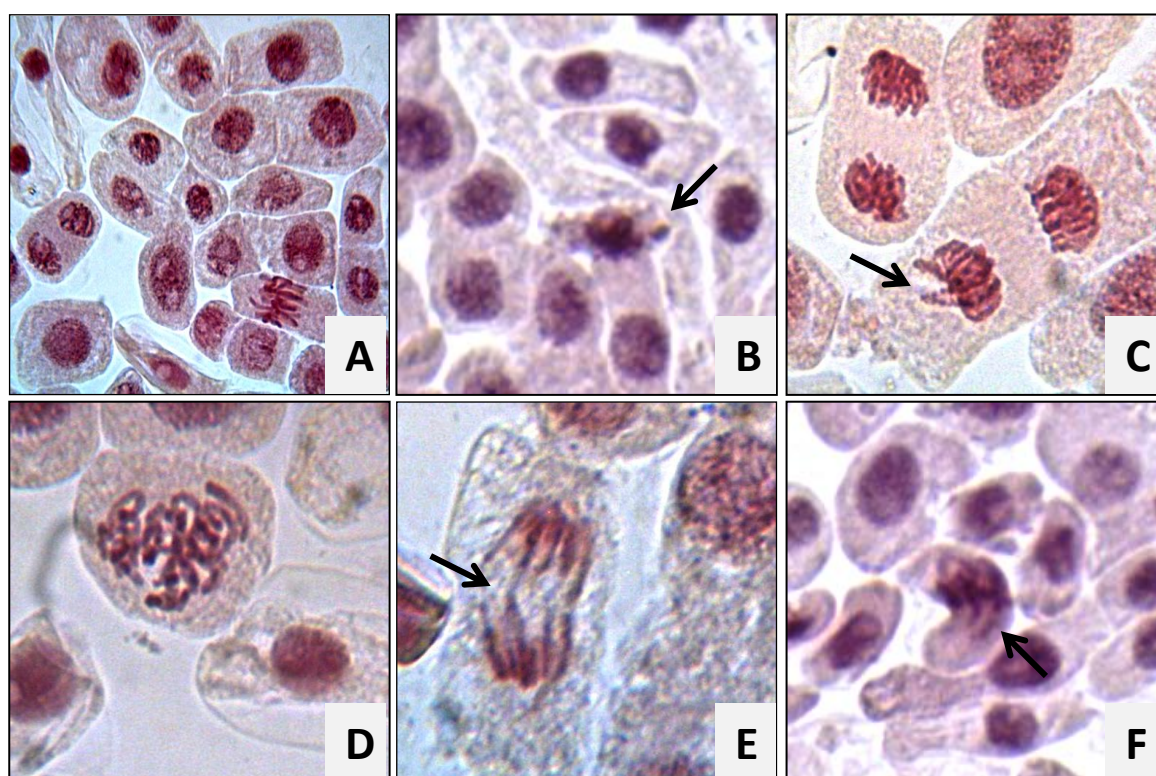


Figura 8 - Fotomicrografias de microscopia óptica células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de marinobufagina após 72 h de exposição. (A) células sem alterações cromossômicas expostas a água desclorificada (controle negativo); (B) micronúcleo; (C) atraso cromossômico; (D) C-metáfase; (E) ponte cromossômica; (F) quebra cromossômica. Aumento de 400X.

Embora haja grandes diferenças no que diz respeito aos efeitos genotóxicos e potências tóxicas agudas de fármacos em plantas e animais superiores, como taxas de absorção, diferenças espécie-específicas na reparação de lesões de DNA e na capacidade de desintoxicação (MAJER et al., 2005), o presente estudo revelou ações clastogênicas semelhantes em células de S180 e meristemáticas de raiz de *A. cepa*, sugerindo que o mecanismo de ação da marinobufagina atua em processos celulares comuns às células eucarióticas.

3.2 Atividade antitumoral *in vivo*

No desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias para o tratamento do câncer, um dos maiores desafios é o estabelecimento de modelos pré-clínicos *in vivo* preditivos da atividade em seres humanos (VENDITTI et al., 1983; TROIANI et al., 2008). Os modelos murinos tornaram-se essenciais em muitos laboratórios por serem acessíveis e pela aplicação eficiente para o entendimento da biologia do câncer empregando esses sistemas (OCANA et al., 2010; COOK; JODRELL; TUVESON, 2012). Ghazaryan et al. (2015) investigou por meio deste modelo o efeito antitumoral do veneno de uma importante espécie de uma cobra venenosa da Armênia, sugerindo que a amostra estudada preveniu o crescimento tumoral *in vivo* com baixa toxicidade. Porém, não existem relatos na literatura dos efeitos antitumorais *in vivo* e/ou do mecanismo de ação da marinobufagina em modelos *in vivo*.

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do composto isolado do veneno de *R. marina*, foi usado, inicialmente, camundongos Swiss transplantados com células tumorais de Sarcoma 180, um modelo experimental de sarcoma murino amplamente utilizado na busca de potencialidades terapêuticas, sobretudo, produtos com ação antitumoral. Assim, as células de Sarcoma 180 estão entre as primeiras linhagens celulares a serem transplantadas por inoculação subcutânea em animais e as mais utilizadas nas pesquisas que envolvem tumor experimental (ASSEF et al., 2002; LEE et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2006; FERREIRA et al., 2016).

Quando é inoculado pela via intramuscular, as células de S180 dão origem a tumor sólido e quando inoculado no peritônio origina um tumor ascítico, crescendo rapidamente em 90% dos animais inoculados, mas regride em 8-10% dos casos (ASSEF et al., 2002). Schabel et al. (1977) mostrou que melhores resultados dependem do procedimento de tratamento, o qual deve ser iniciado dentro de 48 h

após o transplante do tumor. Neste período, as células tumorais já iniciaram a formação de nódulos tumorais. Com base nestes achados, o tratamento foi realizado dentro de 24 h após a inoculação com S180. Os resultados da avaliação da atividade antitumoral dos camundongos transplantados com células tumorais de Sarcoma 180 e tratados com a substância isolada do veneno de anfíbios podem ser observados na **figura 9**. As duas doses testadas da marinobufagina (2,5 e 5 mg/kg) não inibiram o crescimento tumoral *in vivo* (0.97 ± 0.28 e 0.66 ± 0.21 g, respectivamente), quando comparadas ao controle negativo (0.73 ± 0.12 g), enquanto que o quimioterápico 5-fluorouracil, utilizado com controle positivo, reduziu significativamente o crescimento da massa tumoral para 0.26 ± 0.05 g.

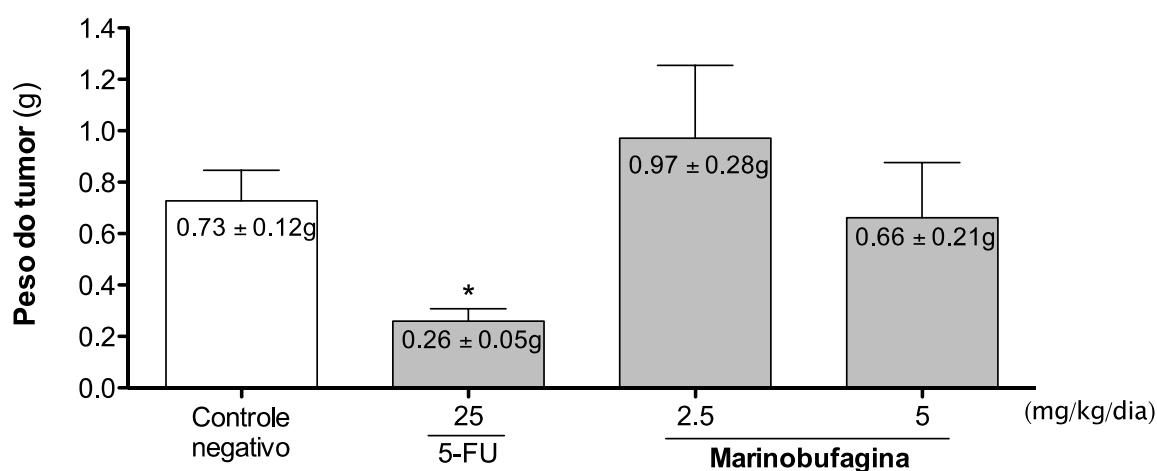


Figura 9 – Atividade antitumoral da marinobufagina em camundongos Swiss fêmeas transplantadas com o Sarcoma 180 e tratadas por via intraperitoneal (2,5 e 5 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da amostra (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/Kg/dia) foi usado como controle positivo. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0.05$ comparado com o controle negativo por análise de variância (ANOVA), seguido de Student Newman-Keuls.

A avaliação histopatológica do Sarcoma 180 (**Figura 10A**) evidenciou um tecido parenquimatoso com grandes placas de células tumorais circundadas por um escasso estroma conjuntivo, pouco vascularizado e sem cápsula definida. A massa neoplásica apresentou 1-2 terços de áreas necróticas distribuídas difusamente, circundadas por infiltrado inflamatório brando e misto (de neutrófilos degenerados e leucócitos mononucleares) e com vasos sanguíneos periféricos dilatados e

congestos. As células se apresentaram com morfologia pleomórfica e com hipercromasia nuclear, grande número de mitoses com características normais e atípicas e relação núcleo-citoplasma de 1:2 e 1:1, o que evidencia um padrão anaplásico celular. Tais achados foram mais evidentes no grupo controle negativo, mas também esteve presente nos outros grupos e confirmam estudos microscópicos que mostraram células redondas e poliédricas, de citoplasma basófilo, com anisocariose, binucleação, mitoses frequentes, diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear, alterações na condensação da cromatina e estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor com necrose central (ZUCKERBERG, 1973; KAWAKUBO et al., 1980; FERREIRA et al., 2015, 2016).

As características histológicas da massa tumoral do grupo tratado com a dose de 2,5 mg/kg/dia em relação as do grupo controle revelaram uma extensa área de necrose e presença de células tumorais invadindo a musculatura esquelética do tecido em que foi implantado as células tumorais (**Figura 10C**). Observou-se congestão mais intensa dos vasos neoplásicos e hemorragia multifocal na periferia da massa tumoral e em seu interior. Enquanto isso, a massa tumoral dos animais tratados com a dose de 5 mg/kg/dia (**Figura 10D**) mostrou um parênquima mais rarefeito, com diminuição da população celular neoplásica e infiltrado inflamatório mononuclear mais pronunciado (macrófagos e linfócitos) em relação ao do grupo controle. Linfonodo regional com hiper-reatividade e hiperplasia de folículos linfóides foi detectado. As características histológicas diferenciais da massa tumoral do grupo tratado com 5-FU em relação ao do grupo controle revelaram áreas difusas de necrose com infiltração adipogênica significativa (**Figura 10B**), provavelmente devido à morte das células neoplásicas e substituição tecidual por tecido adiposo.

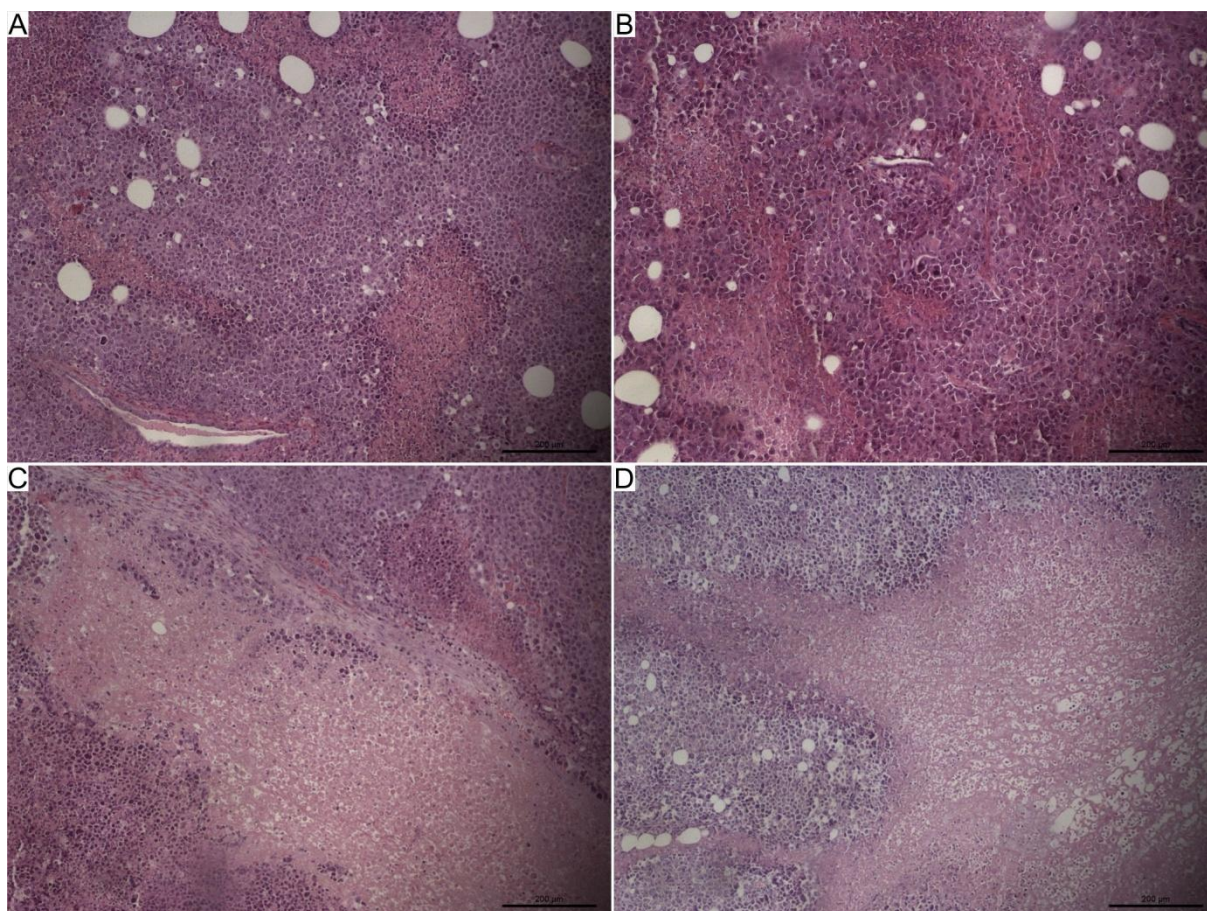


Figura 10 – Análise histológica dos tumores Sarcoma 180 de camundongos (*Mus musculus*) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 25 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2,5 (C) e 5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 100x.

Uma vez que estudos anteriores sugerem células murinas como pouco sensíveis aos bufadienólídeos (GAO et al., 2011; TOUZA et al., 2011; BANULS et al., 2013a; LAURSEN et al., 2015), a ausência de atividade antitumoral *in vivo* corrobora a literatura, pois células de S180 também não revelaram sensibilidade citotóxica à marinobufagina usando o ensaio Alamar Blue, embora alterações apoptóticas e danos genômicos tenham verificados em baixa extensão mas de forma estatisticamente significativa no ensaio do CBMN. Diante disso, células tumorais humanas de carcinoma de cólon da linhagem HCT-116 foram usadas para avaliar a ação anticâncer em modelo xenográfico da linhagem CB17 SCID.

Os modelos tumorais xenográficos são desenvolvidos a partir de implantes dos tumores humanos em camundongos imunologicamente comprometidos, os quais não apresentam linfócitos T e B, permitem o desenvolvimento do tumor de células de espécie diferente sem o combate pelo sistema imune e estão entre os sistemas animais mais comumente utilizados na descoberta de fármacos quimioterápicos (PEREIRA et al., 2008; JONG; MAINA, 2010; COOK; JODRELL; TUVESON, 2012; BEZERRA et al., 2015). Tais modelos são considerados homogêneos, de fácil reprodutibilidade e de custo intermediário, mas possui duas desvantagens principais: não permitem o estudo do processo tumorigênico e o câncer é tratado como uma doença celular isolada e não como o resultado da interação tumor-hospedeiro, o que é caracterizado por uma representação diferente da doença humana (JONG; MAINA, 2010; HILLMAN et al., 2010; COOK; JODRELL; TUVESON, 2012).

A **tabela 5** apresenta o peso dos tumores e o percentual de inibição observado após o tratamento com a marinobufagina. As duas doses testadas (2,5 e 5 mg/kg/dia) reduziram significativamente (26.3 e 46.5 %, $p < 0.05$) o crescimento da massa tumoral (0.59 ± 0.05 g e 0.43 ± 0.04 g, respectivamente) quando comparadas ao grupo controle negativo (0.81 ± 0.10 g).

Tabela 5 – Efeito da marinobufagina após 15 dias de tratamento via intraperitoneal sobre a massa tumoral de camundongos CB17 SCID inoculados com células de carcinoma de cólon HCT-116.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Controle negativo	-	14/15	0.81 ± 0.10	-
5-FU	15	13/15	$0.59 \pm 0.03^*$	26.2*
Marinobufagina	2.5	15/15	$0.59 \pm 0.05^*$	26.3*
	5	14/15	$0.43 \pm 0.04^*$	46.5*

*Valores correspondem à média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

A avaliação histopatológica do tumor HCT-116 (**Figura 11A**) mostrou um parênquima contendo aglomerados compactos de células tumorais de aspecto ovóide e poliédrico, circundadas por um denso estroma conjuntivo vascularizado. A massa neoplásica apresenta um padrão de crescimento anárquico, com células apresentando características anaplásicas como hiper Cromasia nuclear, nucléolos evidentes, grande número de figuras de mitoses atípicas e aberrantes (mitose explosiva, ou com três fusos) e relação núcleo-citoplasma 1:1. Observou-se a presença de vários vasos neoformados neoplásicos, o que justifica as áreas focais de hemorragia, e infiltrado linfocitário ao redor dos nódulos de células tumorais.

As características histológicas da massa tumoral dos animais tratados com a marinobufagina na dose de 2,5 mg/kg/dia em relação ao grupo controle revelaram áreas multifocais de necrose lítica e intensa hemorragia e deposição de fibrina (**Figura 11C**). Ao redor das áreas necróticas observou-se macrófagos espumosos (*foam cells*). Com relação ao grupo marinobufagina 5 mg/kg/dia, as características histológicas diferenciais da massa tumoral mostraram um parênquima celular tumoral mais rarefeito em relação ao do grupo controle, com diminuição da população celular neoplásica devido a necrose, entremeada por focos de hemorragia e infiltrado inflamatório mononuclear mais pronunciado (macrófagos e linfócitos) (**Figura 11D**). O grupo tratado com 5-FU (15 mg/kg/dia, **Figura 11B**) mostrou áreas difusas e mais extensas de necrose e hemorragia localizadas na porção central da neoformação, associada a infiltração adipogênica significativa quando comparadas com o grupo controle (**Figura 11A**).

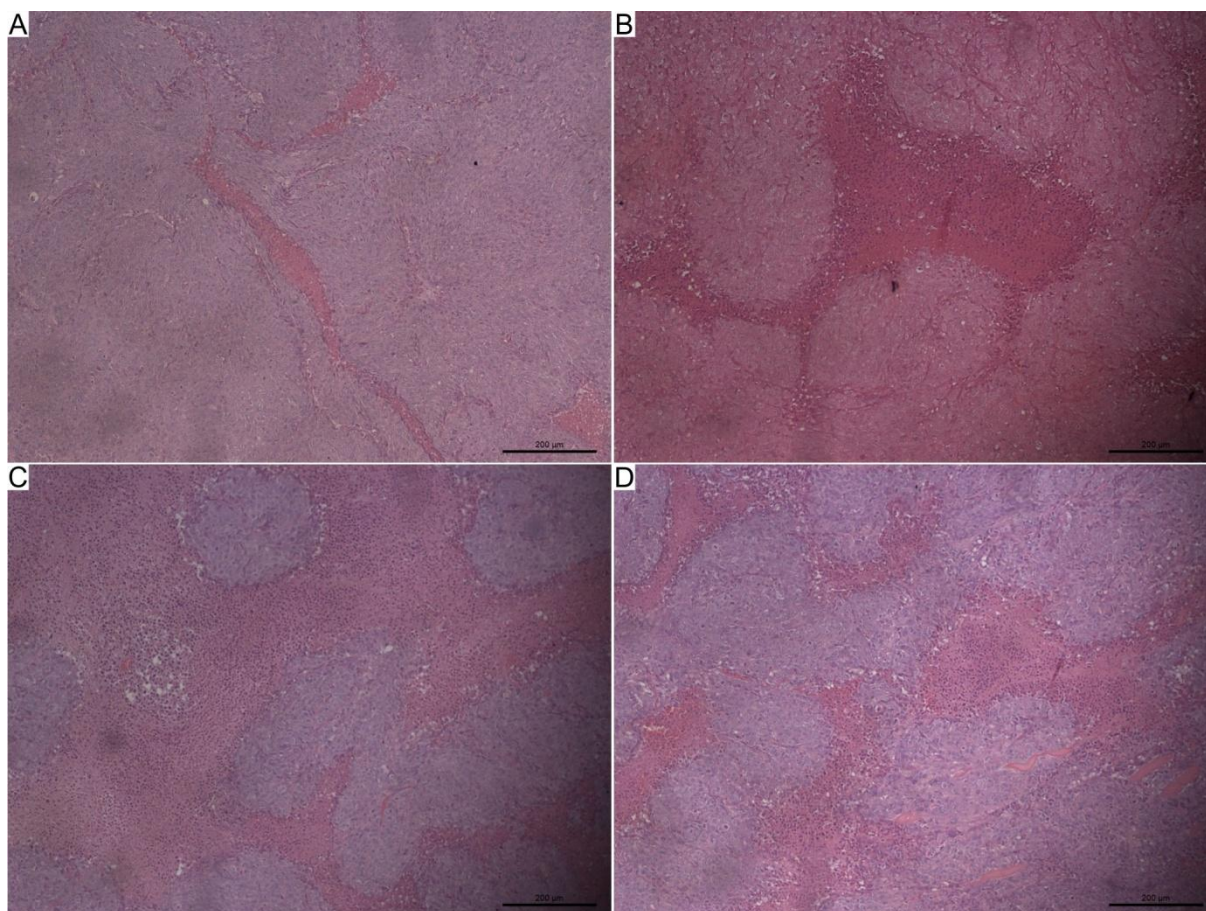


Figura 11 – Análise histológica dos tumores HCT-116 de camundongos imunodeficientes tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). O quimioterápico 5-Fluorouracil, na dose de 15 mg/kg/dia, foi usado como controle positivo (B). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2,5 (C) e 5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 100x.

A linhagem celular HCT-116 foi previamente estudada como um modelo de câncer de cólon humano ortotópico invasivo e metastático. A caracterização do comportamento dessa linhagem revelou crescimento tumoral primário no primeiro dia pós-implantação. No modelo xenográfico de tumor ortotópico, as células tumorais são implantadas no mesmo sítio de origem do tumor, enquanto que no modelo heterotópico ou ectópico (como no presente estudo), as células são inoculadas em um sítio anatômico diferente da sua origem, o qual apresenta como uma das principais vantagens a possibilidade de uso de células tumorais humanas. No modelo ortotópico com células HCT-116 entre duas e quatro semanas pós-implantação, os animais apresentaram massa abdominal palpável e evidente

disseminação peritoneal do tumor após quatro semanas, e por 4 semanas foram encontradas evidências de metástases hepáticas. Modelos xenográficos subcutâneos geram dados sobre o crescimento do tumor em tempo relativamente curto para análise, mas não permitem coletar dados sobre tumores secundários uma vez que raramente metastatizam (RAJPUT et al., 2008; JUNG, 2014).

Estudos indicam que os fármacos que revelam atividade em mais de um terço dos modelos xenográficos, mostraram maior probabilidade em apresentar atividade anticâncer em pelo menos um dos testes clínicos empregados de Fase II quando comparados àqueles que não alcançaram o nível de eficácia exigido nos xenográficos (DECKER et al., 2004). A cinobufotalina, um bufadienolídeo extraído das secreções da pele de sapos que compõem a medicina tradicional chinesa e utilizada como agente cardiotônico, diurético e hemostático, inibiu o crescimento tumoral da linhagem celular A549 em modelo de tumor xenográfico de pulmão (KAI et al., 2014). A bufalina também exibiu efeito antitumoral significativo após transplante ortotópico de carcinoma hepatocelular humano em camundongos *nude* (HAN et al., 2007; GAO et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

A molécula marinobufagina apresentou uma notável capacidade citotóxica contra linhagens tumorais humanas, inibiu a proliferação celular de raízes de *Allium cepa*, parando-as em intérfase, causou danos cromossômicos em células meristemáticas radiculares e de Sarcoma 180 *in vitro* e revelou, pela primeira vez, ação antitumoral *in vivo* contra células tumorais humanas, cuja diminuição da população celular neoplásica devido à necrose entremeada por focos de hemorragia e pronunciado infiltrado inflamatório mononuclear foi evidente, embora a marinobufagina tenha sido ineficaz contra o crescimento *in vivo* do tumor Sarcoma 180.

REFERÊNCIAS

- AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1304-1309, 2007.
- ASSEF, M. L. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; MORETÃO, M. P.; AZAMBUJA, A. P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D. F. Histological and immunohistochemical evaluation of sarcoma 180 in mice after treatment with an α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal of Morphological Sciences**, v. 19, p. 49–54, 2002.
- BANULS, L. M. Y.; URBAN, E.; GELBCKE, M.; DUFRASNE, F.; KOPP, B.; KISS, R.; ZEHL, M. Structure–activity relationship analysis of bufadienolide-induced *in vitro* growth inhibitory effects on mouse and human cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1078-1084, 2013a.
- BANULS, L. M.; KATZ, A.; MIKLOS, W.; CIMMINO, A.; TAL, D. M.; AINBINDER, E.; ZEHL, M.; URBAN, E.; EVIDENTE, A.; KOPP, B.; BERGER, W.; FERON, O.; KARLISH, S.; KISS, R. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar *in vitro* growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na^+/K^+ -Atpase. **Molecular Cancer**, v. 26, p. 12-33, 2013b.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444–447, 2007.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacology Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; MACHADO, C. M. L.; AQUINO, N. C.; SILVEIRA, E. R.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C. Antitumour Efficacy of *Piper tuberculatum* and Piplartine Based on the Hollow Fiber Assay. **Planta Medica**, v. 81, p. 15-19, 2015.
- BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus project. **Mutation Research**, v. 543, p. 155-166, 2003.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 1612-1661, 2014.

CHEQUER, F. M. D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

COOK, N.; JODRELL, D. I.; TUVESON, D. A. Predictive *in vivo* animal models and translation to clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 253-260, 2012.

COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 33-43, 2005.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R. O.; RODRIGUES, F. A.; DOS SANTOS, M. L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339–348, 2010.

CUNHA FILHO, G. A.; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES Jr, O. R.; LEITE, J. R. S.; BLOCH, C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secreton of toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777-782, 2005.

DE RAINHO, C. R.; KAEZER, A.; AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in N-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 925-932, 2010.

DECKER, S.; HOLLINGSHEAD, M.; BONOMI, C. A.; CARTER, J. P.; SAUSVILLE, E. A. The hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 821–826, 2004.

DONG, Y.; TIN, S.; LI, J.; JIANG, C.; YE, M.; HU, H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. **Apoptosis**, v. 16, p. 394-403, 2011.

FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084–1104, 2007.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, H.; NATARAJAN, A. T.; SURRELLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–132, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, M. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASE, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SHINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43–51, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 313-330, 2015.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; DA COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R.; ALENCAR, N. M.; FIGUEIREDO, I. S.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270–279, 2016.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 11–16, 2002.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, p. 1237-1266, 2007.

GAO, H.; POPESCU, R.; KOPP, B.; WANG, Z. Bufadienolides and their antitumor activity. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 953–969, 2011.

GHAZARYAN, N. A.; GHULIKYAN, L. A.; KISHMIRYAN, A. V.; KIRAKOSYAN, G. R.; NAZARYAN, O. H.; GHEVONDYAN, T. H.; ZAKARYAN, N. A.; AYVAZYAN, N. M. Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 764, p. 340–345, 2015.

GÖMÜRGEN, A. N. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. **Cytologia**, v. 70, p. 119-128, 2005.

GRANKVIST, K.; LERNMARK, A.; TALJEDAL, I. B. Alloxan cytotoxicity in vitro. Microscope photometric analyses of Trypan Blue uptake by pancreatic islet cells in suspension. **Biochemical Journal**, v. 162, p. 19–24, 1977.

HAN, K.; HUAN, G.; GU, W.; SU, Y. H.; HUANG, X. Q.; LING, C. Q. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 3374-3379, 2007.

HILLMAN, G. G.; SINGH-GUPTA, V.; AL-BASHIR, A. K.; ZHANG, H.; YUNKER, C. K.; PATEL, A. D.; SETHI, S.; ABRAMS, J.; HAACKE, E. M. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of sunitinib-induced vascular changes to schedule chemotherapy in renal cell carcinoma xenograft tumors. **Translational Oncology**, v. 3, p. 293-306, 2010.

HUMPAGE, A. R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I. R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, v. 472, p. 155-161, 2000.

HUTCHINSON, D. A.; MORI, A.; SAVITZKY, A. H.; BURGHARDT, G. M.; WU, X.; MEINWALD, J.; SCHOROEDER, F. C. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 2265-2270, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

JACOCIUNAS, L. V.; ANDRADE, H. H.; LEHMANN, M.; DE ABREU, B. R.; FERRAZ, A. B.; DA SILVA, J.; GRIVICICH, I.; DIHL, R. R. Artichoke induces genetic toxicity in the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) cytome assay. **Food and chemical toxicology**, v. 55, p. 56–59, 2013.

JONG, M.; MAINA, T. Of mice and humans: are they the same? - Implications in cancer translational research. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, p. 501-504, 2010.

JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assesment of anticancer drug development. **Toxicological Research**, v. 30, p. 1- 5, 2014.

KAI, S.; LU, J. H.; HUI, P. P; ZHAO, H. Pre-clinical evaluation of cinobufotalin as a potential anti-lung cancer agent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, p. 768–774, 2014.

KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; NOGAWA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SEGAWA, T.; YUKITA, A.; SAITO, K.; KATSUYAMA, M.; PETTIT, G. R. QSAR evaluation of the *Chan'Su* and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5440-5447, 2002.

KAWAKUBO, Y; KOMIYAMA, K.; UMEZAWA, I.; NISHIYAMA, Y. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113-118. 1980.

KERKHOFF, J.; NORONHA, J. C.; BONFILIO, R.; SINHORIN, A. P.; RODRIGUES, D. J.; CHAVES, M. H.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Quantification of bufadienolides in the poisons of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* by HPLC-UV. **Toxicon**, v. 119, p. 311–318, 2016.

KINGHORN, A. D.; BLANCO, E. J. C.; LUCAS, D. M.; RAKOTONDRAIBE, H. L.; ORJALA, J.; SOEJARTO, D. D.; OBERLIES, N. H.; PEARCE, C. J.; WANI, M. C.; STOCKWELL, B. R.; BURDETTE, J. E.; SWANSON, S. M.; FUCHS, J. R.; PHELPS, M.A.; XU, L.; ZHANG, X.; SHEN, Y. Y. Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. **Anticancer research**, v. 36, p. 5623–5638, 2016.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDIER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 873–899, 2011.

KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal and plant sources. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1-29, 1998.

KRYSKO, D. V.; VANDEN, B. T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

LAURSEN, M.; GREGERSEN, J. L.; YATIME, L.; NISSEN, P.; FEDOSOVA, N. U. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺/K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 112, p. 1755-1760, 2015.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 Strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v. 52, p. 371–375, 2003.

LEE, S.; LEE, Y.; CHOI, Y. J.; HAN, K-S.; CHUNG, H. W. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of Chan Su, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 372-376, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In-vitro* and *in-vivo* antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 235–241, 2006.

MAJER, B. J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 33, p. 45–55, 2005.

MISIK, M.; PICHLER, C.; RAINER, B.; FILIPIC, M.; NERSESYAN, A.; KNASMUELLER, S. Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: Possible impact on the environment. **Environmental Research**, v. 135, p. 196–203, 2014.

MIJATOVIC, T.; QUAQUEBEKE, E. V.; DELEST, B.; DEBEIR, O.; DARRO, F.; KISS, R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1776, p. 32-57, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, p. 655-669, 2008.

NEVES, E. S. B.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, L. H. G. M.; PERON, A. P. Action of aqueous extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1131-1136, 2014.

NOGAWA, T.; KAMANO, Y.; YAMASHITA, A.; PETTIT, G. R. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1148-1152, 2001.

NUGENT, R. Chronic diseases in developing countries: Health and economic burdens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1136, p. 70–79, 2008.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421–5426, 2000.

OCANA, A.; PANDIELLA, A.; SIU, L. L.; TANNOCK, I. F. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, p. 200-209, 2010.

OGASAWARA, M.; MATSUBARA, T.; SUZUKI, H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 720-723, 2001.

PANDEY, H.; KUMAR, V.; ROY, B. K. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 300-308, 2014.

PEREIRA, A.; ARAUJO, R. S.; BRITO, R. R.; XAVIER, J. G.; BONDAN, E. F.; PEREIRA, J.; LALLO, M. A. Camundongos imunossuprimidos farmacologicamente como modelo para estudo de infecções parasitárias oportunistas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 292-295, 2008.

PESNYA, D. S.; ROMANOVSKY, A. V. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 750, p. 27-33, 2013.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18-25, 2016.

QI, F.; INAGAKI, Y.; GAO, B.; CUI, X.; XU, H.; KOKUDO, N.; LI, A.; TANG, W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways *Cancer Sciences*, v. 102, p. 951–958, 2011.

RADJASA, O. K.; VASKE, Y. M.; NAVARRO, G.; VERVOORT, H. C.; TENNEY, K.; LININGTON, R. G.; CREWS, P. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6658–6674, 2011.

RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A.; JEYASSULAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v. 44, p. 1-17, 2004.

RAJPUT, A.; SAN MARTIN I. D.; ROSE, R.; BEKO, A.; LEVEA, C.; SHARRATT, E.; MAZURCHUK, R.; HOFFMAN, R. M.; BRATTAIN, M. G.; WANG, J. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 276-281, 2008.

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISEY, M. T. Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 52, p. 237-292, 2007.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R.; The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA: Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89-96, 1993.

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

RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003, p. 201-223.

SABINI, M. C.; CARIDDI, L. N.; ESCOBARA, F. M.; BACHETTI, R. A.; SUTIL, S. B.; CONTIGIANI, M. S.; ZANON, S. M.; SABINI, L. I. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 995-998, 2011.

SANTANA, G. M.; DEUS, M. S. M.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M. P.; FERNANDES, H. B.; PERON, A. P. Antimitotic and antimutagenic action of the *Hymenaea stigonocarpa* bark on dividing cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 520-525, 2016.

SCHABEL, F. M.; GRISWOLD JR, D. J.; LASTER, W. R.; CORBETT, T. H.; LLOYD, H. H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 1, p. 411-435, 1977.

SCHEINICHEN, D.; JANKOWSKI, M.; RUSCHULTE, H.; JUTTNER, B.; KLEINE, H. D.; MEYER, Z. U.; VILSENDORF, A.; PIEPENBROCK, S.; HEINE, J. Lack of influence of omega-3 fatty acid-enriched lipids on apoptosis and secondary necrosis of cultured human lymphocytes. **Nutrition**, v. 19, p. 441-445, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; SOUSA-JUNIOR, P.T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new arginyl bufadienolide esters from the "cururu" toad *Rhinella (Bufo) schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1076- 1085, 2014.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; ARANA, G. V.; THEODULOZ, C.; URRRA, F. A.; CÁRDENAS, C. Antiproliferative activity and chemical composition of the venom from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae). **Toxicon**, v. 121, p. 119-129, 2016.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; GOMEZ, C. V.; ARIAS, A. R.; BURGOS-EDWARDS, A.; ALFONSO, J.; ROLON, M.; BRUSQUETTI, F.; NETTO, F.; URRRA, F. A.; CÁRDENAS, C. The Paraguayan *Rhinella* toad venom: Implications in the traditional medicine and proliferation of breast cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 106-118, 2017.

SCHOONEN, W. G. E. J.; STEVENSON, J. C. R.; WESTERINK, W. M. A.; HORBACH, G. J. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 511-525, 2012.

SCIANI, J. M.; DE-SÁ-JÚNIOR, P. L.; FERREIRA, A. K.; PEREIRA, A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; PIMENTA, D. C. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 10-18, 2013.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, p. 1307-1320, 1998.

SOUZA, L. C. M. **Avaliação do teste de micronúcleo em linfócitos para uso como biomarcador de risco de câncer em usuários de esteróides anabolizantes androgênicos**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2013.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5892-5908, 2005.

SU, J.; XU, Z. J.; YE, M. S. An experimental study of bladder cancer cell apoptosis induced by cinobufacin. **Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 25, p. 351-353, 2009.

SUDHAKAR, R.; NINGE, K. N. G.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **The Japan Mendel Society**, v. Cytologia 66, p. 235-239, 2001.

SULERIA, H. A. R.; GOBE, G.; MASCI, P.; OSBORNE, S. A. Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 44-55, 2016.

THUN, M. J.; DELANCEY, J. O.; CENTER, M. M.; JEMAL, A.; WARD, E. M. The global burden of cancer : priorities for prevention. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 100-110, 2010.

TOUZA, N. A.; PÓÇAS, E. S.; QUINTAS, L. E.; CUNHA-FILHO, G.; SANTOS, M. L.; NOEL, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotoxic steroids on Na⁺/K⁺-ATPase activity in human kidney membrane preparation. **Life Sciences**, v. 88, p. 39-42, 2011.

TROIANI, T.; SCHETTINO, C.; MARTINELLI, E.; MORGILLO, F.; TORTORA, G.; CIARDIELLO, F. The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 65, p. 200-211, 2008.

VENDITTI, J. M. The National Cancer Institute antitumor drug Discovery program, current and future perspectives: a commentary. **Cancer Treatment Reviews**, v. 67, p. 767-772, 1983.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 575-587, 2008.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.:

medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598, 2001.

WANG, D.; BI, Z. Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway. **Tumor Biology**, v. 35, p. 4885-4890, 2014.

YEH, J. Y.; HUANG, W. J.; KAN, S. F.; WANG, P. S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p. 112-124, 2003.

ZHANG, J. T.; YU, K. F. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. **JAMA**, v. 280, p. 1690-1691, 1998.

ZUCKERBERG, C. Ultraestructura of Sarcoma 180. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 33, p. 2278- 2282, 1973.

CAPÍTULO III

Toxicidade da molécula Marinobufagina: parâmetros celulares e sistêmicos

(Previsão de submissão: *Journal of Ethnopharmacology* – Qualis A2)

Toxicidade da molécula Marinobufagina: parâmetros celulares e sistêmicos

Lívia Queiroz de Sousa^a, Nárcia Mariana Fonseca Nunes^a, Jurandy do Nascimento Silva^b, Carla Lorena Silva Ramos^a, Gardênia Carmen Gadelha Militão^c, Daniel Pereira Bezerra^d, Milena Botelho Pereira Soares^d, Ana Carolina Borges da Cruz Rodrigues^d, Mariana Helena Chaves^e, Gerardo Magela Vieira-Júnior^e, Emanuelle Karine Frota Batista^f, Márcia dos Santos Rizzo^g, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,h*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

^c Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal do Pernambuco, 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^d Fundação Oswaldo Cruz, 40.296-710, Salvador, Bahia, Brasil.

^e Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

^f Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

^g Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil

^h Departamento de Biofísica e Fisiologia, Laboratório de Cancerologia Experimental, Universidade Federal do Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Os animais produtores de toxinas são considerados importantes fontes de substâncias farmacológicas. Os anfíbios possuem um arsenal químico com funções principais de defesa contra infecções de microorganismos e predadores. No contexto da terapia antineoplásica, a determinação do potencial toxicológico de novas substâncias antiproliferativas merece grande atenção devido ao risco de efeitos adversos. Assim, uma avaliação toxicológica deve ser realizada para determinar os potenciais efeitos adversos e proporcionar orientações para a seleção de uma dose “segura” para os seres humanos. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar parâmetros toxicológicos e morfológicos em células e animais tratados com o bufadienolídeo marinobufagina isolado do veneno do sapo *Rhinella marina*. Para avaliar a toxicidade da marinobufagina em células normais, utilizou-se os métodos de MTT e Alamar Blue. Diante disso, três tipos de células normais foram avaliadas: uma linhagem murina (L-929), uma linhagem de macaco (BGMK) e cultura primária de leucócitos humanos (CMSP). Realizou-se um *screening* do perfil de toxicidade aguda da marinobufagina e prosseguiu-se para estudos de toxicidade subaguda em camundongos Swiss após tratamento durante 7 dias nas doses de 2.5; 5 e 7.5 mg/kg/dia e camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados por 15 dias consecutivos, nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia. O composto apresentou ação antiproliferativa em CMSP com CI_{50} de 4.35 (2.49 - 7.75) $\mu\text{g/mL}$, no entanto essa atividade é até 72.5 vezes maior contra células leucêmicas, enquanto que as linhagens L-929 (fibroblasto murino) e BGMK não mostraram sensibilidade à marinobufagina ($> 10 \mu\text{g/mL}$). Os resultados do *screening* demonstraram que 2 dos 3 animais tratados com a dose de 10 mg/kg da marinobufagina apresentaram alterações comportamentais semelhantes a crises convulsivas. Porém, nenhuma morte foi detectada. Nos estudos de toxicidade subaguda, apenas as maiores doses (7.5 e 5 mg/kg/dia) foram capazes de reduzir o peso corporal dos animais (28.9 ± 0.6 e 18.1 ± 0.7 g, $p < 0.05$) e alterações no peso relativo dos órgãos não foram detectadas ($p > 0.05$). Em relação aos parâmetros séricos de camundongos CB17 SCID, observou-se um aumento dos níveis de creatinina em ambas as doses (2.5 mg/kg/dia: 0.87 ± 0.06 mg/dL e 5 mg/kg/dia: 0.95 ± 0.08 mg/dL) quando comparadas ao controle negativo (0.65 ± 0.07 mg/dL, $p < 0.05$). Uma vez que os animais tratados apresentaram redução de peso, decidiu-se avaliar se a substância altera o trânsito intestinal. Assim, a marinobufagina (2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia i.p., $p > 0.05$) não alterou a distância percorrida pelo carvão ativado (77.3 ± 3.2 , 85.4 ± 4.1 e 90.7 ± 5.7 %) quando comparada ao controle negativo (78.6 ± 4.4 %). Realizou-se ainda uma avaliação histológica de órgãos-chave para ajudar a elucidar o potencial tóxico do composto. Em suma, a marinobufagina demonstrou citotoxicidade em células mononucleares normais humanas, foi inativa contra fibroblastos de camundongos e células de rim de macaco, não induziu alterações hematológicas nem alterou o trânsito intestinal, mas causou aumento dos níveis séricos de creatinina em camundongos após 15 dias de tratamento. Em conjunto com as análises teciduais, os resultados dos testes *in vivo* revelaram toxicidade branda até a concentração de 7.5 mg/kg/dia, alterações histológicas renais e hepáticas reversíveis e ação epileptogênica na dose de 10 mg/kg.

Palavras-chave: Parâmetros Hematológicos. Histopatologia. Motilidade intestinal.

Toxicity of the Marinobufagin molecule: cellular and systemic parameters

ABSTRACT

The toxin-producing animals are considered important sources of pharmacological substances. Amphibians have a chemical arsenal with main functions of defense against predators and infections of microorganisms. In the context of antineoplastic therapy, the determination of the toxicological potential of new antiproliferative substances deserves great attention due to the risk of adverse effects. Thus, a toxicological evaluation must be performed to determine the potential adverse effects and provide orientations for the selection of a "safe" dose for humans. This way, the present study aimed to evaluate toxicological and morphological parameters in cells and animals treated with the bufadienolide marinobufagin isolated from the toad poison of *Rhinella marina*. To evaluate the toxicity of marinobufagin in normal cells, it was used the methods of MTT and Alamar Blue. Three types of normal cells were evaluated: a murine line (L-929), a monkey line (BGMK) and a primary human leukocyte culture (PBMC). It was made a screening of the acute toxicity profile of marinobufagin. Then, it was procced subacute toxicity studies with Swiss mice after 7 days of treatment with doses of 2.5; 5 and 7.5 mg/kg/day and immunodeficient mice of the CB17 SCID lineage treated for 15 consecutive days at doses of 2.5 and 5 mg/kg/day. The compound showed antiproliferative action on PBMC with IC_{50} of 4.35 (2.49 - 7.75) $\mu\text{g/ml}$. This activity is up to 72.5 times higher against leukemic cells, whereas the L-929 (murine fibroblast) and BGMK strains showed no sensitivity to marinobufagina ($> 10 \mu\text{g/mL}$). The screening results showed that 2 of the 3 animals treated with the dose of 10 mg/kg of marinobufagin had behavioral changes similar to seizures. However, no death was observed. In the subacute toxicity studies, only the highest doses (7.5 and 5 mg/kg/day) were able to reduce the body weight of the animals (28.9 ± 0.6 and 18.1 ± 0.7 g, $p < 0.05$), and it was not detected changes in relative weight of organs ($p > 0.05$). In relation to the serum parameters of CB17 SCID mice, an increase in creatinine levels was observed in both doses (2.5 mg/kg/day: 0.87 ± 0.06 mg/dL and 5 mg/kg/day: 0.95 ± 0.08 mg/dL) when compared to the negative control (0.65 ± 0.07 mg/dL, $p < 0.05$). Once the treated animals presented weight reduction, it was decided to evaluate if the substance changes the intestinal transit. The marinobufagin (2.5, 5 and 7.5 mg/kg/day i.p., $p > 0.05$) did not change the distance travelled by activated carbon (77.3 ± 3.2 , 85.4 ± 4.1 and $90.7 \pm 5.7\%$) when compared to the negative control ($78.6 \pm 4.4 \%$). A histological evaluation of key organs was also performed to help to elucidate the toxic potential of compound. In summary, marinobufagin demonstrated cytotoxicity in normal human mononuclear cells, was inactive against mouse fibroblasts and monkey kidney cells, did not induce hematological changes or alter intestinal transit, but caused increased serum creatinine levels in mice after 15 days of treatment. The combination of the tissue analyzes and the *in vivo* test results revealed mild toxicity up to 7.5 mg/kg/day, reversible renal and hepatic histological changes, and epileptogenic action at the dose of 10 mg/kg.

Keywords: Hematologic Parameters. Histopathology. Intestinal Motility.

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, microorganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Portanto, mais da metade dos novos medicamentos lançados são derivados de produtos naturais, mostrando que essa fonte é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (BRANDÃO et al., 2010; PEREIRA et al., 2015). Dentre estes, os animais produtores de toxinas são considerados importantes fontes de substâncias farmacológicas e amplamente utilizados como recursos medicinais para o tratamento e alívio de enfermidades (COSTA-NETO, 2005).

Os anfíbios, especialmente da família Bufonidae, possuem um arsenal químico que incluem esteróides (bufadienólídeos), alcalóides, aminas biogênicas, derivados guanidínicos e peptídeos farmacologicamente ativos. A pele úmida desses animais, característica importante para as trocas gasosas, torna-se um local propício para a proliferação de microorganismos. Por isso, do ponto de vista evolutivo, os anfíbios desenvolveram como estratégia de defesa, a produção e secreção de toxinas com ações antimicrobianas (bactericida, fungicida e antiviral) e contra predadores (DALY, 1995; DUELLMAN; TRUEB, 1996; CLARKE, 1997; MONTI; CARDELLO, 1999; PRATES; BLOCH-JUNIOR, 2000; OLIVEIRA; PIRES JUNIOR, 2011).

Muitos estudos têm demonstrado o potencial dos bufadienólídeos contra células tumorais em modelos *in vitro* e *in vivo* (LEFRANC et al., 2008; CUNHA-FILHO et al., 2010; LIU et al., 2011; QI et al., 2011; MIJATOVIC et al., 2012; BAÑULS et al., 2013a, 2013b; FERREIRA et al., 2013; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014, 2016, 2017). No contexto da terapia antineoplásica, a determinação do potencial toxicológico de novas substâncias antiproliferativas merece grande atenção devido ao risco de efeitos adversos que estão quase sempre relacionados a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas, o que torna difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, principalmente, para pacientes no estágio avançado da doença, quando os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios e aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (SOUZA et al., 2007). Logo, uma

avaliação toxicológica deve ser realizada para determinar os potenciais efeitos adversos e proporcionar orientações para a seleção de uma dose possivelmente “segura” para os seres humanos (KAMB, 2005; RHIOUANIA et al., 2008; SILVA et al., 2014). O presente estudo avaliou parâmetros toxicológicos e morfológicos em células e animais tratados com o bufadienolídeo marinobufagina isolado do veneno do sapo *Rhinella marina*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta, isolamento e identificação do composto

A coleta da secreção do veneno de sapo de *Rhinella marina* foi realizada no estado do Mato Grosso. Os animais foram identificados pelo professor Dr. Domingos de Jesus Rodrigues (D.J.R. – IBAMA, SISBIO: número 30034-1). Modelos das espécies (*R. marina* - ABAM-H 1262) foram depositadas no Acervo Biológico da Amazônia Meridional (Sinop, Mato Grosso, Brasil). A extração e identificação da molécula marinobufagina (**Figura 1**) foram realizadas conforme Ferreira et al. (2013). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa Animal da Universidade Federal do Mato Grosso (#23108.700260/14-7) e estão em conformidade com as Diretrizes Brasileiras (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e internacionais sobre o tratamento e a utilização de animais em experimentação.

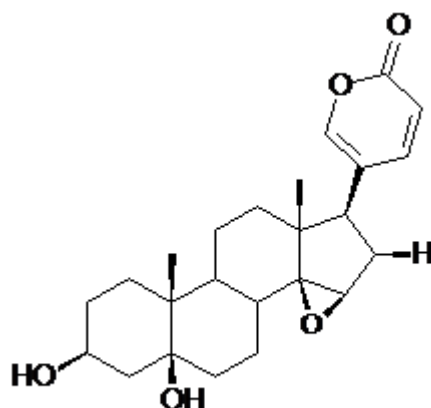


Figura 1 – Estrutura molecular da marinobufagina.

2.2 Determinação da atividade citotóxica *in vitro*

2.2.1 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade citotóxica foram obtidas a partir do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e suas respectivas concentrações de plaqueamento para o teste do MTT estão discriminadas na **Tabela 1**.

As linhagens celulares foram manuseadas em cabine biológica com ambiente estéril e mantidas em incubadora de células a 37 °C e 5% de CO₂ e cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou DMEN suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos para uma concentração final de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão a cada 24 h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco, Brasil) diluída em PBS.

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade do MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Concentração
BGMK	<i>Buffalo green monkey Kindey</i>	0.7 x 10 ⁶ céls/ mL
L-929	Fibroblasto murino	0.1 x 10 ⁶ céls/ mL

2.2.2 Análise de citotoxicidade pelo ensaio do MTT em linhagens normais

A capacidade citotóxica foi determinada usando o método do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5- dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, pela atividade da enzima mitocondrial succinil-desidrogenase presente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; BERRIDGE et al., 1996), permitindo calcular indiretamente a quantidade de células vivas.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços em densidade ajustada para cada linhagem, como mostrado na **Tabela 1**. A substância marinobufagina

(0.004 – 10 µg/mL) foi acrescentada e o quimioterápico Doxorubicina (0.005 – 5 µg/mL) foi usado como controle positivo. Como controle negativo, utilizou-se DMSO 0,1%. Após 69h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram mensuradas através do espectrofotômetro de placa utilizando o programa Mutimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

2.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em cultura primária de células mononucleares do sangue periférico

A atividade do composto marinobufagina em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP) foi investigada utilizando o ensaio Alamar Blue®. Sangue humano heparinizado obtido de voluntários saudáveis, não-fumantes, que não fizeram uso de qualquer droga por pelo menos 15 dias antes da coleta, com idade entre 18-35 anos, foi coletado e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas pelo método padrão de centrifugação de gradiente de densidade por Ficoll Paque®. Todos os estudos foram realizados em conformidade com as diretrizes de pesquisa brasileira (Lei 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde) e com a Declaração de Helsinki.

As células mononucleares de sangue periférico foram isoladas a partir de uma amostra de 2 mL de sangue periférico acrescida de 0,5 mL de PBS estéril. Essa mistura foi adicionada a um tubo falcon com 200 µL de Ficoll (Ficoll Paque® Plus) e submetida à centrifugação (2000 rpm por 30 min) (**Figura 2**). Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro chamada de nuvem de linfócitos foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo. Posteriormente, completou-se com PBS até o volume de 11 mL e centrifugou-se o tubo a 1000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS. As células foram colocadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Fitohemaglutinina (4%) foi adicionada para induzir a

proliferação celular. As células foram incubadas 24 h antes da adição da amostra. Marinobufagina foi adicionada (0.004 – 50 µg/mL) e a placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. O quimioterápico Doxorubicina (0,005 – 5.0 µg/mL) foi utilizado como controle positivo.

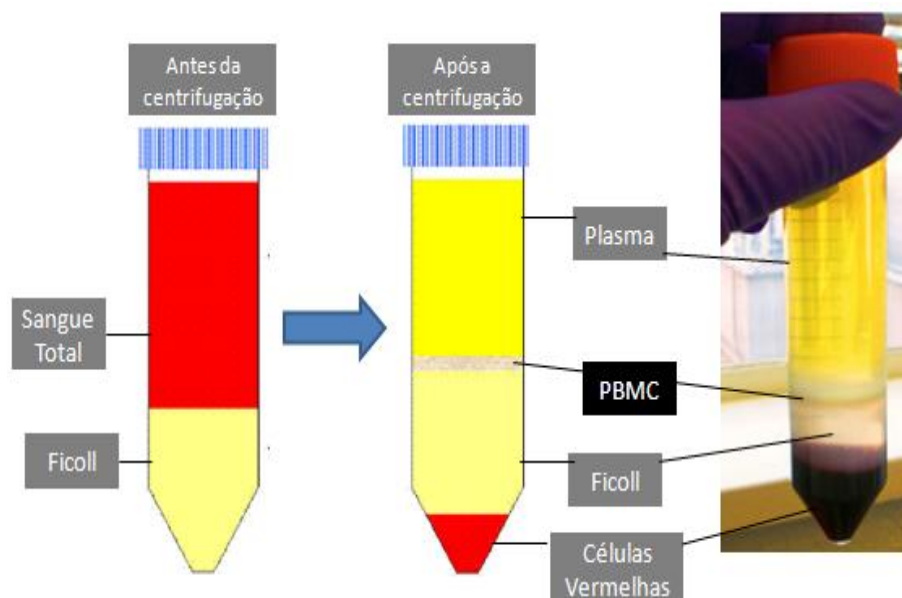


Figura 2 – Isolamento de CMSP por meio da tecnologia de Ficoll Paque® Plus. Fonte: Genetic Resources Core Facility (2017), com adaptações.

Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação de 72 h, 20 µL da solução estoque (0,156 mg/mL) de Alamar Blue foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (PC), utilizou-se a seguinte fórmula: $PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$, onde A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao Alamar Blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (FERREIRA et al., 2013).

2.3 Estudo de toxicidade *in vivo*

2.3.1 Animais

Foram utilizados duas linhagens de camundongos *Mus musculus* do sexo feminino: Swiss e CB17 SCID, ambas com 2 meses de idade e peso variando de 25-30 g. Os camundongos Swiss foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram aclimatados a 25 ± 2 °C e mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm², com ciclo claro/ escuro de 12 h, receberam ração padrão tipo Purina® e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - Protocolo 0133/16) da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Teresina). Os camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID foram provenientes da FIOCRUZ/Bahia. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA - Protocolo 006/2015) no uso de animais do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, FIOCRUZ, Bahia).

2.3.2 Toxicidade aguda

Levando em consideração a minimização da dor e do sofrimento, bem como a garantia da robustez e reprodutibilidade dos estudos, realizou-se a metodologia de toxicidade aguda Classe Tóxica, estabelecida pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD*), número 423 (OECD 423) (OCDE, 2001). Uma vez que estudos prévios já detalham a toxicidade e farmacologia de compostos da classe dos bufadienolídeos, este estudo foi realizado utilizando até a dose 10 mg/kg (NOGUEIRA et al., 2000; ANVISA, 2013).

Antes das administrações, os animais – camundongos Swiss fêmeas - foram aclimatados durante 5 dias no Biotério sectorial de Experimentação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e mantidos em jejum por 4-6h com acesso à água *ad libitum* antes da administração. Uma dose única (1.25, 2.5, 5 ou 10 mg/kg, n=3/grupo) foi administrada via intraperitoneal. O controle negativo recebeu dimetilsulfóxido 5 % em água destilada. Os animais foram alimentados após

2h e observados para detecção de morte e outros sinais e sintomas de toxicidade aos 30 min, 1h, 2h e 4h. Foram avaliados os efeitos sobre: a) Estado de consciência e disposição (frênito vocal e irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) Reflexos (corneal); e) Atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “Straud”, hipnose, anestesia); f) Atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração) (LUCIO et al., 2000).

2.3.3 Toxicidade subaguda em camundongos Swiss

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n= 7 animais/grupo). Como controle negativo, utilizou-se o veículo de diluição da amostra (dimetilsulfóxido 5%). Para a marinobufagina foram estabelecidas as doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, administradas por via intraperitoneal com base nos estudos prévios de toxicidade aguda. O tratamento foi realizado durante 7 dias consecutivos.

Os animais foram pesados antes e após o tratamento e observados quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, letargia e convulsões. Antes da coleta de sangue, os animais foram submetidos a um jejum de 4-6 h. Para a coleta de sangue realizada por punção cardíaca ventricular com seringas estéreis, os animais foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg). Para determinação dos parâmetros hematológicos, o sangue foi acondicionado em tubos contendo anticoagulante e para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, utilizou-se tubos sem anticoagulante. Em seguida, os animais foram eutanasiados por administração de pentobarbital sódico (150 mg/kg) via intraperitoneal e os órgãos (fígado, baço, rins, estômago, coração e pulmões) foram dissecados para análise macroscópica (lesões graves ou alterações de cor e hemorragia) e cálculo do peso relativo.

Para determinação do perfil bioquímico, o material foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros metabólicos: colesterol total, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e glicose. Os ensaios foram realizados em aparelho semi-

automático Labmax 240 com sistemas comerciais da Labtest® e seguindo as orientações do fabricante.

Os valores dos eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados em analisador automático de células hematológicas Advia 120/Hematology Siemens. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões de lâminas coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada lâmina, 100 células foram analisadas e contadas.

2.3.4 Toxicidade subaguda em camundongos CB17 SCID

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=15 animais/grupo). Como controle negativo, utilizou-se o veículo de diluição da amostra (dimetilsulfóxido 5%). Para a marinobufagina foram estabelecidas as doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, administradas por via intraperitoneal com base nos estudos prévios de toxicidade aguda. O tratamento foi realizado durante 15 dias consecutivos.

Análises hematológicas foram realizadas por microscopia óptica. Parâmetros hematológicos, incluindo contagem de eritrócitos e de leucócitos totais, bem como uma contagem diferencial de células brancas, foram quantificados. As análises bioquímicas de amostras de soro foram realizadas utilizando o rotor Vet-16 (Hemagen Diagnostics Inc., Columbia, MD, EUA). Alanina aminotransferase (ALT), albumina e proteínas totais foram quantificadas como marcadores de dano/função hepática e uréia, creatinina, fósforo e cálcio foram quantificados para avaliar os parâmetros renais. A amilase foi quantificada para investigar a função pancreática. Colesterol e glicose foram quantificados para investigar alterações lipídicas e açúcares sanguíneos, respectivamente.

Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fígado, pulmões, coração e rins foram excisados e pesados para análise macroscópica (lesões graves ou alterações de cor e hemorragia) e cálculo do peso relativo.

2.4 Observações histopatológicas

A coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Imediatamente após a pesagem, os órgãos (fígado, rins e coração) foram armazenados em formalina tamponada 10%. Posteriormente, procedeu-se a análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70-100%), álcool e xilol, xilol e, finalmente, foram impregnados e embebidos em parafina e os fragmentos de tecido foram seccionados de 4 a 6 µm de espessura em micrótomo e preparadas as lâminas, de acordo com o protocolo de métodos histológicos de rotina. Subseqüentemente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas em microscópio óptico (400x).

2.5 Avaliação do trânsito intestinal

Camundongos Swiss fêmeas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n= 7 animais/grupo): controle negativo (dimetilsulfóxido 5%, i.p.), controle positivo para aumento do trânsito intestinal (bisacodil, 5 mg/kg, oral), controle positivo para redução do trânsito intestinal (atropina, 3 mg/kg, i.p.) e marinobufagina (2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, i.p.). Assim, 30 min após a última dose do tratamento de 7 dias consecutivos (grupos controle negativo e marinobufagina) e de dose única de bisacodil e atropina, os animais receberam uma suspensão de carvão ativo 10 % em solução de carboximetilcelulose 1,5 % na proporção de 0,3 mL/animal via oral por gavagem. Trinta minutos depois, os camundongos foram sacrificados com pentobarbital sódico (150 mg/kg) via intraperitoneal e o pequeno intestino (intestino delgado) foi retirado (desde o piloro até o início do ceco). O resultado (distância percorrida) foi expresso como porcentagem do comprimento total do intestino delgado (MILLER et al., 1981; HARRISON et al., 2004):

$$\text{Trânsito intestinal (\%)} = \frac{\text{Distância percorrida pelo carvão ativado}}{\text{Comprimento total do intestino delgado}} \times 100$$

2.6 Análises Estatísticas

O composto foi testado em diluição seriada, em triplicata e em duas avaliações biológicas independentes (n=2). Os valores de CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear. Dados apresentados como médias \pm erro padrão da média (E. P. M.) foram comparados usando análise de variância de uma via (ANOVA one-way) seguidas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes pré-clínicos de toxicidade de candidatos a fármacos são realizados para caracterizar potenciais efeitos adversos e para fornecer estimativas iniciais da margem de segurança para seres humanos. No caso destes testes apresentarem resultados indesejáveis, estas moléculas são provavelmente eliminadas de futuros estudos (GREAVES et al., 2004). Assim, o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos não inclui apenas o perfil farmacocinético e farmacodinâmico, mas também fases essenciais da avaliação da segurança farmacológica e da janela terapêutica, incluindo a toxicologia sistêmica e genética. Os resultados destes estudos permitem a exclusão do candidato a um novo medicamento antes do dispêndio de tempo e de recursos materiais e humanos (WERMUTH, 2004; BASS et al., 2009; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009).

3.1 Citotoxicidade

A avaliação do potencial citotóxico de uma substância em células normais é de fundamental importância para determinar a seletividade do composto (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003; CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014; FERREIRA et al., 2015), principalmente quando se leva em consideração seu potencial anticâncer. Diante disso, três tipos de células normais foram avaliados quanto à citotoxicidade da marinobufagina: uma linhagem murina (L-929), uma linhagem de macaco (BGMK) e cultura primária de leucócitos humanos (CMSP).

As células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP) incluem linfócitos e monócitos e tem sido extremamente utilizadas no entendimento da

toxicidade de novas entidades químicas (COSTA et al., 2008; BARROS et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; GOMES-JÚNIOR et al., 2015). Apenas elas se mostraram sensíveis à ação antiproliferativa da marinobufagina, cujo valor de CI_{50} foi de 4.35 (2.49 – 7.75) $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 2**). Comparativamente, isso sugere que a atividade citotóxica seja até 72.5 vezes maior contra células leucêmicas da linhagem HL-60 (CI_{50} de 0.06 $\mu\text{g/mL}$). Previamente, nosso grupo de pesquisa revelou que os extratos dos venenos de sapos das espécies *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* possui elevados índices de seletividade para células tumorais, sendo até 80 vezes mais seletivos contra células leucêmicas quando comparado à citotoxicidade contra leucócitos em divisão (FERREIRA et al., 2013). Uma vez que a molécula marinobufagina corresponde a 60% do extrato do veneno de *R. marina* (KERKHOFF et al., 2016), acredita-se que a marinobufagina seja o principal componente do extrato com ação citotóxica contra células tumorais e responsável, pelo menos em parte, pela atividade seletiva. Em estudo simultâneo, Lima (2016) realizou a avaliação da atividade genotóxica da marinobufagina em CMSP por meio do ensaio do cometa alcalino e esse composto não foi capaz de induzir danos significantes ao DNA em concentrações próximas.

Os resultados demonstraram que apenas células humanas foram sensíveis à marinobufagina. Muitos estudos sugerem que as classes químicas conhecidas de esteróides cardiotônicos, cardenolídeos (ex.: ouabaína e digoxina) e bufadienolídeos (ex.: helebregenina e bufalina) interagem com o mesmo sítio de ligação na subunidade α da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (WANSAPURA et al., 2009). A fraca atividade contra células murinas possivelmente está relacionada com as diferenças estruturais entre subunidades da $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPases}$ humanas e de camundongos, em que a presença de mutações na parte extracelular da subunidade α explica a sensibilidade aproximadamente 1000 vezes menor de células de camundongos aos esteróides cardiotônicos (MIJATOVIC et al., 2007; BANULS et al., 2013a).

Tabela 2 – Avaliação da atividade citotóxica da Marinobufagina em células normais avaliados pelo ensaio do MTT ou Alamar Blue após 72 h de incubação.

Células	Origem histológica	CI ₅₀ (µg/mL)*	
		Marinobufagina	Doxorrubicina
BGMK**	<i>Buffalo green monkey kidney</i>	>10	>5
L-929**	Fibroblasto murino	>10	0.66 (0.43 – 0.88)
CMSP***	Cultura primária	4.35 (2.49 – 7.75)	0.91 (0.55 – 1.89)

*Valores de CI₅₀ (concentração inibitória) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados por regressão não linear a partir de dois experimentos independentes (n = 2).

**Ensaio do MTT.

***Ensaio do Alamar Blue.

3.2 Toxicidade sistêmica e parâmetros fisiológicos

No Brasil, a toxicidade dos produtos naturais é quase sempre colocada em segundo plano (FERREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2015). O uso imprudente, muitas vezes até para finalidades diferentes daquelas tradicionalmente empregadas, sua identificação errônea, a presença de adulterantes e contaminantes, as associações e sinergismos possíveis, assim como a obtenção ou preparo indevidos podem causar sérios problemas de saúde pública. Portanto, é necessário conhecer as características farmacológicas e toxicológicas, a posologia e os aspectos clínicos associados a essas substâncias, evitar a propagação de informações equivocadas e aprimorar os métodos de produção, controle de qualidade e fiscalização, para que ocorra realmente segurança na utilização de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005; SEEFF, 2007; JORDAN et al., 2010), o que certamente dará segurança aos profissionais da saúde para prescrição de substâncias provenientes da natureza. No presente estudo, inicialmente realizou-se um *screening* do perfil de toxicidade aguda da marinobufagina e prosseguiu-se para estudos de toxicidade subaguda.

Os estudos de toxicidade aguda em roedores são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade individual produzida por um composto após dosagem única em um período de 24 h, seguida da observação pelo menos uma vez durante os

primeiros 30 min e periodicamente durante as primeiras 24 h, com especial atenção nas primeiras 4 h, e diariamente a partir daí, para um total de 14 dias quanto à morte, diarreia, letargia, convulsões e alterações macroscópicas, exceto se for necessário para ser removido do estudo e sacrificado por razões de proteção dos animais ou por óbito (ANVISA, 2013).

A marinobufagina causou respiração aumentada e irritabilidade nas menores doses (1.25 e 2.5 mg/kg) e presença de frêmito vocal (ruído característico da vocalização do ar), além de piloereção, atividade geral diminuída (apatia, ausência de tônus corporal), característico de atividade depressora no sistema nervoso central (SNC) nas doses maiores (5 e 10 mg/kg). Na dose de 10 mg/kg, 2 dos 3 animais apresentaram alterações comportamentais semelhantes a crises convulsivas. Porém, nenhuma morte foi detectada (**Tabela 3**). Estudos anteriores baseados em análise comportamental e eletrográfica mostraram resultados semelhantes induzidos pela administração sistêmica de marinobufagina. Os animais apresentaram efeitos neurotóxicos, tais como movimentos circulares, automatismos gustatórios, taquipnéia, clonias de cabeça e de patas, tremores, convulsões tônico-clônicas generalizadas, *status epilepticus* e DL_{50} no valor de 10.5 ± 1.5 mg/kg para camundongos e de 25.0 ± 2.0 mg/kg para ratos, ambos por via intraperitoneal (NOGUEIRA et al., 2000). Nesse mesmo estudo, mostrou-se que as convulsões podem ser reduzidas em até 80% por diazepam (10 mg/kg) e fenitoína (50 mg/kg). Sabendo-se das evidências da participação da bomba Na^+/K^+ -ATPase na gênese de crises convulsivas observadas tanto em pacientes epiléticos quanto em modelos experimentais (RAPPORT et al., 1975) e que a fenitoína bloqueia o movimento de íons pela bomba, é possível que a marinobufagina interfira na bomba de sódio/potássio, no fluxo de cátions monovalentes, e por conseguinte, no potencial de ação de neurônios centrais, o que leva à convulsão (FERNANDES et al., 1996).

Trabalhando com microemulsões de bufadienoídeos, Li et al. (2015) encontraram valores de DL_{50} entre 19.6 a 29.4 mg/kg de preparações de bufadienolídeos, cujos sintomas de toxicidade mais comuns foram taquipnéia, taquicardia e espasmos clônicos. Os animais que sobreviveram voltaram a seu aspecto normal após 4h. Nesse estudo, como encontrado aqui com marinobufagina, a maioria dos sintomas aconteceu nas primeiras 4h após a administração.

Tabela 3 – Efeitos tóxicos agudos do composto marinobufagina isolado de *Rhinella marina* após administração intraperitoneal em camundongos adultos Swiss.

Grupo	Dose (mg/kg)	Número de animais	Sobrevida	Sinais e sintomas de toxicidade
Controle	0	3	3/3	-
	1.25	3	3/3	Irritabilidade e reflexo corneal ausente
	2.5	3	3/3	Irritabilidade, tônus corporais ausentes, ataxia presente e respiração ofegante
	5	3	3/3	Tônus corporais ausentes, ataxia presente e piloereção.
	10	3	3/3	Atividade geral diminuída, frênilo vocal, tônus corporais ausentes, ataxia presente, piloereção, convulsão

Como os estudos de dose única não permitem avaliar toxicidade acumulativa de um xenobiótico (natural ou sintético), o ensaio toxicológico por doses repetidas tem como finalidade caracterizar o perfil toxicológico de um novo fármaco ou protótipo utilizando doses geralmente estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente 3 doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso (EMA, 2010). Para o primeiro estudo de doses repetidas foram usados camundongos Swiss em 3 doses (2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia) durante 7 dias. No segundo estudo, apenas as doses menores (2.5 e 5 mg/kg/dia) foram escolhidas diante de um tratamento mais longo de 15 dias em animais da linhagem CB17 SCID.

A toxicidade sistêmica pode se manifestar por meio das alterações de comportamento, diarreia, contorções abdominais, redução no consumo de água e ração e no tamanho e histologia de órgãos, uma vez que está bem estabelecido que o consumo de substâncias que contenham componentes tóxicos pode refletir em alterações no peso relativo dos diferentes órgãos através do aumento ou involução dos mesmos (FERREIRA et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; COSTA et al., 2012). As **tabelas 4 e 5** detalham o peso corporal e o peso dos órgãos na base úmida (g/100g de peso corpóreo) de ambas as linhagens de camundongos estudadas (Swiss e CB17 SCID) e mostram que apenas as maiores doses (7.5 e 5

mg/kg/dia) foram capazes de reduzir o peso corporal dos animais (28.9 ± 0.6 e 18.1 ± 0.7 g) quando comparadas com seus controles negativos (31.9 ± 0.7 g e 20.7 ± 0.6 g, $p < 0.05$). Alterações no peso relativo dos órgãos não foram detectadas ($p > 0.05$).

Uma vez que produtos naturais com propriedades medicinais têm efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e podem até mesmo induzir pancreatite aguda em humanos ou em outros mamíferos e que tais danos à integridade tecidual frequentemente resultam em alterações dos parâmetros séricos, tais como das enzimas ALT e AST, da uréia, creatinina, íons, glicose, albumina, gama-glutamilttransferase, ácido úrico e colesterol (KALLNER, TRYDING, 1989; LIN et al., 2003; AKDOGAN et al., 2003; MORAIS et al., 2016), o acompanhamento pré-clínico foi realizado como uma forma de pesquisar possíveis danos órgão-específicos (RAMAIAH, 2007; ANVISA, 2013).

Tabela 4 – Peso relativo dos órgãos de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Peso Final (g)	Fígado	Rins	Baço	Coração	Pulmão	Estômago
			Peso relativo (g/100 g de peso corpóreo)					
Controle Negativo	-	31.9 ± 0.7	4.7 ± 0.17	1.2 ± 0.03	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.04	0.8 ± 0.17	1.1 ± 0.06
	2.5	29.6 ± 0.6	4.8 ± 0.18	1.2 ± 0.02	0.5 ± 0.08	0.5 ± 0.03	0.7 ± 0.06	1.0 ± 0.05
Marinobufagina	5.0	29.7 ± 0.7	4.8 ± 0.09	1.3 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.8 ± 0.06	1.1 ± 0.06
	7.5	28.9 ± 0.6*	4.9 ± 0.19	1.2 ± 0.05	0.6 ± 0.06	0.5 ± 0.01	0.7 ± 0.03	1.0 ± 0.04

*Os valores correspondem à média ± E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste.

*p< 0.05 quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 5 – Peso relativo dos órgãos de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Fígado	Rins	Coração	Pulmão
					Peso relativo (g/100 g de peso corpóreo)			
Controle negativo	-	14/15	23.5 ± 0.3	20.7 ± 0.6	4.99 ± 0.34	1.49 ± 0.06	0.57 ± 0.02	0.83 ± 0.04
Marinobufagina	2.5	15/15	23.5 ± 0.4	20.1 ± 0.5	4.99 ± 0.34	1.52 ± 0.07	0.60 ± 0.03	0.85 ± 0.04
	5	14/15	22.7 ± 0.4	18.1 ± 0.7*	5.04 ± 0.24	1.60 ± 0.11	0.60 ± 0.03	1.04 ± 0.11

*Os valores correspondem à média ± E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste.

*p < 0.05 quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos de camundongos Swiss tratados com marinobufagina por via intraperitoneal se deu por meio da determinação dos níveis séricos de ALT, AST, uréia, creatinina, glicose e colesterol total. A análise revelou, de forma geral, que apesar de uma tendência de aumento sérico de AST (235.4 ± 36.6 , 243.8 ± 20.3 e 232.3 ± 24.0 U/mL) e ALT (73.6 ± 4.7 , 69.6 ± 4.8 U/mL e 65.5 ± 5.7 U/mL) e da redução dos níveis de creatinina (0.28 ± 0.07 , 0.28 ± 0.02 e 0.30 ± 0.01 mg/dL) em comparação com o controle negativo (169.7 ± 14.3 U/mL, 57.3 ± 2.5 U/mL e 0.48 ± 0.15 mg/dL), tais alterações não se mostraram estatisticamente significantes ($p > 0.05$) (**Tabela 6**).

Os valores de referências dos parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí não estão estabelecidos. Contudo, nessa avaliação verificamos que a glicose de todos os grupos se mostrou aumentada. Relatos na literatura apontam que os anestésicos cloridrato de cetamina e xilazina aumentam significativamente a glicemia (BRĂSLAȘU et al., 2007; BRANCO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013). Assim, o aumento da glicose em todos os grupos pode ser associado à ação hiperglicêmica desses fármacos, uma vez que eles foram utilizados como anestésicos nos protocolos de coleta de sangue.

Tabela 6 – Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante 7 dias consecutivos via intraperitoneal nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Parâmetros	Grupos	Controle negativo	Marinobufagina (mg/kg/dia)*		
			2.5	5.0	7.5
AST (U/L)		169.7 ± 14.3	235.4 ± 36.6	243.8 ± 20.3	232.3 ± 24.0
ALT (U/L)		57.3 ± 2.5	73.6 ± 4.7	69.6 ± 4.8	65.5 ± 5.7
Creatinina (mg/dL)		0.48 ± 0.15	0.28 ± 0.07	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.01
Glicose (mg/dL)		179.2 ± 5.9	182.4 ± 11.0	177.8 ± 14.1	207.3 ± 10.6
Colesterol total (mg/dL)		104.2 ± 9.0	97.4 ± 5.7	110.2 ± 5.7	109.3 ± 2.3
Uréia(mg/dL)		52.7 ± 3.2	51.0 ± 3.1	53.8 ± 6.8	46.8 ± 1.7

*Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 7/grupo). * $p > 0.05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

Em relação aos parâmetros séricos de camundongos CB17 SCID, observou-se um aumento dos níveis de creatinina em ambas as doses (2.5 mg/kg/dia: 0.87 ± 0.06 mg/dL e 5 mg/kg/dia: 0.95 ± 0.08 mg/dL) quando comparadas ao controle negativo (0.65 ± 0.07 mg/dL, $p < 0.05$) (**Tabela 7**). Nesse caso, percebeu-se uma resposta fisiológica diferente entre camundongos da linhagem Swiss e aqueles da linhagem CB17 SCID, fato que destaca a importância da pré-seleção dos modelos animais e linhagens para as pesquisas experimentais, além de outros fatores como sexo, idade, dieta, manuseio, ambiente e genótipo (WOLFORD et al., 1986; NUNES et al., 2004; BRANCO et al., 2011).

Tabela 7 – Perfil bioquímico do sangue periférico de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante 15 dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia por via intraperitoneal. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Parâmetros	Controle	Marinobufagina (mg/kg/dia)*	
	Negativo	2.5	5.0
Albumina (g/dL)	2.6 ± 0.8	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2
ALT (U/L)	24.7 ± 9.9	36.8 ± 4.9	35.2 ± 2.0
Amilase (U/L)	1103.0 ± 72.5	1281.0 ± 98.4	1098.0 ± 177.7
Cálcio (mg/dL)	8.6 ± 0.6	7.8 ± 0.3	9.0 ± 0.4
Colesterol total (mg/dL)	78.8 ± 17.3	83.5 ± 2.4	92.5 ± 13.2
Creatinina (mg/dL)	0.65 ± 0.07	$0.87 \pm 0.06^*$	$0.95 \pm 0.08^*$
Fósforo (mg/dL)	11.6 ± 1.8	14.5 ± 1.9	13.7 ± 1.7
Glicose (mg/dL)	37.0 ± 2.0	41.0 ± 10.3	24.2 ± 8.8
Proteínas totais (g/dL)	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.4	2.8 ± 0.1
Uréia (mg/dL)	29.9 ± 9.2	25.9 ± 1.0	25.8 ± 1.5
Relação Uréia:Creatinina	46.0	29.8*	27.2*

*Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 15/grupo). *p < 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

A creatinina é uma substância nitrogenada não protéica endógena derivada principalmente do metabolismo da fosfocreatina muscular, sendo excretada por filtração glomerular e, em menor proporção, por secreção tubular proximal. Ela tem

sido utilizada como biomarcador de doença renal crônica e injúria renal aguda e seu aumento no plasma é um importante indicativo de comprometimento da função renal por redução da taxa de filtração glomerular (MILLER, 1999; LEITE, 2010). Mas é de conhecimento geral que a creatinina é um marcador que se eleva tardiamente no sangue de pacientes portadores destas condições clínicas (AIRES et al., 2011). Isso explica, pelo menos em parte, porque alterações nos níveis séricos de creatinina foram encontradas apenas no estudo de 15 dias de tratamento com marinobufagina.

A uréia, como produto final do metabolismo protéico, é sintetizada no fígado durante o ciclo da ornitina ou ciclo da uréia a partir da amônia e livremente filtrada pelos glomérulos, assim como a creatinina. Desse ponto de vista, tal analito serve para analisar possíveis alterações hepáticas e renais. Os túbulos renais, por sua vez, tanto secretam como reabsorvem uréia (40-50%) e a relação entre a uréia:creatinina pode ser útil particularmente quando se avaliam quedas abruptas da taxa de filtração glomerular (SCHOSSLER et al., 2001; COSTA et al., 2012). O racional de usar a média aritmética das depurações de uréia e da creatinina baseia-se nas observações de ser a uréia reabsorvida pelos túbulos renais após ser filtrada e a creatinina secretada, situações antagônicas mais exacerbadas nos estágios mais avançados de doença renal (ABENSUR, 2017). No presente trabalho, os grupos que receberam 2.5 e 5 mg/kg/dia de marinobufagina também mostraram queda da relação uréia:creatinina plasmáticas ($p < 0.05$) quando comparada ao controle negativo (29.8, 27.2 e 46.0, respectivamente). A relação uréia:creatinina diminui em situações como hepatites (devido à redução na formação de uréia), insuficiência renal (aumento de creatinina) e dieta pobre em proteínas (redução de precursores de aminas) (ABENSUR, 2017).

Alguns esteróides cardiotônicos, como a marinobufagina, ouabaína e digoxina são encontrados naturalmente no organismo humano e elevados níveis destes esteróides são relatados em condições fisiopatológicas, como insuficiência renal crônica, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão essencial e pré-eclâmpsia. A bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é abundantemente expressa no tecido renal e suas células tubulares expressam apenas a isoforma α_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, ao contrário do tecido cardíaco que possui as isoformas α_1 e α_2 , o que sugere que a atividade da ATPase medida no tecido renal possa ser atribuída a isoforma α_1 (BAGROV et al., 1995; COSTA, 2009; WANSAPURA et al., 2009; BABULA et al., 2013; FEDOROVA et al., 2015). Sabendo-se da atração dos cardenolídeos e bufadienolídeos à

subunidade alfa, Loreaux et al. (2008) demonstrou que a infusão de ouabaína em camundongos submetidos a mutação da subunidade α_1 para reverter a afinidade relativamente baixa a esse cardenólídeo causou uma redução significativa na taxa de filtração glomerular. Dessa forma, o aumento da creatinina nos animais tratados com a marinobufagina pode ser justificado por uma redução da função renal em consequência de uma possível vasoconstrição nas arteríolas aferentes, embora tal ação não tenha causado comprometimento renal acentuado, provavelmente devido ao período de estudo não superior a 15 dias.

Achados clínicos quase sempre são acompanhados por outros sinais bioquímicos e hematológicos, como redução dos níveis de albumina, de hemácias (eritropenia por redução de eritropoetina), sódio, potássio, cloro, magnésio, cálcio (principalmente durante a insuficiência renal), mielossupressão (por redução da proliferação/formação de células brancas) e desequilíbrio da colesterolemia (RAMAIAH, 2007; AIRES, 2011). No entanto, tais sinais adicionais não foram encontrados nos animais tratados com marinobufagina (perfil hematológico: **Tabela 8 e 9**) com exceção do aumento da creatinina plasmática e redução da relação uréia:creatinina.

Estudos prévios com formulações à base de bufadienólídeos revelaram maior eficácia antitumoral de microemulsões em animais *nude* BALB/c-nu transplantados com células humanas de carcinoma de fígado (HEPG-2), de cólon (HCT-8), de estômago (BGC-803) e de esôfago (EC-9706). Essas mesmas formulações, quando submetidas a testes de toxicidade aguda e exposição de longa duração, não causaram alterações hematológicas ou bioquímicas ou no peso corporal dos animais (machos ou fêmeas) mesmos após 12 semanas de tratamento via oral, embora leves alterações morfológicas, como infiltração linfocitária no tecido intersticial miocárdico, tenham sido detectadas (LI et al., 2015).

Tabela 8 – Perfil hematológico de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Parâmetros	Grupos Controle Negativo	Marinobufagina (mg/kg/dia)*		
		2,5	5,0	7,5
Hemácias (10^6 cél./ μ L)	8.2 \pm 0.2	7.1 \pm 0.4	7.8 \pm 0.3	8.2 \pm 0.5
Hemoglobina (g/dL)	13.3 \pm 0.2	11.1 \pm 0.7	12.4 \pm 0.4	13.0 \pm 0.8
Hematócrito (%)	47.5 \pm 0.9	38.2 \pm 2.7	43.5 \pm 1.8	46.2 \pm 3.2
VCM (fL)	57.9 \pm 0.6	53.9 \pm 1.1*	56.0 \pm 0.4	56.5 \pm 0.5
HCM (pg)	16.3 \pm 0.2	15.7 \pm 0.3	16.0 \pm 0.2	16.0 \pm 0.2
CHCM (g/dL)	28.1 \pm 0.2	29.1 \pm 0.6	28.6 \pm 0.3	28.3 \pm 0.3
Plaquetas (10^3 cél./ μ L)	813.0 \pm 48.2	663 \pm 150.2	963.6 \pm 61.7	720.6 \pm 109.6
Leucócitos totais (10^3 cél./ μ L)	4.1 \pm 0.6	3.2 \pm 1.0	5.2 \pm 0.7	5.4 \pm 0.5

*Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 7/grupo). *p > 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 9 – Perfil hematológico de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina durante quinze dias consecutivos nas doses de 2.5 e 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%).

Parâmetros	Controle Negativo	Marinobufagina (mg/kg/dia)*	
		2,5	5
Eritrócitos (10^6 cél./ μ L)	8.1 \pm 0.9	6.9 \pm 0.9	5.7 \pm 0.3
Leucócitos totais (10^3 cél./ μ L)	5.9 \pm 1.4	4.9 \pm 0.7	5.8 \pm 0.6
Contagem diferencial de leucócitos (%)			
Basófilos	1.6 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	1.8 \pm 0.5
Eosinófilos	2.2 \pm 0.4	1.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.3
Neutrófilos	32.8 \pm 3.3	33.8 \pm 4.4	27.3 \pm 4.0
Linfócitos	56.4 \pm 2.9	53.3 \pm 3.8	61.0 \pm 3.7
Monócitos	7.0 \pm 0.9	9.5 \pm 2.2	7.8 \pm 1.5

*Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 7/grupo). *p > 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls.

Muitos fármacos com propriedades antineoplásicas atualmente em uso na clínica também alteram a fisiologia do trato gastrointestinal, seja por ação antiproliferativa inespecífica sobre os enterócitos do intestino delgado em constante renovação ou por ação irritativa da mucosa, o que leva à perda de peso, de nutrientes, vômitos, constipação e/ou diarreia (KATZUNG et al., 2003; STEIN et al., 2010). Uma vez que os animais tratados com marinobufagina apresentaram redução de ganho de peso após 7 e 15 dias de tratamento, decidiu-se avaliar se a marinobufagina altera o trânsito intestinal e, assim, interfere na absorção dos nutrientes. Confirmando a ausência de diarreia, a marinobufagina (2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia i.p., $p > 0.05$) não alterou a distância percorrida pelo carvão ativado (77.3 ± 3.2 , 85.4 ± 4.1 e 90.7 ± 5.7 %) quando comparada ao controle negativo (78.6 ± 4.4 %). Por outro lado, bisacodil 5 mg/kg aumentou a distância percorrida para 96.8 ± 3.3 %, enquanto a atropina 3 mg/kg a diminuiu para 33.9 ± 3.8 % ($p < 0.05$, **Figura 3**).

Portanto, é possível afirmar que a marinobufagina não alterou a motilidade intestinal, fato considerado promissor para uma molécula antitumoral. Atualmente, efeito laxantes e/ou diarreicos costumam surgir em 50-80 % dos pacientes sob quimioterapia, dependendo do fármaco e do esquema de tratamento (mono ou quimioterapia, frequência das doses), sendo, assim, a diarreia induzida por quimioterapia um dos efeitos colaterais mais comuns de substâncias naturais ou sintéticas com ação antitumoral. Além disso, a diarreia induzida por quimioterapia pode levar à depleção de fluidos e eletrólitos, desnutrição, desidratação, comprometimento cardiovascular, necessidade de internação hospitalar e até à morte (STEIN et al., 2010; FERREIRA et al., 2016).

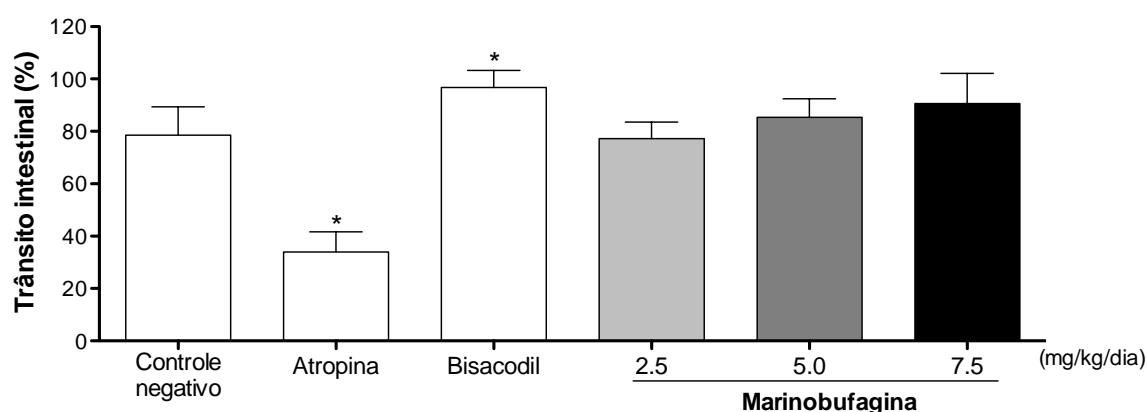


Figura 3 – Avaliação do trânsito intestinal de camundongos adultos Swiss tratados com a marinobufagina durante 7 dias consecutivos via intraperitoneal nas doses de 2.5, 5 e 7.5 mg/kg/dia. O controle negativo recebeu o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). Como controles positivos, foram usados Bisacodil 5 mg/kg oral e Atropina 3 mg/kg, i.p. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n= 7/grupo). *p > 0.05 comparado ao controle negativo por ANOVA seguido do teste t-Student-Newman-Keuls.

Sabendo-se que a toxicidade dos bufadienolídeos pode estar relacionada ao acúmulo e metabolismo consideravelmente lento de tais compostos (LI et al., 2010) e que a toxicidade pré-clínica é geralmente avaliada por parâmetros sanguíneos, seguida de confirmação de análises histopatológicas (RAMAIAH, 2007), realizou-se uma avaliação histológica de órgãos-chave que possam ajudar na elucidação do potencial tóxico da marinobufagina.

O fígado é um órgão relativamente vulnerável a uma grande variedade de insultos metabólicos, tóxicos, microbianos, circulatórios e neoplásicos. Possui um repertório limitado de respostas celulares e tissulares à lesão, independentemente da causa, destacando entre as mais comuns: degeneração dos hepatócitos e acúmulos intracelulares, inflamação, regeneração, fibrose, necrose e apoptose de hepatócitos (KUMAR et al., 2009). Na análise histopatológica dos cortes de tecido hepático, foi adotada uma classificação de escores em relação às alterações que os grupos apresentaram, a fim de compará-los e diferenciá-los entre si.

Os cortes hepáticos dos camundongos Swiss do grupo controle negativo (DMSO 5%) revelaram a existência de hepatite reativa com extensa degeneração vacuolar multizonal, com o núcleo de alguns hepatócitos deslocado para a periferia da célula devido à intensa reticulação do citoplasma. Ainda foram observadas áreas focais de hepatonecrose, com infiltrado inflamatório mononuclear (linfócitos e

macrófagos) adjacente, hiperplasia moderada de células de Kupffer e congestão passiva venular branda (Escore 2) (**Figura 4A**).

Como o controle negativo, o grupo que recebeu marinobufagina na dose de 2.5 mg/kg/dia apresentou uma hepatite reativa branda, com degeneração vacuolar mais pronunciada na região médio zonal, áreas multifocais de hepatonecrose circundadas por infiltrado inflamatório brando mononuclear (linfócitos e macrófagos) e hiperplasia de células de Kupffer (Escore 2) (**Figura 4B**). A análise de tecido hepático dos animais Swiss tratados com a dose de 5 mg/kg revelou a presença de hepatite reacional periductal, com colestase em alguns ductos, desestruturação da rede de reticulina devido a hepatonecrose, infiltrado inflamatório mononuclear focal, degeneração vacuolar difusa e proliferação moderada de células de Kupffer (Escore 2-3) (**Figura 4C**). De maneira semelhante, no grupo tratado com a maior dose testada do composto (7.5 mg/kg) observou-se hepatite reacional moderada, com congestão passiva venular, degeneração vacuolar difusa, hiperplasia de células de Kupffer e áreas multifocais de hepatonecrose (Escore 2-3) (**Figura 4D**).

As células de Kupffer são as representantes, no fígado, do chamado Sistema Fagocitário Mononuclear e proliferam em diversas situações inespecíficas (ENGELMAN et al., 2001), como na degradação eritrocitária, fagocitose de dentritos celulares, absorção de ferro ou por focos hemorrágicos devido à congestão vascular. Esses macrófagos teciduais, quando ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias relacionadas à toxicidade tecidual local ou sistêmica (KUMAR et al., 2009).

Dessa forma, os grupos tratados com as maiores doses de marinobufagina (5 e 7.5 mg/kg/dia) apresentaram alterações mais acentuadas, enquanto que os animais Swiss que receberam a substância na dose de 2.5 mg/kg evidenciaram achados semelhantes quando comparados com os animais do controle negativo.

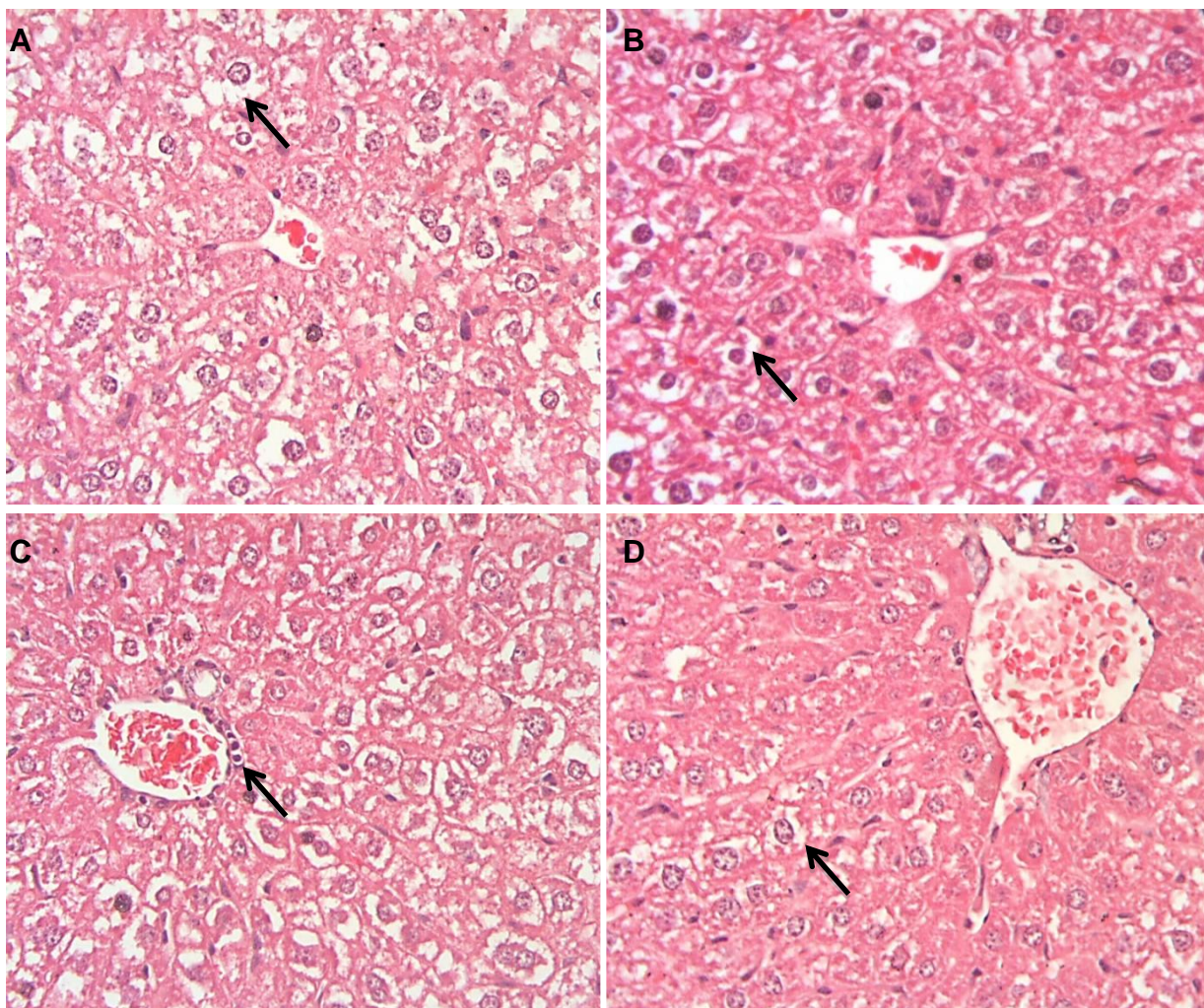


Figura 4 – Análise histológica do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

Legenda: **A:** Fotomicrografia de tecido hepático mostrando tumefação de células hepáticas com reticulação do citoplasma, com o núcleo deslocado para a periferia da célula (seta), com algumas células com hepatonecrose. **B:** Fotomicrografia de tecido hepático com aumento de volume dos hepatócitos devido à vacuolização citoplasmática (seta), promovendo congestão passiva sinusoidal esparsa. Observa-se hepatonecrose centro lobular. **C:** Fotomicrografia de tecido hepático onde se observa hepatonecrose e inflamação branda mononuclear portal (seta), com presença de inúmeras figuras de degeneração nuclear de hepatócitos dispersos pelo corte, hiperplasia moderada de células de Kupffer e degeneração vacuolar difusa. **D:** Fotomicrografia de tecido hepático mostrando hepatonecrose difusa e alguns hepatócitos com acentuada vacuolização (seta).

A análise dos cortes histológicos de tecido hepático dos camundongos da linhagem CB17 SCID revelou achados semelhantes aos dos camundongos Swiss. Nos animais do grupo controle foi observada a existência de hepatite reativa com degeneração vacuolar difusa. O núcleo de alguns hepatócitos estava deslocado para a periferia da célula devido à intensa reticulação do citoplasma e foram observadas áreas focais de hepatonecrose com infiltrado inflamatório mononuclear adjacente (linfócitos, macrófagos, e alguns neutrófilos) e congestão passiva sinusoidal multifocal (Escore 2) (**Figura 5A**). Os animais CB17 SCID tratados com a dose de 2.5 mg/kg/dia revelaram hepatite reativa branda, hepatócitos apresentando degeneração micro e macrovacuolar randômica, áreas multifocais de hepatonecrose, mínimo infiltrado inflamatório mononuclear e congestão passiva branda (Escore 1-2) (**Figura 5B**). O grupo marinobufagina 5 mg/kg/dia revelou alterações mais acentuadas quando comparado ao grupo anterior, com a presença de hepatite reacional, degeneração macrovacuolar mais pronunciada em região mediozonal, infiltrado inflamatório neutrofílico restrito aos focos de hepatonecrose e moderada congestão passiva sinusoidal (Escore 2) (**Figura 5C**).

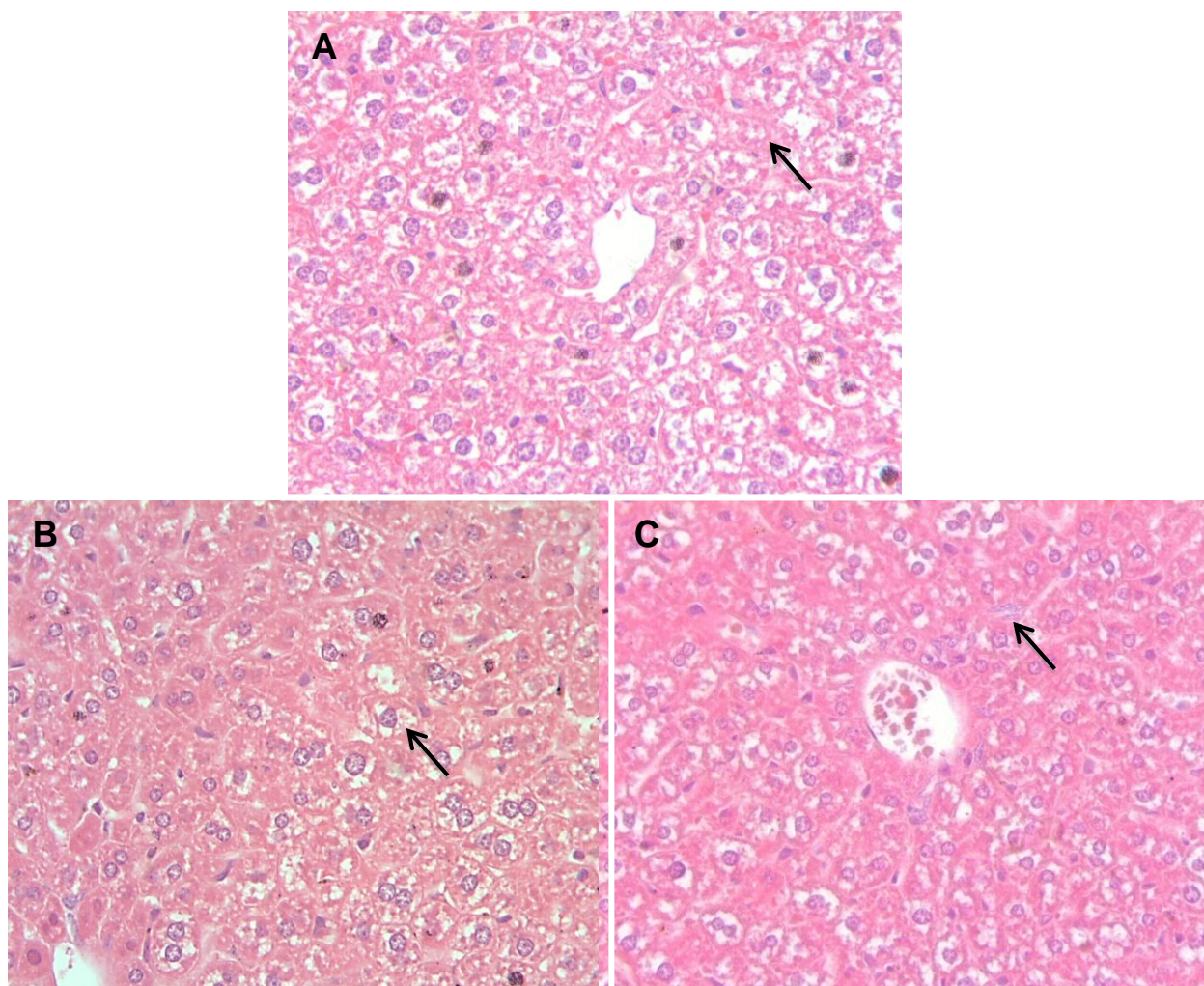


Figura 5 – Análise histológica do fígado de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

Legenda: **A:** Fotomicrografia de tecido hepático mostrando tumefação de células hepáticas com reticulação do citoplasma, com algumas células com hepatonecrose (seta) e hipertrofia de células de Kupffer. **B:** Fotomicrografia de tecido hepático com aumento de volume dos hepatócitos devido à vacuolização citoplasmática (seta) mais concentradas em região médio-zonal. Observa-se algumas células em hepatonecrose. **C:** Fotomicrografia de tecido hepático onde se observa degeneração vacuolar mais pronunciada na porção médio-zonal, grupos de hepatócitos com necrose e hiperplasia moderada de células de Kupffer. Observa-se proliferação de fibroblastos (seta).

As fotomicrografias dos cortes de tecido renal dos animais Swiss estão representadas na **Figura 6**. As análises histopatológicas do grupo controle negativo revelaram algumas alterações: comprometimento túbulo-intersticial (nefrose tubular), mostrando células tubulares com degeneração vacuolar, áreas difusas de necrose

tubular aguda com congestão passiva moderada de vasos túbulos-intersticiais e focos de hemorragia em região cortical e medular. Observou-se congestão passiva de capilares glomerulares, com aderências entre a cápsula de Bowman, tufo glomerular hipertrofiado devido a mecanismos compensatórios e infiltrado inflamatório mononuclear brando focal (**Figura 6A**). Os animais Swiss tratados com a marinobufagina 2.5 mg/kg mostraram nefrose tubular e necrose tubular aguda, alguns glomérulos apresentando aderências entre a cápsula de Bowman e o tufo glomerular hipertrofiado provavelmente devido a mecanismos compensatórios, enquanto outros mostram proliferação mesangial. Verificou-se infiltrado inflamatório mononuclear focal e alterações vasculares como congestão de capilares glomerulares, hemorragia túbulo-intersticial mais concentrada na região medular (**Figura 6B**). O grupo marinobufagina 5 mg/kg/dia revelou extensa degeneração vacuolar tubular (nefrose), com áreas multifocais de necrose tubular aguda, congestão passiva e hemorragias multifocais em região cortical e medular e aderência compensatória entre a cápsula de Bowman e o tufo glomerular hipertrofiado (**Figura 6C**). Nos animais tratados com a marinobufagina 7.5 mg/kg/dia, também foram observadas áreas multifocais de necrose tubular aguda, com congestão passiva de capilares glomerulares e de porção túbulo-intersticial, e hemorragias multifocais em região cortical, aderência compensatória entre a cápsula de Bowman e o tufo glomerular hipertrofiado (**Figura 6D**).

As células mensangiais ocupam a região central dos lóbulos glomerulares, onde encontram-se embebidas em uma matriz mesenquimal, denominada matriz mesangial. São consideradas células multipotentes, capazes de realizar de maneira integrada diversas e especializadas funções biológicas. São responsáveis pela manutenção da arquitetura glomerular estática e dinâmica, capazes de sintetizar componentes da matriz extracelular, de controlar a filtração glomerular através de sua capacidade de contração e relaxamento e participando do processo de depuração de macromoléculas circulantes, tais como imunocomplexos. Acredita-se que elas estejam relacionadas a muitas alterações verificadas durante o processo de cronificação das lesões glomerulares, uma vez que a proliferação dessas células e/ou expansão de matriz mesangial são achados histológicos freqüentemente observados durante a evolução das glomerulopatias (PINTO, 1998).

As análises histopatológicas dos cortes de tecido renal dos animais CB17 SCID estão representadas nas fotomicrografias da **Figura 7**. Os animais controle

revelaram um comprometimento túbulo-intersticial (nefrose tubular), mostrando células tubulares da região cortical com degeneração vacuolar (**Figura 7A**), áreas difusas de necrose tubular aguda, com células tubulares com figuras de degeneração nuclear (picnose) e congestão passiva moderada de vasos túbulo-intersticiais. No grupo marinobufagina 2.5 mg/kg, foram encontrados também nefrose tubular e necrose tubular aguda em região cortical, com alguns glomérulos apresentando aderências entre a cápsula de Bowman e o tufo glomerular hipertrofiado devido a mecanismos compensatórios, enquanto outros mostram proliferação de células mesangiais. Verificou-se túbulos dilatados revestidos por células epiteliais ligeiramente achatadas, alterações vasculares como congestão passiva moderada de capilares glomerulares e de vasos túbulo-intersticiais e áreas focais de hemorragia (**Figura 7B**). No grupo marinobufagina 5 mg/kg observou-se áreas multifocais de necrose tubular aguda extensa, com células tubulares apresentando figuras de degeneração nuclear e degeneração vacuolar (nefrose). Notou-se moderada congestão passiva túbulo-intersticial e hemorragia focal, aderência compensatória entre a cápsula de Bowman e o tufo glomerular hipertrofiado (**Figura 7C**).

O fígado e os rins são considerados órgãos-alvo para xenobióticos, uma vez que estas substâncias têm geralmente uma baixa solubilidade em sistemas aquosos e requerem biotransformação em hepatócitos para conversão em metabólitos mais hidrofílicos antes da excreção renal. As reações de biotransformação geralmente seguem um processo de desintoxicação, tornando os metabólitos inativos. Porém, muitas substâncias produzidas durante o metabolismo são reativas e tóxicas, podendo causar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (WILLIAMS et al., 2002; RAMAIAH, 2007; FERREIRA et al., 2016). Por outro lado, o fígado e os rins possuem uma pronunciada capacidade regenerativa e ação compensatória: mesmo quando a necrose é encontrada na presença de tecido conjuntivo preservado, há grande possibilidade de restauração tecidual completa (KUMAR et al., 2009).

Neste contexto, verificamos que todos os grupos apresentaram semelhantes alterações, porém com variações de intensidade, sobretudo em relação às áreas de nefrose e necrose tubular aguda nos tecidos renais. Ainda assim, todas as alterações histológicas observadas podem ser consideradas potencialmente reversíveis, pois não implicam necessariamente em um comprometimento funcional severo.

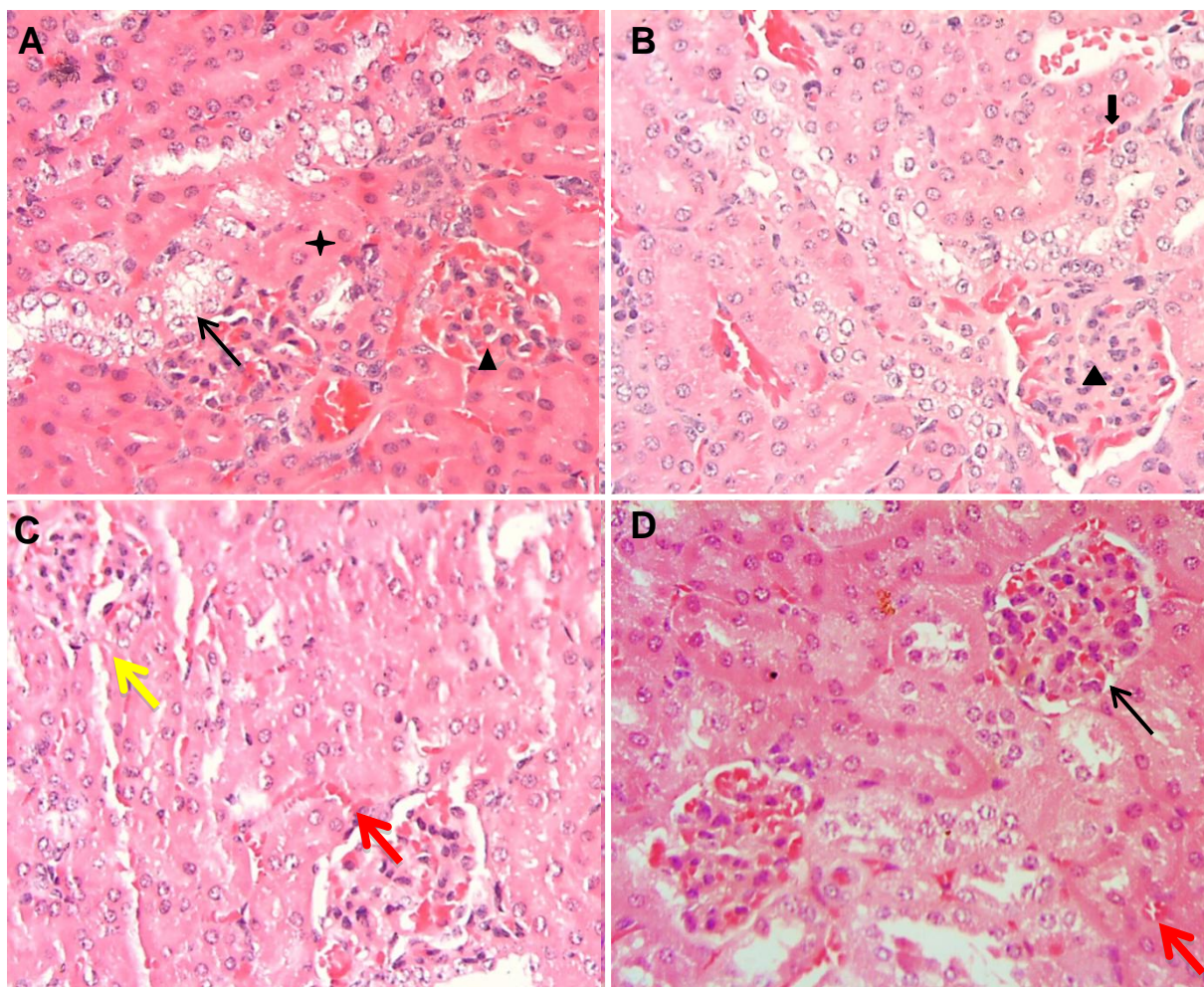


Figura 6 – Análise histológica dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

Legenda: **A:** Fotomicrografia de tecido renal evidenciando túbulos contornados com degeneração vacuolar (seta) e aderências entre a cápsula de Bowman e um tufo glomerular hipertrofiado com congestão capilar (cabeça de seta) e necrose tubular aguda (estrela). **B:** Fotomicrografia de tecido renal mostrando congestão passiva (seta) e proliferação mesangial (cabeça de seta). **C:** Fotomicrografia de tecido renal mostrando congestão (seta vermelha) e diminuição do espaço de Bowman (seta amarela). **D:** Fotomicrografia de tecido renal mostrando congestão passiva glomerular (seta) e diminuição de lúmen tubular.

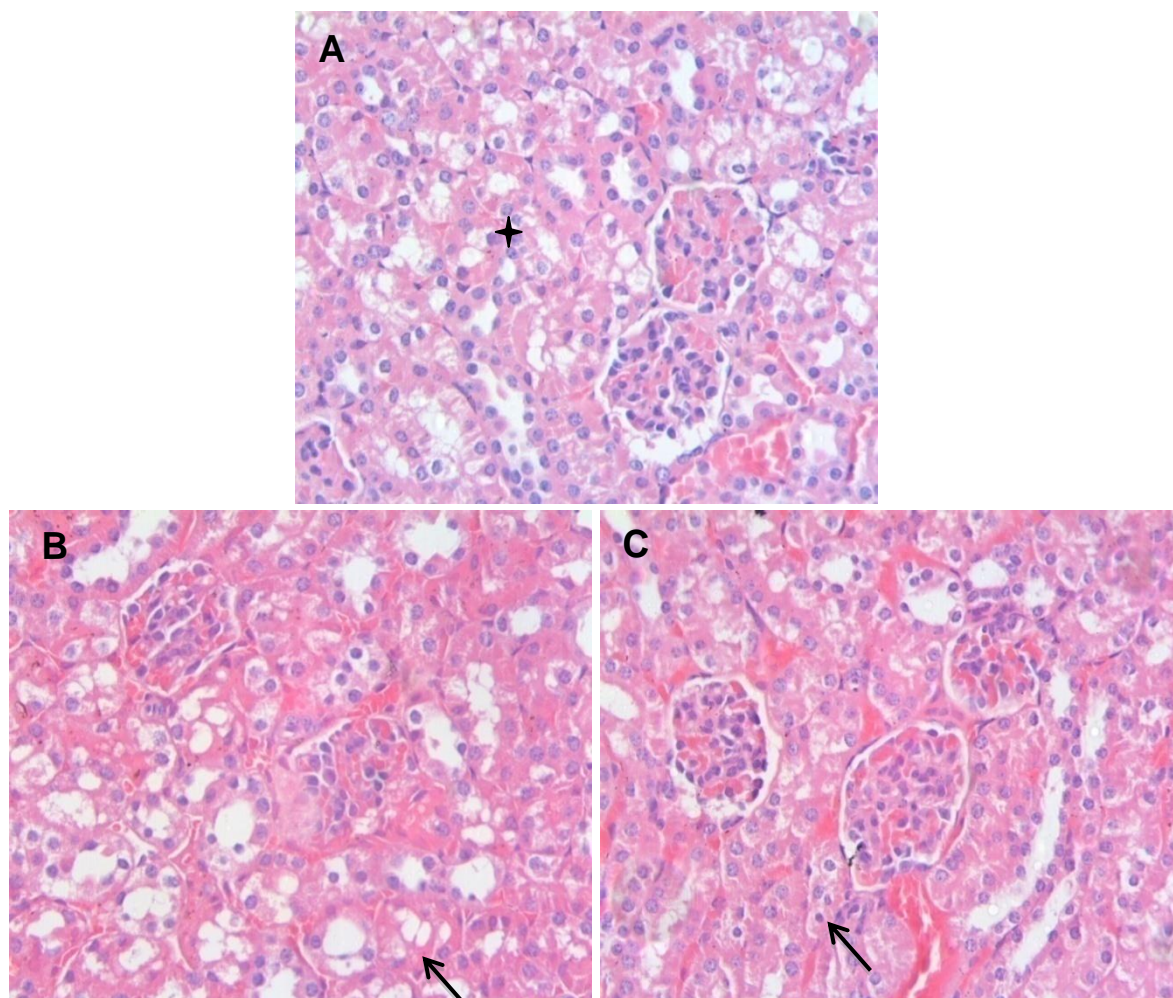


Figura 7 – Análise histológica dos rins de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

Legenda: **A:** Fotomicrografia de tecido renal evidenciando túbulos contornados com degeneração vacuolar (estrela). **B:** Fotomicrografia de tecido renal mostrando túbulos contornados com degeneração vacuolar, necrose tubular aguda (seta) e tufo glomerular hipertrofiado com congestão capilar. **C:** Fotomicrografia de tecido renal mostrando figura e degeneração nuclear (picnose – seta), congestão passiva de vasos de região túbulo-intersticial, hemorragia focal e hipertrofia de tufo glomerular.

Em relação ao tecido cardíaco, os cortes histológicos dos camundongos Swiss e CB17 SCID não mostraram alterações dignas de nota para nenhum dos grupos experimentais avaliados. Apenas nos animais CB17 SCID tratados com marinobufagina 5 mg/kg observou-se maior congestão passiva capilar e venular, mas sem edema intersticial adjacente que justifique importância, conforme as fotomicrografias apresentadas nas **Figuras 8 e 9**.

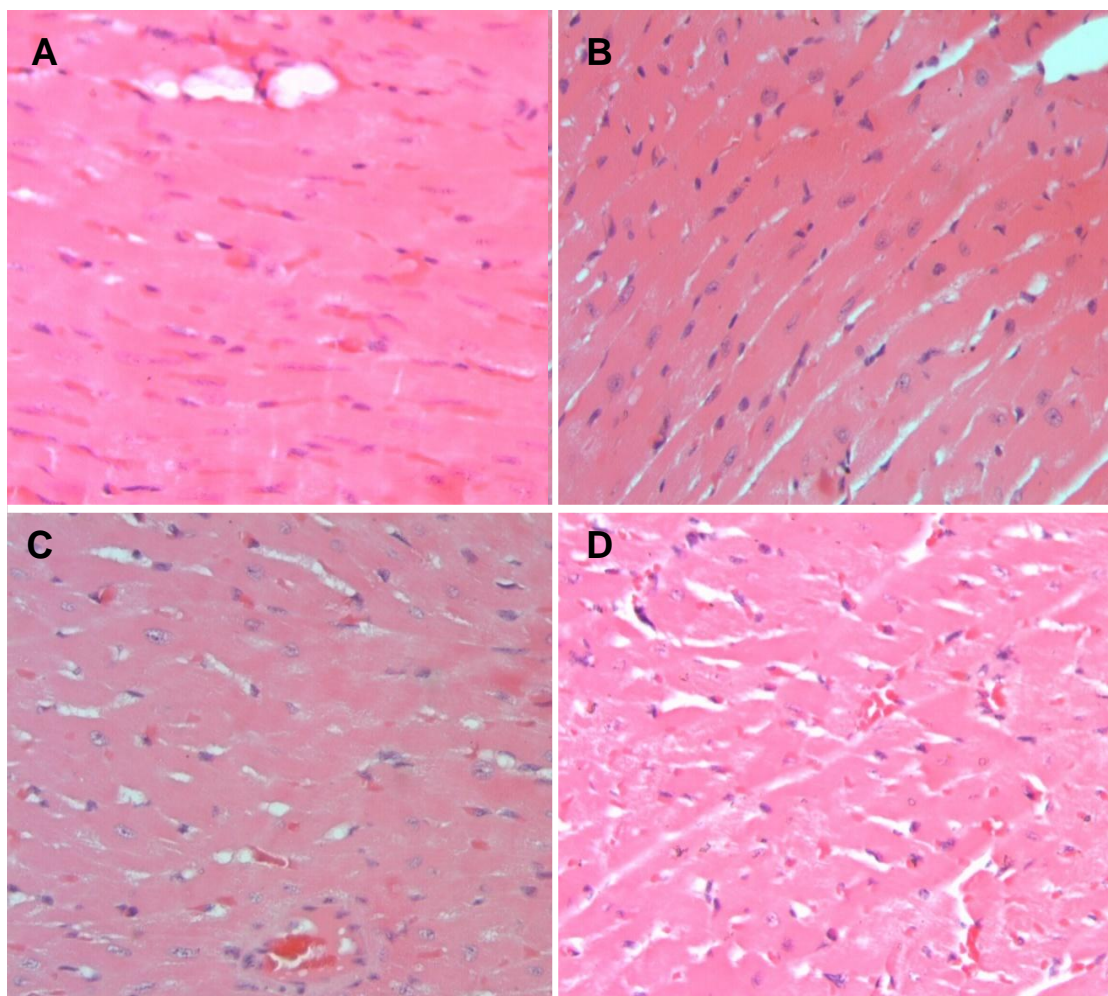


Figura 8 – Análise histológica do coração de camundongos (*Mus musculus*) Swiss tratados com a marinobufagina durante sete dias consecutivos. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada, via intraperitoneal, nas doses de 2.5 (B), 5 (C) e 7.5 mg/kg/dia (D). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

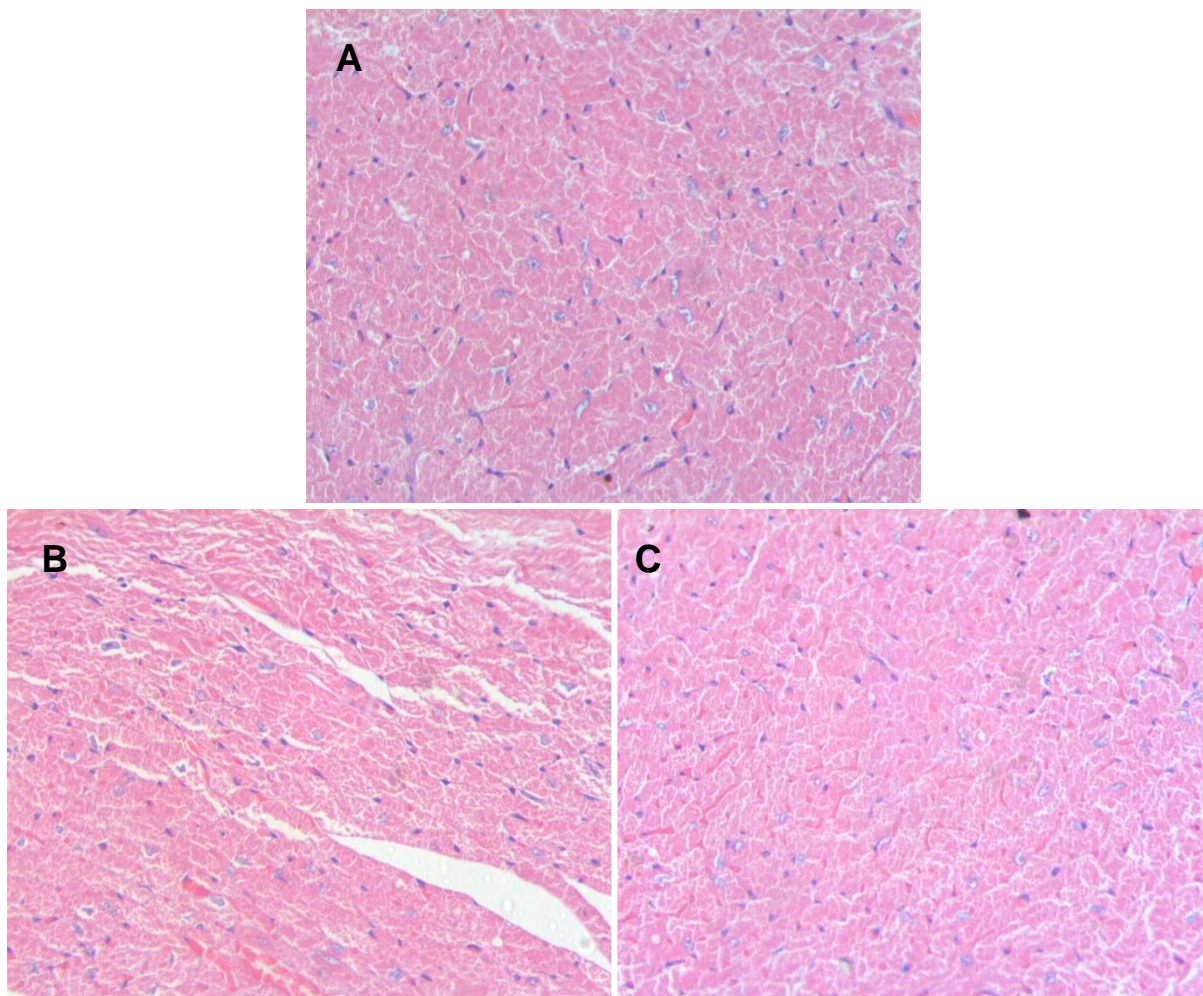


Figura 9 – Análise histológica do coração de camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID tratados com a marinobufagina e sacrificados após quinze dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 5%). A marinobufagina foi administrada via intraperitoneal nas doses de 2.5 (B) e 5 mg/kg/dia (C). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento de 400x.

A ausência de alterações cardíacas induzidas pela marinobufagina foi considerada inesperada visto que muitos esteróides cardioativos similares à digoxina costumam apresentar efeitos cardiovasculares indesejáveis por intermédio da inibição da bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ dos miócitos cardíacos e de vasos sanguíneos, pois há algum tempo vários estudos tem demonstrado altos níveis de marinobufagina em estados de hipertensão, doenças cardíacas e em pacientes com insuficiência renal e que ela exibe uma maior afinidade pela subunidade α_1 da $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ resistente à ouabaína, a principal isoforma da bomba de sódio encontrada nos túbulos renais (FEDOROVA et al., 1997; HAUCK; FRISHMAN, 2012; FEDOROVA et al., 2015). Assim, esses esteróides do tipo digitálicos podem

desempenhar um papel hormonal e/ou modulador do sistema nervoso e cardiovascular e estar envolvidos em achados fisiológicos de hipertensão e em processos de toxicidade.

4 CONCLUSÃO

A marinobufagina demonstrou citotoxicidade em células mononucleares normais humanas, foi inativa contra fibroblastos de camundongos e células de rim de macaco, não induziu alterações hematológicas nem alterou o trânsito intestinal, mas causou aumento dos níveis séricos de creatinina em camundongos após 15 dias de tratamento. Em conjunto com as análises teciduais, os resultados dos testes com a marinobufagina obtidos *in vivo* revelaram toxicidade branda até a dose de 7.5 mg/kg/dia, alterações histológicas renais e hepáticas reversíveis e ação epileptogênica apenas na dose de 10 mg/kg.

REFERÊNCIAS

ABENSUR, H. **Biomarcadores na Nefrologia**. Sociedade Brasileira de Nefrologia, Manual Roche. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>.> Acesso em: 01 maio 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2ª versão. Brasília: ANVISA, 2013. 48p.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

AKDOGAN, M.; KILINÇ, I.; ONCU, M.; KARAOZ, E.; DELIBAS, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 22, p. 213-219, 2003.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.

BABULA, P.; MASARIK, M.; ADAM, V.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. From Na⁺/K⁺-ATPase and cardiac glycosides to cytotoxicity and cancer treatment. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 13, p.1069-1087, 2013.

BAGROV, A. Y.; ROUKOYATKINA, N. I.; PINAEV, A. G.; DMITRIEVA, R. I.; FEDOROVA, O. V. Effects of two endogenous Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 1-3, p. 151-158, 1995.

BANULS, L. M.; URBAN, E.; GELBCKE, M.; DUFRASNE, F.; KOPP, B.; KISS, R.; ZEHL, M. E. Structure-activity relationship analysis of bufadienolide-induced *in vitro* growth inhibitory effects on mouse and human cancer cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1078-1084, 2013a.

BANULS, L. M.; KATZ, A.; MIKLOS, W.; CIMMINO, A.; TAL, D. M.; AINBINDER, E.; ZEHL, M.; URBAN, E.; EVIDENTE, A.; KOPP, B.; BERGER, W.; FERON, O.; KARLISH, S.; KISS, R. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar *in vitro* growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na⁺/K⁺-Atpase. **Molecular Cancer**, v. 26, p. 12-33, 2013b.

BARROS, F. W. A.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTI, B. C.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; GUECHEVA, T. N.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 37-46, 2013.

BASS, A. S.; CARTWRIGHT, M. E.; MAHON, C.; MORRISON, R.; SNYDER, R.; MCNAMARA, P.; BRADLEY, P.; ZHOU, Y. Y.; HUNTER, J. Exploratory drug safety: A discovery strategy to reduce attrition in development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 60, p. 69-78, 2009.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 1-17, 2009.

BRANCO, A. C. S. C.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 209-214, 2011.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de fitoterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRĂSLAȘU, T.E.D., BRĂDĂIAN, C., CORNILĂ, M. SĂVULESCU, I., COJMĂLEAIĂ, R., BRĂSLAȘU, M.C. Normal blood glucose in white Wistar rat and its changes following anesthesia. **Lucrări științifice Medicină Veterinară**, v. XL, 2007.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; ORTA, M. L., MALDONADO-NAVAS, D.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, I.; LÓPEZ-LÁZARO, M. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

CARVALHO, A. M. A.; SOBRINHO, B. C.; SILVA, M. M. V.; PEIXOTO JUNIOR, K. C. Estudo comparativo dos efeitos cardiovasculares e sedativos da clonidina e xilazina como medicação pré-anestésica em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 20, 2013.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions: Their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews**, v. 72, p. 365-379, 1997.

COSTA-NETO, E. M. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 33–43, 2005.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

COSTA, G. T. **Efeitos de esteróides cardiotônicos endógenos na função renal de ratos**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2009.

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 421–428, 2012.

CUNHA-FILHO, G. A.; RESCK, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FERREIRA, J. R. O.; RODRIGUES, F. A.; DOS SANTOS, M. L. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, v. 56, p. 339–348, 2010.

CUNHA-FILHO, G. A.; SCHWARTZ, C. A.; RESCK, I. S.; MURTA, M. M.; LEMOS, S. S.; CASTRO, M. S.; KYAW, C.; PIRES JUNIOR, O. R.; LEITE, J. R. S.; BLOCH JUNIOR, C.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major componentes from skin secretion of the *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v. 45, p. 777–782, 2005.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 9-13, 1995.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. The biology of amphibians. New York: **MacGraw-Hill**, 1996.

ENGELMAN, M. F. B.; NETO, J. G.; ANDRADE, C. H. V.; HERNANDEZ, R.; GOULART, L. B. N. T. Estudo morfológico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológicas de tiroxina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, p. 173-179, 2001.

European Medicines Agency. **Guideline on repeated dose toxicity**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2014.

FEDOROVA, O. V.; BAGROV, A. Y. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. **American Journal of Hypertension**, v. 10, p. 929-935, 1997.

FEDOROVA, O. V.; ZERNETKINA, V. I.; SHILOVA, V. Y.; GRIGOROVA, Y. N.; JUHASZ, O.; WEI, W.; MARSHALL, C. A.; LAKATTA, E. G.; BAGROV, A. Y. Synthesis of an endogenous steroidal Na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, p. 736-745, 2015.

FERNANDES, M. J. S.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A. Na⁺K⁺ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 28, p. 497-500, 1996.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, P. M. P.; LIMA, D. J. B.; DEBIASI, B. W.; SOARES, B. M.; MACHADO, K. C.; NORONHA, J. C.; RODRIGUES, D. J.; SINHORIN, A. P.; PESSOA, C.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Antiproliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* venom extracts from Southern Amazon. **Toxicon**, v. 72, p. 43-51, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; DA COSTA, P. M.; COSTA, A. M.; LIMA, D. J.; DRUMOND, R. R.; SILVA, J. N.; MOREIRA, D. R.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; FERREIRA, J. M.; DE QUEIROZ, M. G.; LEITE, A. C.; PESSOA, C. Cytotoxic and toxicological effects of phthalimide derivatives on tumor and normal murine cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 313-330, 2015.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

GENETIC RESOURCES CORE FACILITY (GRCF). **Services: Bioprocessing**. Disponível em: <<http://grcf.jhmi.edu/biorepository-cell-center/bioprocessing/blood-processing/>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 226-236, 2004.

GOMES-JÚNIOR, A. L.; PAZ, M. F. C. J.; SILVA, L. I. S.; CARVALHO, S. C. E. S.; SOBRAL, A. L. P.; MACHADO, K. C.; FERREIRA, P. M. P.; SATYAL, P.; FREITAS, R. M.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Serum oxidative stress markers and genotoxic profile induced by chemotherapy in patients with breast cancer: A pilot study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

HARRISON, A. P.; ERLWANGER, K. H.; ELBRØND, V. S.; ANDERSEN, N. K.; UNMACK, M. A. Gastrointestinal-tract models and techniques for use in safety pharmacology. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, p. 187-199, 2004.

HAUCK, C.; FRISHMAN, W. H. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺-ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. **Cardiology in Review**, v. 20, p. 130-138, 2012.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198-216, 2010.

KALLNER, A.; TRYDING, N. IFCC Guidelines to the evaluation of drug effects in clinical chemistry. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 49, p. 1-29, 1989.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 161-165, 2005.

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**. USA: McGraw-Hill Medical, 2003.

KERKHOFF, J.; NORONHA, J. C.; BONFILIO, R.; SINHORIN, A. P.; RODRIGUES, D. J.; CHAVES, M. H.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. Quantification of bufadienolides in the poisons of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* by HPLC-UV. **Toxicon**, v. 119, p. 311-318, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. 8. Ed. China: WB Saunders, 2009. 1464p.

LEFRANC, F.; MIJATOVIC, T.; KONDO, Y.; SAUVAGE, S.; ROLAND, I.; DEBEIR, O.; KRSTIC, D.; VASIC, V.; GAILLY, P.; KONDO, S.; BLANCO, G.; KISS, R.

Targeting the alpha-1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. **Neurosurgery**, v. 62, p. 211-221, 2008.

LEITE, E. A. **Avaliação da toxicidade aguda e atividade antitumoral de lipossomas ph-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

LI, F.; WENG, Y.; WANG, L.; HE, H.; YANG, J.; TANG, X. The efficacy and safety of bufadienolides-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 204–212, 2010.

LI, W.; LIN, X.; YANG, Z.; ZHANG, W.; REN, T.; QU, F.; WANG, Y.; ZHANG, N.; TANG, X. A bufadienolide-loaded submicron emulsion for oral administration: Stability, antitumor efficacy and toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 52–62, 2015.

LIMA, D. J. B. **Estudo da atividade anticâncer da marinobufagenina, um bufadienolídeo extraído de anfíbios da espécie *Rhinella marina***. 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

LIN, T. J.; SU, C. C.; LAN, C. K.; JIANG, D. D.; TSAI, J. L.; TSAI, M. S. Acute poisonings with *Breynia officinalis* - an outbreak of hepatotoxicity. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 41, p. 591-594, 2003.

LIU, L.; CHEN, B. A.; QIN, S. K. Anti-angiogenesis effect of arsenic trioxide plus cinobufacin on human hepatocarcinoma transplantation model nude mice. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 31, p. 67-72, 2011.

LOREAU, E. L.; KAUL, B.; LORENZ, J. N.; LINGREL, J. B. Ouabain-Sensitive α 1 Na,K-ATPase Enhances Natriuretic Response to Saline Load. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, p. 1947-1954, 2008.

LUCIO, E. M. R. A.; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9/10, p. 23-25, 2000.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of Calotropis procera stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 407-416, 2010.

MILLER, M. S.; GALLIGAN, J. J.; BURKS, T. F. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 6, p. 211-217, 1981.

MILLER, O. Bioquímica do Sangue - Substâncias não eletrolíticas. In: MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o Clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 3-31.

MIJATOVIC, T.; QUAQUEBEKE, E. V.; DELEST, B.; DEBEIR, O.; DARRO, F.; KISS, R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1776, p. 32–57, 2007.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, p. 91-106, 2012.

MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: Barraviera, B. (Ed.). **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. EPUB, Rio de Janeiro, Brasil, p. 225-232, 1999.

MORAIS, G. P.; ALENCAR, M. V. O. B.; ISLAM, T.; ARAUJO, L. S.; GOMES, D. C. V.; CARVALHO, R. M.; CORREIA, D.; PAZ, M. F. C. J.; FERREIRA, P. M. P.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FERRAZ, A.; GRIVICICH, I.; PICADA, J. N. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 10, p. 18-28, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55–63, 1983.

NOGUEIRA, R. M. D. **Status epilepticus induzido por Marinobufogenina, uma substância isolada das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis* Lutz 1925**. 2000. 171 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. 2000.

NUNES, D. C. S.; FAVALI, C. B. F.; SOUZA-FILHO, A. A.; SILVA, A. C. M.; FILGUEIRAS, T. M.; LIMA, M. G. S. Evaluation of cellular profile and main constituents the rat and mouse blood from the animal house of the Federal University of Ceará, Brazil. **Revista de Medicina da UFC**, v. 34, p. 21-29, 2004.

OECD 423. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, 2001.

OLIVEIRA, N. B.; PIRES JUNIOR., O. R. **Venenos e peçonhas animais: aplicações tecnológicas e Biopirataria**. 6ª Amostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC - Goiás. 20 p., 2011.

PEREIRA, J. B. A.; RODRIGUES, M. M.; MORAIS, I. R.; VIEIRA, C. R. S.; SAMPAIO, J. P. M.; MOURA, M. G.; DAMASCENO, M. F. M.; SILVA, J. N.; CALOU, I. B. F.; DEUS, F. A.; PERON, A. P.; ABREU, M. C.; MILITÃO, G. C. G.; FERREIRA, P. M. P. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais no centro-sul piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 550-556, 2015.

PINTO, L. M. O. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 20, p. 178-185, 1998.

PRATES, M. V.; BLOCH-JÚNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos – Uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 30-36, 2000.

QI, F.; INAGAKI, Y.; GAO, B.; CUI, X.; XU, H.; KOKUDO, N.; LI, A.; TANG, W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways *Cancer Sciences*, v. 102, p. 951–958, 2011.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1551-1557, 2007.

RAPPORT, R. L.; HARRIS, A. B.; FRIEL, P. N.; OJEMANN, G. A. Human epileptic brain: Na, K ATPase Activity and Phenytoin Concentrations. **Archives of Neurology**, v. 32, p. 549- 554, 1975.

RHIOUANIA, H.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378-386, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; GOMEZ, C. V.; ARIAS, A. R.; BURGOS-EDWARDS, A.; ALFONSO, J.; ROLON, M.; BRUSQUETTI, F.; NETTO, F.; URRRA, F. A.; CÁRDENAS, C. The Paraguayan *Rhinella* toad venom: Implications in the traditional medicine and proliferation of breast cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 106-118, 2017.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; ARANA, G. V.; THEODULOZ, C.; URRRA, F. A.; CÁRDENAS, C. Antiproliferative activity and chemical composition of the venom from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae). **Toxicon**, v. 121, p. 119-129, 2016.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; QUISPE, C.; THEODULOZ, C.; SOUSA JUNIOR, P. T.; PARIZOTTO, C. Antiproliferative activity and new argininyll bufadienolide esters from the “Cururú” toad *Rhinella (Bufo) Schneideri*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1076–1085, 2014.

SCHOSSLER, D.; ALIEVI, M. M.; EMANUELLI, M. P.; SCHOSSLER, J. P. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de *Flunixin meglumine* e ketoprofeno durante o trans e pós-operatório. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 16, p. 46-51, 2001.

SEEFF, L. B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinical Liver Disease**, v. 11, p. 77-96, 2007.

SILVA, A. R. H.; MOREIRA, L. R.; BRUM, E. S.; FREITAS, M. L.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROMAN, S. S.; MAZZANTI, C. M.; BRANDÃO, R. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 908-916, 2014.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A.C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Revista Fitos**, v. 3, p. 25-41, 2007.

STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, p. 51-63, 2010.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

WANSAPURA, A. N.; LASKO, V., XIE, Z., FEDOROVA, O. V., BAGROV, A. Y., LINGREL, J. B., & LORENZ, J. N. Marinobufagenin enhances cardiac contractility in mice with ouabain-sensitive $\alpha 1$ Na⁺-K⁺-ATPase. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, p. 1833-1839, 2009.

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1303-1314, 2004.

WILLIAMS, D. P.; KITTERINGHAM, N. R.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; SMITH, D. A.; PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Current Drug Metabolism**, v. 3, p. 351-366, 2002.

WOLFORD, S. T.; SCHROER, R. A.; GOHS, F. X.; GALLO, P. P.; BRODECK, M.; FALK, H. B.; RUHREN R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 18, p. 161-188, 1986.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v. 175, p. 17-25, 2002.

ANEXOS

ANEXO A: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação pré-clínica de parâmetros fisiológicos e da atividade antitumoral e toxicológica de extratos e/ou moléculas de anfíbios da família Bufonidae", registrada nº 133/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA- Biofísica e Fisiologia/ CCS/ UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 20/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/2016 à Dezembro/ 2018
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo isogênico/swiss 2. Rato isogênico/ wistar
Nº de Animais	1. 340 2. 56
Peso/ idade	1. 25 a 30g/ 2 meses 2. 250 a 350g/ 3 meses
Sexo	1. Fêmeas 2. Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI

Teresina, 20 de Julho de 2016.


 Prof^a. Iyete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO B: Artigo publicado na Toxicon.

Toxicon 127 (2017) 63–76



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Review

Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition



Lívia Queiroz de Sousa ^a, Kátia da Conceição Machado ^a,
 Samara Ferreira de Carvalho Oliveira ^b, Lidiane da Silva Araújo ^c,
 Evaldo dos Santos Monção-Filho ^c, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante ^a,
 Gerardo Magela Vieira-Júnior ^c, Paulo Michel Pinheiro Ferreira ^{a, d, *}

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Federal University of Piauí, 64607-670, Picos, Piauí, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

^d Department of Biophysics and Physiology, Laboratory of Experimental Cancerology, Federal University of Piauí, 64.049-550, Teresina, Piauí, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2016

Received in revised form

27 December 2016

Accepted 5 January 2017

Available online 7 January 2017

Keywords:

Toad secretion

Chemical diversity

Cell death

Cardiovascular role

Clinical studies

ABSTRACT

Amphibians present pharmacologically active aliphatic, aromatic and heterocyclic molecules in their skin as defense against microorganisms, predators and infections, such as steroids, alkaloids, biogenic amines, guanidine derivatives, proteins and peptides. Based on the discovered bioactive potential of bufadienolides, this work reviewed the contribution of amphibians, especially from members of Bufonidae family, as source of new cytotoxic and antitumor molecules, highlighting the mechanisms responsible for such amazing biological potentialities. Bufonidae species produce bufadienolides related to cholesterol through the mevalonate-independent and acidic bile acid pathways as polyhydroxy steroids with 24 carbons. *In vitro* antitumor studies performed with skin secretions and its isolated components (specially marinobufagin, telocinobufagin, bufalin and cinobufagin) from *Rhinella*, *Bufo* and *Rhaebo* species have shown remarkable biological action on hematological, solid, sensitive and/or resistant human tumor cell lines. Some compounds revealed higher selectivity against neoplastic lines when compared to dividing normal cells and some molecules may biochemically associate with Na⁺/K⁺-ATPase and there is structural similarity to the digoxin- and ouabain-Na⁺/K⁺-ATPase complexes, implying a similar mechanism of the Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cardenolides and bufadienolides. Some bufadienolides also reduce levels of antiapoptotic proteins and DNA synthesis, cause morphological changes (chromatin condensation, nuclear fragmentation, cytoplasm shrinkage, cytoplasmic vacuoles, stickiness reduction and apoptotic bodies), cell cycle arrest in G₂/M or S phases, mitochondrial depolarization, PARP [poly (ADP-ribose) polymerase] and Bid cleavages, cytochrome c release, activation of Bax and caspases (-3, -9, -8 and -10), increased expression of the Fas-Associated protein with Death Domain (FADD), induce topoisomerase II inhibition, DNA fragmentation, cell differentiation, angiogenesis inhibition, multidrug resistance reversion, and also regulate immune responses. Then, bufadienolides isolated from amphibians, some of them at risk of extinction, emerge as a natural class of incredible chemical biodiversity, has moderate selectivity against human tumor cells and weak activity on murine cells, probably due to structural differences between subunits of human and mice Na⁺/K⁺-ATPases.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Natural products as prototypes with drug-like properties 64

* Corresponding author. Avenida Universitária, lado ímpar, Universidade Federal do Piauí, Departamento de Biofísica e Fisiologia, 64049-550, Teresina, Brazil.

E-mail address: pmpf@ufpi.edu.br (P.M.P. Ferreira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.004>

0041-0101/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2.	Bufonidae family: classification, distribution, components of glandular secretions and environmental factors	64
2.1.	Is the chemical diversity of poisons at risk of extinction?	67
3.	Bufadienolides and cardenolides: occurrence, synthesis and cytotoxicity mechanisms	67
3.1.	Cytotoxicity analysis	68
3.2.	Are cardenolides and bufadienolides able to block Na ⁺ /K ⁺ -ATPase in tumor and normal cells?	69
3.3.	Bufalin and cinobufagin as lead molecules	71
4.	Conclusions remarks and future perspectives	73
	Ethical statement	73
	Acknowledgements	73
	Transparency document	74
	References	74

1. Natural products as prototypes with drug-like properties

Between 1981 and 2010, 1073 new chemical entities (New Chemical Entities - NCEs) were approved as drug by Food and Drug Administration (FDA) of the United States and 64% of them are natural, derived or synthesized molecules based on natural compounds. Despite the interest in molecular modeling, in combinatorial chemistry and other chemical synthesis techniques, natural products remains as important source of new therapeutic agents against infections (fungal or bacterial), disease vectors, cancer, dyslipidemia and immunomodulation (Butler, 2004; Balunas and Kingnorn, 2005; Newman and Cragg, 2012; Farias et al., 2013; Santos et al., 2013; Pereira et al., 2015; Simoes et al., 2015; Ferreira et al., 2016).

It has long been recognized that natural product structures have the characteristics of high chemical diversity, biochemical specificity, molecular flexibility and other molecular properties that make them more favorable as lead structures for drug discovery, help us to differentiate them from libraries of synthetic and combinatorial compounds. Moreover, fraction of natural product structures with two or more 'rule-of-five' violations is quite low ($\approx 10\%$) and similar to that of trade drugs (Lipinski et al., 1997; Feher and Schmidt, 2003; Ferreira et al., 2011; Newman and Cragg, 2012; Pascolutti and Quinn, 2014). All these advantages partially explain why about 60% of the NCEs introduced as pharmaceutical choices were directly or indirectly based on natural compounds. Definitely, these NCEs mimicking natural-product pharmacophores have already been selected and validated over thousands of years by environmental conditions, and possess interesting drug-like properties commonly found in natural molecules.

Amongst environmental resources, toxin-producing animals are part of the traditional medicine in several countries around the world. Amphibians, especially from Bufonidae family, present pharmacologically active aliphatic, aromatic and heterocyclic molecules in their skin with a diversified range of steroids, alkaloids, biogenic amines, guanidine derivatives, proteins and peptides as defense against microorganisms, predators and infections (Clarke, 1997; Daly, 1995; Duellman and Trueb, 1996; Prates and Bloch-Júnior, 2000; Daly et al., 2004; Costa-Neto, 2005; Gutierrez, 2016). These animal venoms have different biological activities. Briefly, reports have described trypanocidal, leishmanicide, antibacterial, antifungal (Riera et al., 2003; Cunha-Filho et al., 2005; Tempone et al., 2008), antiproliferative (Cunha-Filho et al., 2010; Gao et al., 2011; Moreno Y Banuls et al., 2013a; Ferreira et al., 2013; Sciani et al., 2013), insecticide (Supratman et al., 2000), antiviral (Wang et al., 2011) and cardiotoxic (Imai et al., 1965; Mijatovic et al., 2012) actions. In this context, cardenolides (ouabain and digoxin, for example) are the most widely studied cardiotoxic steroids and since PubMed database provides a total of

about 39,739 cardenolides references. Thus, based on the large and recently discovered pharmacological potential of bufadienolides, this work reviewed, in a systematic and critical way, the contribution of amphibians, especially from members of Bufonidae family, as source of new cytotoxic and antitumor molecules, highlighting the mechanisms responsible for such amazing biological potentialities.

2. Bufonidae family: classification, distribution, components of glandular secretions and environmental factors

Amphibians have emerged in late Devonian period with the change from aquatic to terrestrial environment due to the progressive behavioral and morphofunctional adaptations (Toledo and Jared, 1995).

From the quantitative point of view, there is an amazing global diversity of amphibian species. Brazil (789 species) and Colombia (642) have the largest number of species. China (335) has the largest number of species in the Old World. The Democratic Republic of the Congo (215) has the largest number from continental Africa and 239 species are recorded from Madagascar. Australia and Papua New Guinea have 225 and 289 species, respectively. In North America, Mexico has the largest number of species (357) but there are 291 species in the United States (Wake and Vredenburg, 2008).

Amphibians (Class Amphibia, Subclass Lissamphibia) include toads and frogs (Order Anura, ≈ 5600 currently recognized species), salamanders (Order Caudata, ≈ 570 species), and caecilians (Order Gymnophiona, ≈ 175 species), with up to 6345 species (Vitt and Caldwell, 2014). Anura order is the major Amphibia class group (Fig. 1). Most of them live in the Tropics, and about 600 species are found in the Amazonian basin. They are well adapted and one of the most abundant vertebrates present in a wide multiplicity of habitats. Other amphibians (salamanders and caecilians) are represented by a few species in Amazonian region, and they are also found in Mexico, Costa Rica, Asia, Africa and Europe (Gower and Wilkinson, 2005; Haseyama and Carvalho, 2011; Jia and Gao, 2016).

Bufonidae family has about 51 genus and 596 species distributed around the world, except Australia, Oceanic regions, Sahara desert, Madagascar, Arctic and Antarctic (Fig. 1). Studies molecular and phylogenetic relationships have recently reexamined this family and taxon nomenclatures were changed. For example, Chaparro et al. (2007) suggested that most of South American *Bufo* species were placed in genus *Rhinella* (Frost et al., 2006; Pramuk, 2006; Chaparro et al., 2007; Frost, 2015).

In Brazil, Bufonidae family is represented by seven genera, and *Rhinella* is the most representative with nearly 40 species. They are commonly known by its generic name "sapo-cururu" (*kuru'ru* from Tupi, meaning big toad). One of the most analyzed species in Amazonian region is *Rhinella marina* (Fig. 2A), former *Bufo marinus* (Easteal, 1963). Other specimens found in the Amazon basin are

Leptodactylus labyrinthicus (Leptodactylidae, Fig. 2B), *Rhaebo guttatus* (Bufonidae, Fig. 2C) and *Phyllomedusa camba* (Hylidae, Fig. 2D).

The main adaptive physiological mechanisms are interconnected to the skin, which certainly played an extraordinary role to prevent dehydration and allowed organic evolution and systemic adjustments. Moreover, skin of amphibians has extra important functions, including breathing regulation, transport of water and solutes, blood pressure and body temperature control and production of compounds with antibiotic activity to protect animals against bacterial, viral and fungal infections and predators, which is considered one of the main factors that ensured survival and animal permanence in terrestrial environments (Duellman, 1992; Clarke, 1997). Many of these compounds are synthesized by glands dispersed all over the skin. In bufonids, multicellular exocrine glands are grouped behind the eyes, forming a pair of postorbital structures, known as parotoid macroglands (Duellman, 1992; Daly, 1995; Toledo and Jared, 1995; Perry, 2000; Jared et al., 2011). Interestingly, some compounds are also responsible for Na^+ excretion in amphibians and their levels and secretion compositions depend on environmental salinity and climate (Lichtstein et al., 1991).

Toad species venoms from *Phyllobates* (Dendrobatidae) are historically known by indigenous tribes of Colombian Amazonian, since they put such venoms in the ends of blow pipes for hunting

practice (Hickman Júnior et al., 2009). Batrachotoxin [BTX (1), Fig. 3] from *Phyllobates terribilis* and *P. bicolor*, is responsible for paralysis and death and one of the most powerful toxins found in nature. It is an alkaloid that binds to the Na^+ channel and causes persistent activation of excitable cell membrane resting potential through a mechanism which blocks sodium channel and cause voltage changes towards high negative values. About 2 mg/kg of body weight is a lethal dose, whose value is equivalent to two salt grains. Just one toad has BTX enough to kill 8 individuals (Catterall et al., 2007). BTX and bufalin (2) (Fig. 3) inhibit propagation of painful stimulus (Krenn and Kopp, 1998; Bosmans et al., 2004). Comparably, analgesic properties of the alkaloid Epibatidine (3) (Fig. 3), isolated from *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae) (Daly et al., 2004; Fitch et al., 2010) are biological consequences of its binding to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors.

About 28 structural classes of alkaloids are known in poison frogs. Of the environmental point of view, most of them work as a chemical defense against predation and. It is argued that some frogs do not synthesize their poisons, but sequester chemicals from arthropods, such as ants, centipedes and mites – the diet-toxicity hypothesis (Daly et al., 1994; Darst et al., 2005). So, captive-bred animals do not possess significant levels of toxins as they are reared on diets since they do not contain alkaloids sequestered by wild members. It is believed that the maternal behavior of some species lay unfertilized eggs, which are laced with trace quantities

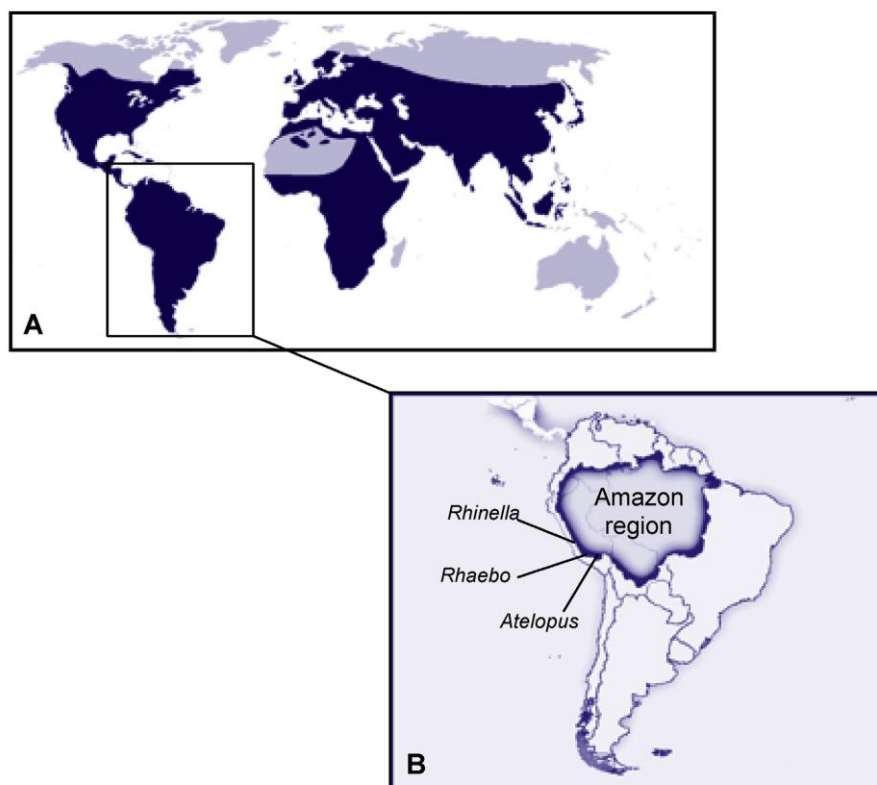


Fig. 1. Natural distribution of members from Bufonidae family. A - Bufonidae has about 51 genus and 596 species distributed around the world (in dark blue), except Australia, Oceanic regions, Sahara desert, Madagascar, Arctic and Antarctic (grey). B - In Brazil, *Rhinella* is the most representative genus, followed by *Rhaebo* and *Atelopus* genera (Easteal, 1963; Frost et al., 2006; Pramuk, 2006; Chaparro et al., 2007; Lima et al., 2012; Frost, 2015). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Fig. 2. Amphibians from Brazilian Amazon. *Rhinella marina*, Bufonidae (A), releasing its skin secretion; *Leptodactylus labyrinthicus*, Leptodactylidae (B); *Rhaebo guttatus*, Bufonidae (C) and *Phyllomedusa camba*, Hylidae (D). Personal archives.

of alkaloids, to feed the tadpoles, possibly because the cutaneous granular glands (the storage sites for alkaloids) mature just prior to metamorphosis, indicating introduction of poisons in a premature stage of the embryo development, as seen with dendrobatids. Glands enlarge throughout development, particularly at sexual maturity. However, some predators have shown the ability to overcome the toxicity of venoms, such as *Leimadophis epinephelus*

(Colubridae), a snake native from the Amazon rainforests that has developed immunity to the poison (Saporito et al., 2007; Stynoski et al., 2014). However, it is possible that females provision eggs with alkaloids and thus provide developing tadpoles with chemical defenses that maternally derived alkaloids in tadpoles may function as an effective deterrent against arthropod predators (Stynoski et al., 2014).

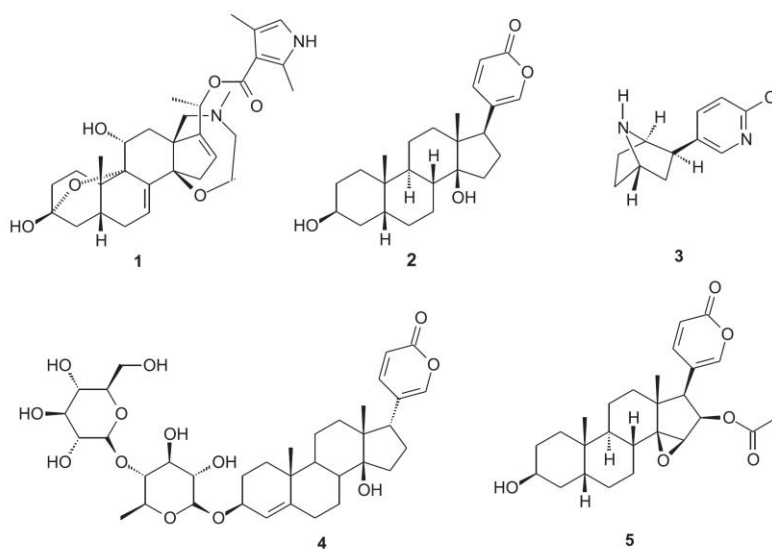


Fig. 3. Molecules from toad venoms historically reported.

2.1. Is the chemical diversity of poisons at risk of extinction?

Detailing this question: Would be such amazing original source of molecules with unthinkable drug-like properties and structural arrangement at risk of annihilation?

Global climate change (e.g., warming) and many other factors (e.g., epidemics of infectious disease and habitat destruction and modification) responsible for extinction events are directly related to human activities. Amphibians have received considerable attention during the last three decades because of a now-general understanding that a larger proportion of amphibian species are at risk of extinction than those of any other taxon (Stuart et al., 2004).

Regarding to amphibians, there are many reasons by which they might be vulnerable to current environmental challenges, working as multipurpose sentinels of environmental contamination. Their life cycle involves aquatic development of eggs and larvae and terrestrial activity as adults, exposing them to a wide range of circumstances: i) frog larvae are herbivores, whereas adults are carnivores, thus subjecting them to a big diversity of food, predators and parasites; ii) they have cutaneous respiration as more important than lung gas exchange of CO₂ and O₂; iii) their well vascularized skin places them in direct and sustained contact with the environment, which become amphibians vulnerable to changes in water or air quality resulting from diverse pollutants; and iv) they are poikilothermic animals, making them more sensitive to environmental temperature changes, especially for tropical species that experience little temperature variation. Then, most of the species possess weak capacity for acclimation after quick environmental fluctuations. So, for these and extra specific reasons, the Global Amphibian Assessment believes that 20–30% of the known species of amphibians are “globally threatened” and 43% of species have declining populations, particularly those from tropical regions and 785 are already extinct (Stuart et al., 2004; Wake and Vredenburg, 2008).

Does the lost of species necessarily mean an irreparable disappearance of undiscovered compounds with potential for Research & Development (R&D) of pioneering drugs with remarkable pharmacological potential? Some compounds are commonly found in distinct species but others are species-specific due to specific environmental conditions such as temperature, food and morphological adaptations (Duellman, 1992; Toledo and Jared, 1995; Ferreira et al., 2013). A frog from India is so distinct that it was placed in a new family (Biju and Bossuyt, 2003) and a salamander from South Korea is the only Asian member of the Plethodontidae family (Min et al., 2005). So, if lost biodiversity is an unhappy and severe prejudice for the nature and life cycles, including reproduction and food chain links in singular niches, it also reduces the molecular and bioactive miscellany of molecules and the possibility to utilize them as novel tools with innovative therapeutic purposes.

3. Bufadienolides and cardenolides: occurrence, synthesis and cytotoxicity mechanisms

Chemical components and pharmacological properties of secretions from parotoid glands of Bufonidae members have been studied for a long time (Chen and Chen, 1933). Egyptians were the first to use squill (*Scilla maritima*), a plant with scillaren A (4, Fig. 3). This was the first bufadienolide identified whose structure was elucidated in 1933 and exploited in heart disorders. Asian cultures (Chinese were the first) manipulate different toad skin secretions to prepare folk medicines (Krenn and Kopp, 1998). *Chan'Su*, the toad dry poison of *Bufo bufo gargarizans* and *Bufo melanostictus*, is distributed in several Chinese regions and other Asian countries,

and extensively used due to its anesthetic, anti-inflammatory, cardiotoxic, diuretic, tonsillitis, sore throat, palpitations and homeostatic properties. Bufalin (2) and cinobufagin (5) (Fig. 3) are two important bufadienolides of *Chan'Su* that have been widely employed in cancer clinical therapy in China (Steyn and Heerden, 1998; Ye et al., 2004; Li et al., 2015).

All bufadienolides are polyhydroxy steroids with 24 carbons related to cholesterol in the free form or conjugated with sulfates, dicarboxylic esters and amino acids at C-3 position, characterized by containing one unsaturated lactone ring and a 2-pyrone group attached at the C-17 position of the perhydrophenanthrene nucleus (6, Fig. 4) (Toledo and Jared, 1995; Steyn and Heerden, 1998; Nogawa et al., 2001; Bick et al., 2002; Dmitrieva et al., 2000; Xu-Tao et al., 2009; Yang et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Córdova et al., 2016).

Around 250 bufadienolides have been identified including from plants (Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae and Santalaceae) and animals, such as *Rhinella* (formerly *Bufo*), *Rhaebo* and *Peltophryne*, snakes (*Rhabdophis tigrinus*) and arthropods (*Photinus*) (Eisner et al., 1978; Krenn and Kopp, 1998; Hutchinson et al., 2007; Cunha-Filho et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Córdova et al., 2016). The great variety of known compounds is mainly due to substituents number and position (Meng et al., 2001; Gao et al., 2011). Structure-activity relationship analyses of these compounds have shown cardiotoxic (Imai et al., 1965; Lichtstein et al., 1991; Hauck and Frishman, 2012), antiviral (Kamano et al., 1988; Wang et al., 2011), cytotoxic (Cunha-Filho et al., 2010; Gao et al., 2011; Ferreira et al., 2013; Sciani et al., 2013), antibacterial (Cunha-Filho et al., 2005), antiparasitic (Tempone et al., 2008), insecticidal (Supratman et al., 2000), antiangiogenic, hypertensive, immunosuppression and anti-endometriosis (Cunha-Filho et al., 2010) actions.

In plant and some classes of animals (e.g., reptiles), bufadienolides and cardenolides have similar sources, since cells from such organisms synthesize them through the mevalonate-independent pathway. The condensation of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA to produce 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) is catalysed by the enzyme HMG-CoA synthase. HMG-CoA is irreversibly reduced by an enzymatic reaction with nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH + H⁺) in the presence of water, affording (R)-mevalonic acid, which is converted to active isopentyl pyrophosphate or isoprene (C₅), the basic unit of terpenes. Therefore, terpenes are also denoted as isoprenoids (Bloch, 1992; Zografos, 2016). Isopentyl pyrophosphate isomerizes in the presence of an isomerase containing SH groups to dimethylallyl pyrophosphate. The electrophilic allylic CH group of dimethylallyl pyrophosphate and the nucleophilic methylene group of isopentenyl pyrophosphate connect to geranyl pyrophosphate as monoterpene (C₁₀). The reaction of geranyl diphosphate with one equivalent of isopentenyl diphosphate yields farnesyl diphosphate as a sesquiterpene (C₁₅).

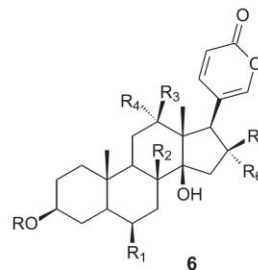


Fig. 4. General chemical structure of bufadienolides.

Geranyl pyrophosphate as a diterpene (C20) emerges from the attachment of isopentenyl pyrophosphate with its nucleophilic head to farnesyl pyrophosphate with its tail. The synthesis of sesquiterpenes (C25) involves an additional head-to-tail linkage of isopentenyl pyrophosphate (C5) with geranylgeranyl pyrophosphate (C20). A tail-to-tail connection of two equivalents of farnesyl pyrophosphate leads to squalene as a triterpene (C30) and tetraterpenes (C40). From squalene, cycloartenol originates cholesterol as a precursor for steroids (C21), which will be used as substrates to synthesized cardenolides (C23) and bufadienolides (C24) (Bloch, 1992; Adam et al., 2002; Zografos, 2016).

Chromatographic profile analysis of toad venom extracts from males and females specimens collected from *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* in southern Amazon revealed four bufadienolides in *R. marina* [bufalin (2), telocinobufagin (7), marinobufagin (8), and resibufogenin (9), Fig. 5] and one bufadienolide in *R. guttatus* poison extracts (marinobufagin).

In mammals, steroids are also derived from cholesterol, and the traditional biosynthesis of biologically active steroids begins via the side-chain cleavage of cholesterol by the cytochrome P₄₅₀ enzyme CYP11A1 and conversion into pregnenolone, though this pathway is not involved in marinobufagin biosynthesis (Dmitrieva et al., 2000; Payne and Hales, 2004; Murrell et al., 2005). Additional steroidogenesis, which also generates endogen marinobufagin (8), for example, include acidic bile acid pathways and its biosynthesis is controlled by CYP27A1 enzyme, but not by CYP11A1. Silencing of CYP27A1 mRNA by siRNAs (small interference RNAs) in adrenocortical cell cultures reduced total bile acids and marinobufagin levels, indicating the participation of the acidic bile acid pathway in marinobufagin production (Thomas et al., 2008; Uno et al., 2014; Fedorova et al., 2015).

3.1. Cytotoxicity analysis

Cytotoxicity analysis using tetrazolium assays has been used in high-throughput screening (HTS) programs to select substances with antineoplastic action due to its quickness, sensitivity and low-cost (Mosmann, 1983; Berridge et al., 1996; Ferreira et al., 2013; Monção et al., 2015). These methods analyze cell viability and metabolic status based on salt conversion (MTT, XTT, MTS, WST-1) into formazan by mitochondrial enzymes (such as succinyl dehydrogenase) present only in viable cells. Cytotoxic studies by this method allow easily assessing viability but does not indicate the mechanism of action by which the substance acts (Berridge et al., 1996; Niles et al., 2008).

Some poison extracts from *R. marina* and *R. guttatus* were evaluated by MTT assay [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide)] and revealed cytotoxic activity on human tumor cell lines, especially those from *R. marina* extracts, whose IC₅₀ values are similar to those obtained with doxorubicin

Table 1

Hemolytic potential of venom extracts from toads and cytotoxic activity on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) according to Ferreira et al. (2013).

Extract	EC ₅₀ (μg/mL) ^a	IC ₅₀ (μg/mL) ^b	Selectivity ^c
	Human erythrocytes	PBMC	
RMF-1	>200	0.8 (0.6–0.9)	80
RMF-2	>200	0.5 (0.3–0.7)	10
RMF-3	>200	0.4 (0.2–0.6)	40
RMF-4	>200	0.3 (0.2–0.4)	30
RMM-5	>200	1.1 (0.5–2.4)	15.6
RGF-6	33.7 (28.1–40.5)	0.8 (0.6–0.9)	0.3
RGF-7	30.8 (27.7–34.2)	16.0 (10.6–24.3)	3.5
RGF-8	20.8 (15.8–27.4)	13.1 (11.1–15.4)	3.6
RGM-9	27.9 (22.8–34.3)	13.9 (11.0–17.6)	2.8

Rhinella marina female/male (RMF/RMM); *Rhaebo guttatus* female/male (RGF/RGM).

^a Data are presented as EC₅₀ values and 95% confidence interval for human erythrocytes after 1 h exposure. Triton x-100 (1%) was used as positive control.

^b Data are presented as IC₅₀ values and 95% confidence interval for PBMC after 72 h exposure. Doxorubicin was used as positive control.

^c Selectivity coefficient determined by IC₅₀ in PBMC/IC₅₀ in HL-60 cells.

(Table 1), a drug widely used in clinic trials against breast and colon carcinomas. Thus, all *R. marina* venom extracts revealed higher cytotoxic action when compared to *R. guttatus* and IC₅₀ values ranging from 0.01 μg/mL (HL-60, promyelocytic leukemia) to 0.23 μg/mL (OVCAR-8, ovarian carcinoma) (Ferreira et al., 2013). According to the American National Cancer Institute (NCI-USA), extracts with IC₅₀ values lower than 30 μg/mL are considered promising for further purification studies (Suffness and Pezzuto, 1990).

Chloroformic and ethanolic extracts (8:2) from *R. marina* and *R. guttatus* showed low cytotoxicity on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from peripheral blood of healthy adult volunteers, non-smokers who did not use any drugs for at least 15 days prior to collection, aged between 18 and 35 years. Some extracts were up to 80-fold more selective against leukemia cells when compared to dividing normal leukocytes (Ferreira et al., 2013), a desired advantage to new anticancer target molecules. Recently, ethanolic extracts from skin and paratoid glands of *Bufo bufo gargarizans* Cantor showed promising cytotoxicity against cancer cells (MCF-7, Jurkat T and A-549), whose outcomes were confirmed by single-cell gel electrophoresis (Comet assay), cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) and sub-G₁ DNA content, and slight effects on PBMC viability (Lee et al., 2014).

In the context of the antineoplastic therapy, toxicological assessment on normal cells received great attention due to adverse effects frequently related to a narrow therapeutic window, multiple drug resistance and morphological and physiological similarities between normal and transformed cells. This makes very difficult to avoid them, especially with patients in advanced stages, when

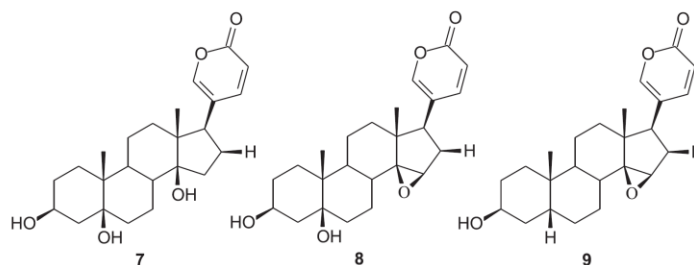


Fig. 5. Bufadienolides commonly found in poison extracts from *Rhinella marina*.

chemotherapy side effects may overcome benefits and survival and they are not followed by improvement in life quality (Anazetti et al., 2003; Kamb, 2005; Souza et al., 2007; Santos et al., 2010). Cunha-Filho et al. (2010) and Sciani et al. (2013) identified non-hemolytic activity in *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri* and *R. major* skin secretions at concentration of 50 µg/mL, suggesting that mechanism of cytotoxicity is related to a more specific way and it is probably not associated with direct damage to membrane. However, cell membrane rupture was demonstrated after 1h exposure to *R. jimi*, *R. margaritifera*, *R. guttatus* and *Phyllomedusa hipocondrialis* extracts (Cunha-Filho et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Sciani et al., 2013). Then, divergent results have been seen with *R. guttatus* venom extracts, since all samples tested exhibited hemolytic potentiality (Ferreira et al., 2013), a contradictory finding when compared to that described by Sciani et al. (2013), who reported no membrane damage. These differences are possibly correlated with range of concentrations used.

In vitro antitumor studies performed with *Rhinella*, *Bufo* and *Rhaebo* species (*B. melanostictus*, *R. schneideri*, *R. marina*, *R. margaritifera*, *R. hypocondrialis*, *R. major*, *R. margaritifera*, *R. crucifer* and *R. jimi*), including skin secretions and its components such as bufotalin (10), hellebrin (11), epoxy marinobufagin (12), bufalin (2), 3β-acetoxy-bufalin (13), hellebregenin (14), hellebregenin 3-acetate (15), marinobufagin (8), marinobufagin 3-acetate (16), cinofagin (17), telocinobufagin (7), 3β-acetoxy-marinobufagin (18), 3β-acetoxy-telocinobufagin (19) and gamabufotalin rhamnoside (20) (Fig. 6), alkaloids, metabolic derivatives and bufadienolides from the traditional Chinese drug, *Chan'Su*, showed activity against several human tumor cell lines such as colon (26-L5), leukemia (K-562, U-937 ML-1, Jukart T, HL-60), melanoma (MDA/MB-435, SKMEL-28), breast (MCF-7, MDA/MB-231) glioblastoma (U-373), oligodendroglioma (Hs-683), gastric adenocarcinoma (AGS), prostate (DU-145, PC-3, LNCaP), bladder (BIU-87, J-82), osteosarcoma (MG-63), hepatocellular carcinoma (HepG2), lung carcinoma (A-549, SK-MES-1) and primary liver carcinoma PLC/PRF/5 (Zhang et al., 1998; Nogawa et al., 2001; Ogasawara et al., 2001; Kamano et al., 2002; Yeh et al., 2003; Su et al., 2009; Cunha-Filho et al., 2010; Qi et al., 2011; Sciani et al., 2013; Moreno Y Banuls et al., 2013a; Lee et al., 2014; Schmeda-Hirschmann et al., 2014; Wang and Bi, 2014).

3.2. Are cardenolides and bufadienolides able to block Na⁺/K⁺-ATPase in tumor and normal cells?

Since cardiotonic steroids (cardenolides and bufadienolides) bind to the Na⁺/K⁺-ATPase subunits, it is believed that cell death activation by bufadienolides may be associated with inhibition of this pump (Newman et al., 2008; Gao et al., 2011).

Cardiotonics are steroid compounds distinguished by interacting with the main carrier protein in eukaryotic cells, the sodium potassium pump (Na⁺/K⁺-ATPase). These pump is an integral heterodimeric plasma membrane protein with two subunits [(α (catalytic subunit) and β (regulatory subunit)], belonging to the ATPases P-type family and very conserved in eukaryotic cells (invertebrates, vertebrates and protozoa) (Bagrov et al., 2009; Mijatovic et al., 2012). There are four isoforms of the α subunit (α₁, α₂, α₃ and α₄) and three for the β subunit (β₁, β₂ and β₃), which adds to the diversity of Na⁺/K⁺-ATPase function (Lingrel, 2010). Associated to these subunits, there are small-membrane proteins belonging to the FXD family, and at least five of the seven members of this family (types FXD 1, 2, 3, 4 and 7) are auxiliary subunits of Na⁺/K⁺-ATPase and regulate Na⁺/K⁺-ATPase activity in a tissue- and isoform-specific way, explaining, at least in part, the high complexity of regulation of Na⁺ and K⁺ levels by the pump in several physiological or pathological situations (e.g., renal Na⁺

reabsorption, muscle contractility and neuronal excitability) (Geering, 2006; Lingrel, 2010).

Na⁺/K⁺-ATPase works as an electrogenic transporter of Na⁺ and K⁺ between intracellular and extracellular pathways (maintaining cell membrane potential), executes nutrient and Na⁺-coupled amino acid transports and maintains osmotic balance and cell volume regulation. The regulation of Na⁺/K⁺-ATPase in human tissues is controlled by hormones such as aldosterone, thyroid hormone, catecholamines, insulin, and the long-term regulation exerted by thyroid hormone and aldosterone is mediated by changes in gene expression. The short-term regulation exerted by catecholamines is mediated by reversible phosphorylation of the pump catalytic subunit. Due to signal transduction versatility, it also participates in cellular adhesion, abnormal protein expression and development and progression of several cancers (Ewart and Klip, 1995; Aires, 2011; Mijatovic et al., 2012; Moreno Y Banuls et al., 2013b).

Ouabain (21, Fig. 7) has almost 1000-fold less affinity to the Na⁺/K⁺-ATPase of rodents when compared to the human pumps probably due to the presence of mutations in the extracellular portion of α subunit. This discovery helps us to understand the 1000-fold lower sensitivity of mice cells for cardiotonic steroids. Some glioma human tumor lines (HFU-251, U-251) and melanoma (BRO) that showed greater ability to form colonies presented higher expression of Na⁺/K⁺-ATPase α₁ subunit, suggesting that this subunit is involved in tumor growth and cell survival. This subunit is overexpressed in non-small cell carcinomas, glioma, melanoma and kidney cancers. Meanwhile, α₃ subunit was found overexpressed in colon carcinomas (Lefranc et al., 2008; Yang et al., 2009; Mijatovic et al., 2012). So, some studies have demonstrated relatively better selective action on tumor cells because these cells have higher expression and catalytic activity of Na⁺/K⁺-ATPase.

Recently, arenobufagin (23) was the first and highest bufadienolide isolated from Antillean endemic bufonids' poisons from the Cuban Giant toad *Peltophryne fustiger*. It was able to inhibit Na⁺/K⁺-ATPase in similar levels to bufalin (2) and telocinobufagin (7) (Touza et al., 2011; Laursen et al., 2015). Laursen et al. (2015) also defined the structure of the complex constituted by bufalin-porcine kidney Na⁺/K⁺-ATPase in the presence of K⁺, whose appearance is structurally similar to the digoxin- and ouabain-Na⁺/K⁺-ATPase complexes. These discoveries suggest a similar mechanism for Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by cardenolides and bufadienolides. Hydroxyl substituent at C-14 position of bufalin is able to produce stabilized bindings in the porcine enzyme complex. Regarding to the lactone group, it reached deeper into the cation-binding site of the porcine enzyme than ouabain and digoxin (Laursen et al., 2015). Such binding way of the molecule bufalin indicated the relevance of the hydroxyl at C-14 and the six membered lactone moiety to inhibit the porcine Na⁺/K⁺-ATPase. Porcine and human Na⁺/K⁺-ATPases have 98.1% of homology. So, inhibition of human kidney enzyme by bufalin, telocinobufagin and arenobufagin probably has a similar mechanism of action. Certainly, they have demonstrated relatively better selective action on tumor cells because they have bigger expression and catalytic activity of Na⁺/K⁺-ATPase (Moreno Y Banuls et al., 2013b).

Specific studies have also demonstrated that many cardiotonic steroids are i) able to sensitize apoptosis-resistant cancer cells to pro-apoptotic stimuli; ii) induce apoptosis in lymphoma and leukemia cells; iii) cause death of cancer cells through inhibition of Src- or MAPK and induction of p53 expression, inhibition of general protein synthesis and hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and irreversible autophagy; iv) overcome MDR (multidrug resistant) phenotypes (Dinara et al., 2003; Johnson et al., 2002; Frese et al., 2006; Zhang et al., 2008; Lefranc et al., 2008; Perne et al., 2009; Simpson et al., 2009; Wang et al., 2009; Dong et al., 2011; Juncker

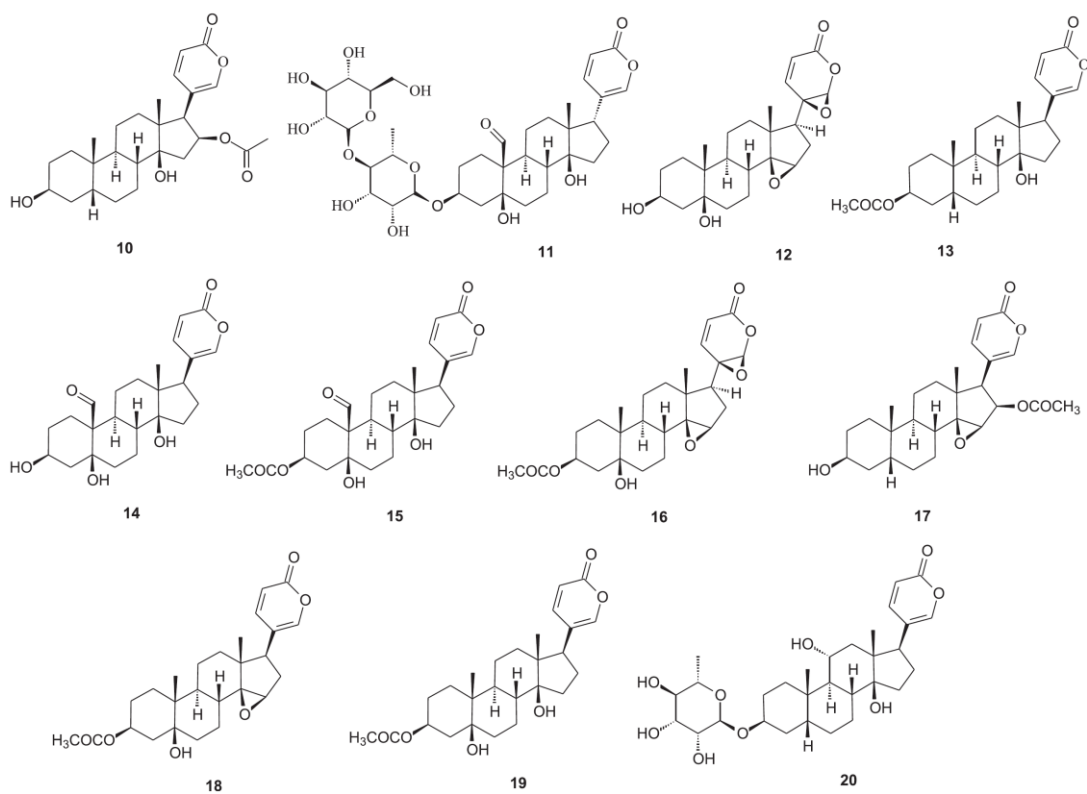


Fig. 6. Additional compounds isolated from skin secretions of *Rhinella* and *Rhaebo* species.

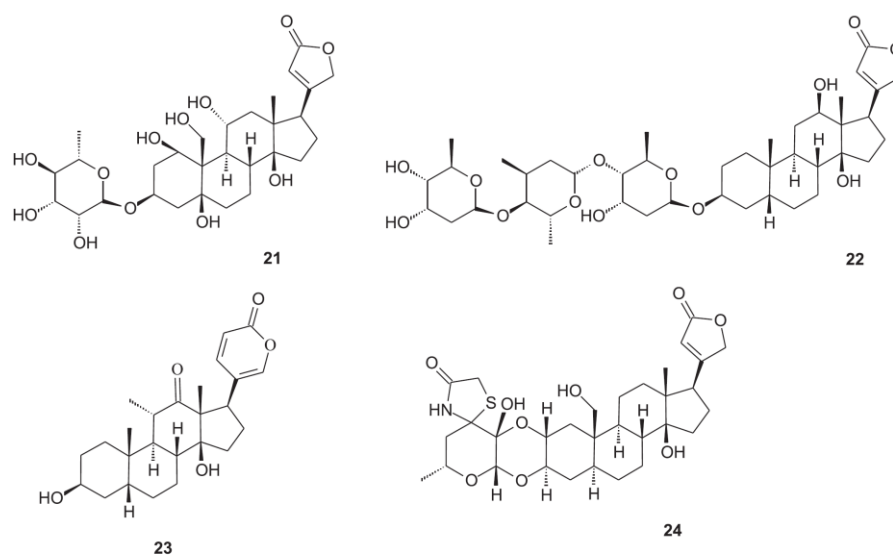


Fig. 7. Cardio-tonic steroids.

et al., 2011). Indeed, while ouabain activates the MDR phenotype, 19-hydroxy-2''-oxovorsharine (24), hellebrin (11) and

hellebrigenin (14) display similar and marked anticancer activity in chemosensitive versus MDR tumor cells. Hellebrin (11) and

hellebrigenin (**14**) displayed of about 2-fold higher affinity for the Na^+/K^+ -ATPase α_1 subunit than for the α_2 and α_3 subunits (Mijatovic et al., 2012; Moreno Y Banuls et al., 2013b). Moreover, previous reports also showed that the 19-hydroxy-2''-oxovoruscharine and gamabufotalin-rhamnoside/gamabufotalin and hellebrin/hellebrigenin decrease $[\text{ATP}]_i$ in cancer lines, while weaker effects were seen in normal cells (Lefranc et al., 2008; Mijatovic et al., 2012; Moreno Y Banuls et al., 2013b).

Moreno Y Banuls et al. (2013b) presented gamabufotalin rhamnoside (**20**) as 100-fold more potent against tumor line cells (Hs-683, MCF-7, PC-3, A-549, U-373, SKMEL-28; Cl_{50} values lower than 1 μM) when compared to the ouabain (**21**) and digoxin (**22**) ($\text{Cl}_{50} > 10,000 \mu\text{M}$, Fig. 7). On the other hand, bufotalin (**10**) and hellebrin (**11**) were more active than ouabain and digoxin, but about 10-fold less cytotoxic than gamabufotalin rhamnoside. This molecule has been the first compound with cytotoxic action on murine neoplastic lines [(CT26.WT (colon), B-16/F-10 (melanoma)], though with much higher Cl_{50} values (877 and 659 μM), an interesting finding emphasizing the antiproliferative action of bufadienolides upon human cells and absence or low cytotoxicity in mouse cells.

Digitalis-like steroids may also play a hormone and/or modulator role in nervous and cardiovascular systems and are involved in hypertension physiological findings (Manunta et al., 2001). For example, high levels marinobufagin (**8** - 3 β ,5 β -dihydroxy-14,15-epoxy bufodienolide - also called marinobufagenin) were detected in hypertensive states, cardiac diseases and in patients with renal failure and it exhibits a greater affinity for the ouabain-resistant α_1 subunit of Na^+/K^+ -ATPase, the main sodium pump isoform in renal tubules (Fedorova et al., 1997; Hauck and Frishman, 2012). On the other hand, resibufogenin is known for reducing high blood pressure in animal models during preeclampsia (Vu et al., 2006).

It is possible that marinobufagin (**8**) not only participates in blood pressure regulation but also induces cardiac and vascular fibrosis, a hallmark of cardiovascular aging, resistant hypertension, and chronic kidney disease. Administration of antimarinobufagin monoclonal antibodies in salt-sensitive hypertension models lowers blood pressure, reverses preeclampsia-induced Na^+/K^+ -ATPase inhibition, and potentially reverses cardiac fibrosis in uremic rats, all conditions when marinobufagin levels are augmented (Kennedy et al., 2006; Fedorova et al., 2008; Aires, 2011; Kolmakova et al., 2011; Haller et al., 2012).

Despite the bufadienolide sodium pump ligands are emerging as potentially important therapeutic targets, hypertensive salt-sensitive rats displayed increased plasma and adrenocortical levels of marinobufagin (**8**), which was accompanied by inhibition of Na^+/K^+ -ATPase and blood pressure elevation. Angiotensin II stimulates marinobufagin production by cells from adrenal cortex and adrenalectomy in rodents decreased plasma digoxin-like immunoreactivity and marinobufagenin levels, establishing adrenals as the major source of marinobufagin and other cardiotoxic steroids in mammals (Fedorova et al., 2002, 2005; Kennedy et al., 2006; Elkareh et al., 2007). Marinobufagin may also be associated with ethanol addiction because it attenuated the search for alcohol through Na^+/K^+ -ATPase interaction in cerebral cortex of animal models (Kashkin et al., 2002).

Post-transcriptional silencing of the CYP27A1 gene in human trophoblast and rat adrenocortical cells reduced the expression of CYP27A1 mRNA by 70%, reduced total bile acids 2-fold, and marinobufagin (**8**) levels by 67% when compared with nontreated cells or cells transfected with nontargeting siRNA. *In vivo* high-salt administration experiments showed that male and female Dahl salt-sensitive rats became hypertensive after 4 weeks on a high-NaCl diet, their plasma marinobufagenin levels doubled, and

adrenocortical CYP27A1 mRNA and protein increased significantly. Intriguingly, circulating levels of marinobufagin in female rats were also 2-fold lower than in males and were associated with lower systolic blood pressure in females at baseline than in males. Maybe, lower circulating marinobufagenin level in females is an adaptive mechanism because, during pregnancy, additional marinobufagin will be synthesized in placenta. Such findings partially explain how this substance is synthesized in mammalian placenta and adrenal cortex from cholesterol through the novel acidic bile acid pathway (Fedorova et al., 2015) and help us understand the role of endogenous bufadienolides in human cardiovascular diseases.

3.3. Bufalin and cinobufagin as lead molecules

Studies have shown that some skin secretions obtained from *Rhinella crucifer*, *R. major*, *R. schneideri*, *R. margaritifera*, *Phyllomedusa hypocondrialis*, *Rhaebo guttatus*, *R. crucifer*, *R. margaritifera*, *R. major* and *P. hypocondrialis* are a fascination source of bufalin (**2**), telocinobufagin (**7**), hellebrin (**11**) and cinobufagin (**17**), substances that reduce levels of antiapoptotic proteins as Bcl-2, cell viability, DNA synthesis and cause morphological changes (chromatin condensation, nuclear fragmentation, cytoplasm shrinkage, cytoplasmic vacuoles, stickiness reduction, blistering membrane and apoptotic bodies) in human breast carcinomas (MDA/MB-231 and MCF-7) (Yeh et al., 2003; Sciani et al., 2013).

Bufadienolides from *B. bufo gargarizans* - bufalin (**2**) and cinobufagin (**17**, synonym: Cinobufacin) - induced death of HepG2 cells after 24 h exposure and caused cell viability reduction and increase apoptotic cells due to cytochrome c release, mitochondrial depolarization, PARP [poly (ADPribose) polymerase] and Bid cleavages, increasing of Bax and reducing of Bcl-2 levels, activation of caspases (-3, -9, -8 and -10), and increased expression of the Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) (Qi et al., 2011).

In the traditional Chinese medicine, *Chan'Su*, an ethanolic extract from skin and parotid venom glands of *Bufo bufo gargarizans* Cantor and widely used for cancer therapy, it was also showed bufalin (**2**) and cinobufagin (**17**). This extract activated similar results on MCF-7, A-549 and T-cell leukemia (Jurkat T) tumor cell lines after 48 h of treatment, including decreasing in cellular viability, augment of apoptotic cells, DNA single- and double-strand breaks (detected by the Comet assay) and micronuclei induction (Lee et al., 2014). Hashimoto et al. (1997) showed that bufalin is able to inhibit topoisomerase II (Topo II), an enzyme responsible for stabilization of the DNA cutting complex and an auspicious target of many antitumor drugs. Topo II inhibition promotes DNA fragmentation, an important attribute to activate tumor apoptosis.

Bufalin (**2**) activates initiator (caspase-9) and effector (caspase-3) caspases and increases levels of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in prostate cancer cells (LNCaP, DU-145 and PC-3) after 24 h incubation (Yeh et al., 2003). After administered in orthotopic tumor model of human hepatocellular carcinoma (BEL-7402 cells) at doses of 1.5 mg/kg, 1 mg/kg and 0.5 mg/kg, bufalin reduced tumor growth (35.2, 49.8 and 83.9%) increased survival time at higher doses (1.5 mg/kg: 31.8%; 1 mg/kg: 29.4%), apoptosis index determined by TUNEL assay (10.6, 8.8 and 5.8%), expression of Bax (90, 80 and 80%) and reduced Bax proteins (10, 10 and 20%, respectively) in tumor tissues of nude mice (Han et al., 2007). This molecule also suppressed migratory and invasive activity of T24 bladder carcinoma cells (Hong et al., 2013) as well as human lung adenocarcinoma proliferation (A-549) by dependent time apoptosis induction and reduced PI3K/Akt activation, regulates pro-apoptotic and antiapoptotic proteins expression and promotes caspase-3 activation (Zhu et al., 2012). Similarly, bufalin-treated human osteosarcoma MG-63 showed cell proliferation inhibition and apoptosis in a dose- and time-dependent manner because it disrupts mitochondrial

transmembrane potential, increased reactive oxygen species and caused up-regulation of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1), cleaved PARP, activates caspase-3 and caspase-9, and increased Bax/Bcl-2 ratio (Wang and Bi, 2014). Bufalin had already shown inhibitory effects on bovine aortic endothelial cells, another suggestive signal of its antiangiogenic activity (Lee et al., 1997).

Bufalin (2) cause apoptosis in cells of this tissue in a cell-specific manner and in a distinct mechanism that occurs in tumor cells (Lee et al., 1997). Toxicity analysis revealed that bufalin at 2 mg/kg caused transient convulsion after 5 min the first i.p. administration in half the animals and short-term listlessness after the second injection, which was restored to normal from 3 to 5 min later. Adverse reactions, deaths, changes in weight, appetite or behavior were not detected in the lower doses (0.5 and 1.5 mg/kg) after 10 days of administration (Han et al., 2007). Interestingly, Nasu et al. (2005) proposed to use bufalin (2) as a therapeutic agent to treat endometriosis, a condition that causes exacerbated proliferation of the endometrial tissue.

Cinobufagin (17) exhibit significant antitumor activity, including inhibition of proliferation and cell differentiation, apoptosis induction, cell cycle arrest, angiogenesis inhibition, multidrug resistance reversion, and also regulate immune responses (Zhu and Liu, 2006). In details, it induces cell cycle arrest on G₂ and S phases at 200 µg/mL, inhibited cellular proliferation of bladder tumor cells (BIU-87) after 72h of incubation, reduced expression of antiapoptotic factors (Bcl-2) and increased transcription of mRNA for caspase-3 and its catalytic activity (Su et al., 2009). Nude mice transplanted with human hepatocellular carcinoma and treated with cinobufagin in combination with arsenic trioxide showed antitumor synergistic action and reduced the number of blood vessels and expression of vascular and epidermal endothelial growth factor receptors (VEGFR and EGFR, respectively) (Liu et al., 2011).

Cinobufagin (17) used alone or in combination with other chemotherapeutic agents (e.g., gemcitabine and oxaliplatin) has anticancer activity against several human cancers types containing advanced carcinomas of liver, lung, pancreas and bladder (Chen et al., 2003; Qin et al., 2008; Meng et al., 2009). These studies demonstrated reducing of tumor growth rate, and improvement in life quality and increasing of survival time (Nesher et al., 2007). In liver tumors, supervising of alpha-fetoprotein (α-FP) levels revealed upper quantities in control group than in liver-treated cells with cinobufagin (Chen et al., 2003). Fetal immature liver cells normally generate alpha-fetoprotein. At birth, children have relatively high levels of this protein, whose measures drop to values of the adult phase (<10 ng/mL) at the first year of life. Serum cut-off value of α-FP associated with poor prognosis is 200 ng/mL. In adults, high levels up to 500 ng/mL are found in hepatocellular carcinomas, germ cell tumors (testicles and ovaries) and liver metastases. Thus, this protein is the most widely used tumor marker for screening and monitoring hepatocellular carcinomas. High levels of α-FP are the worst prognostic factor concerned to the disease aggressiveness and reflect larger diameters of tumors and vascular invasion (Ataide et al., 2011).

All findings described above indicate that bufadienolides (e.g. bufalin and cinobufagin) might induce apoptosis through associative activation of the caspases-8 and -10 and Fas death receptor and caspase-9 triggering by mitochondrial pathway. Thus, they can cause genotoxic effects and cell death by different pathways. Apoptosis occurs by two general pathways: extrinsic and intrinsic (Fig. 8). When intrinsic via is activated, increasing mitochondrial membrane permeability occurs, and it is followed by release of proteins that are normally sited in the intermembrane space [cytochrome c, apoptosis inducing factor, Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodide), among others]. So,

mitochondrial membrane permeabilization causes cytochrome c release, and it binds to Apaf-1, assembling a multicatalytic complex called apoptosome. This complex binds to procaspase-9 inactive zymogen, produces active cleaved caspase-9 and caspase-9 triggers the effector caspase-3, -6 and/or -7, allowing them to play DNA fragmentation. Caspase-3, the most important effector caspase and an effective enzyme able to cleavage genomic DNA between nucleosomes, generates 180–200 base pair fragments and degrades proteins of the nucleus and mitotic apparatus (e.g., laminin). Morphologically, caspases and another proteases activated during cell death lead to chromatinic condensation, karyorrhexis, cytoplasmic vacuolation and rarefaction and cellular shrinkage (Kumar et al., 2004; Ziegler and Groscurth, 2004).

The death receptor via or extrinsic pathway (Fig. 8) involves membrane receptors. They are members of a superfamily called tumor necrosis factor receptors (TNFR). TNFR-1, FAS (CD95) and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) are included in this family. Such receptors have a distinct intracytoplasmic domain of 65 amino acids - Death Domain (DD). After membrane receptor association to its corresponding DD, some conformational changes in the receptors promote a FAS adapter molecule recruitment that matches with DD and generates FADD. This complex recruits the cascade of caspases since FADD binds to procaspase-8 (and cleaves it) and produces caspase-8 (MacFarlane and Williams, 2004; Ziegler and Groscurth, 2004; Krysko et al., 2008).

Besides caspase-3, two apoptosis activation pathways may be interconnected through Bid, a protein found in cytosol and normally cleaved by caspase-8 to assemble a truncated protein (tBid), which is translocated to mitochondria and activates Bax, initiating cytochrome c release and mitochondrial dysfunction. Therefore, the apoptosis process, as those initiated by some bufadienolides, is totally interrelated to the apoptotic signal amplification and caspase activation, though the intrinsic pathway essence is determined by the balance between pro-apoptotic (Bax, Bak and Bid) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) protein molecules which regulate mitochondrial permeability (Chang et al., 2002; MacFarlane and Williams, 2004; Hanahan and Weinberg, 2011).

Additional uses of bufadienolides in the treatment of cancers include an indirect fight against cachexia, a condition characterized by excessive interleukin-6 (IL-6) production in cancer patients, causing body weight reduction that may lead to the death (Enomoto et al., 2004).

The World Health Organization (WHO) believes that until 2030 will raise about 21.4 million new cancer cases and 13.2 million cancer deaths. Oceania (Australia and New Zealand) has about 313 cases per 100,000 inhabitants, the highest incidence of cases among all continents. South America and Brazil present 172 cases per 100 thousand inhabitants (INCA, 2014; WHO, 2012).

In the battle against cancer, chemotherapy remains the most important line of defense on hematological malignancies and aggressive forms of solid tumors and some clinical protocols that use combination of antineoplastic agents are achieving results with cure rates up to 90%. However, genetic diversity and genomic instability in tumor cells contribute to the wide phenotypic heterogeneity, complicate treatment and facilitate the manifestation of resistance(s) and relapse(s) that can arise at any stage of the cancer development (Hanahan and Weinberg, 2011; McCubrey et al., 2015). Therefore, many therefore solid tumors have not yet appropriate chemotherapy or radiotherapy treatments and show relapses, such as glioma, esophageal and pancreatic cancers, melanomas and non-small cell lung cell (NSCLC) carcinomas. These cancers have different levels of resistance to pro-apoptotic stimuli, and phenotype of multidrug resistance for the majority of the cytotoxic agents currently used in clinic (Costa-Lotufo et al., 2010; Mijatovic et al., 2012).

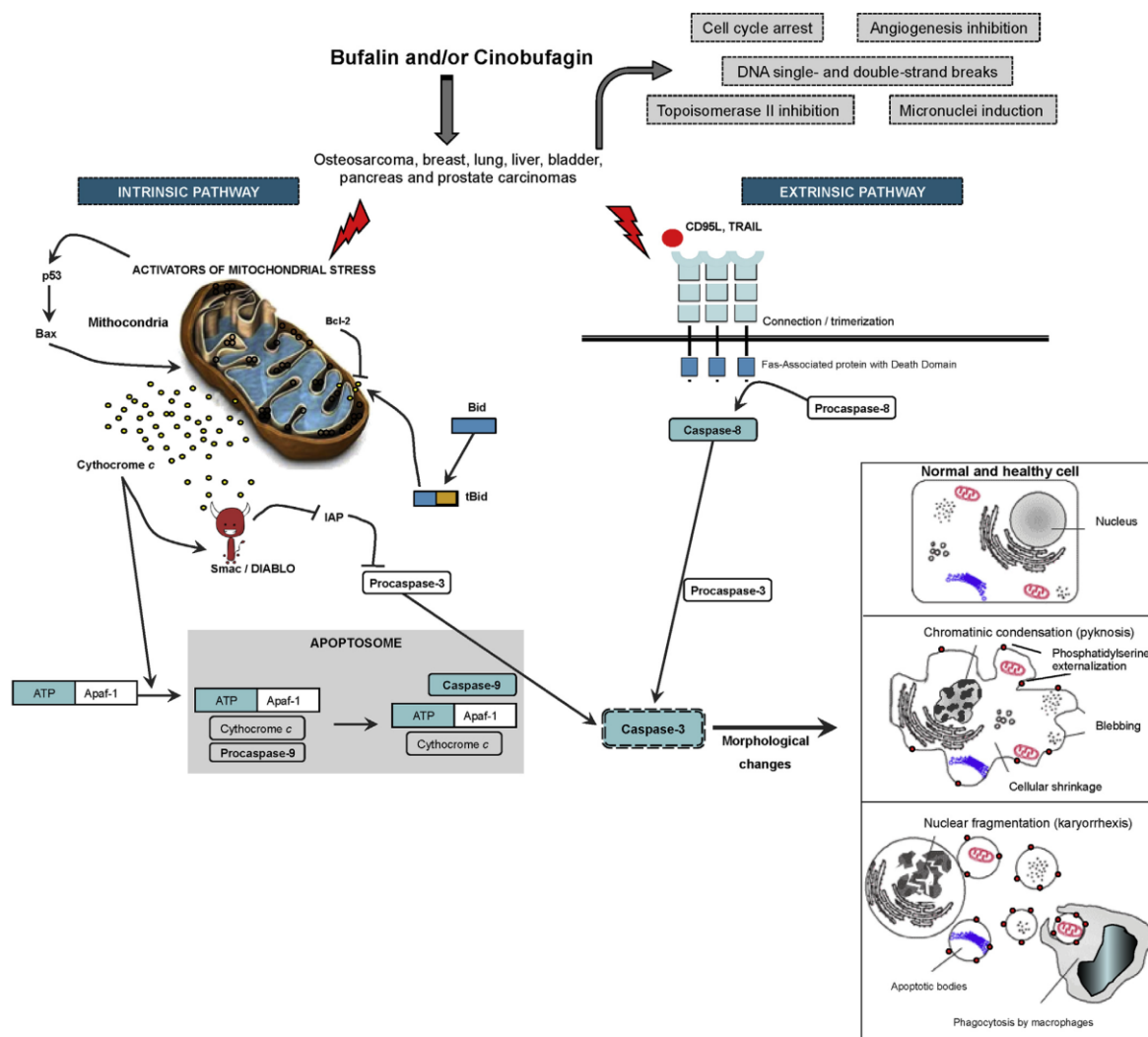


Fig. 8. Presentation of the main pathways of cell death triggered by two bufadienolides: bufalin and cinobufagin.

4. Conclusions remarks and future perspectives

The discovery of new molecules, as bufadienolides, is the major goal of the biomedical and pharmaceutical oncology, and associated with chemistry, pharmacological, pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicogenetic studies, can help us to design target therapies as a way to overcome resistance, diminish collateral effects and recurrences of advanced neoplastic diseases, choice method/route of administration, alleviate the suffering and, of course, to get refine clinical effectiveness against hematological and solid neoplasms. With this perspective, the vulnerability of amphibians to environmental challenges increases the risk of extinction and, consequently, it reduces the bioactive miscellany of molecules and possibility to utilize them as novel tools with innovative therapeutic purposes.

Bufadienolides, especially bufalin, cinobufagin, telocinobufagin and marinobufagin, are the most common substances in toad skin

secretions and have shown incredible cytotoxic and antitumor potential triggered by caspase-dependent apoptosis. This class of compounds emerge as a natural source of amazing chemical biodiversity, has moderate selectivity against human tumor cells and weak activity against murine cells probably due to structural differences between subunits of human and mice Na^+/K^+ -ATPases, a feasible center for binding of compounds and control of deregulated cell proliferation.

Ethical statement

This article is according to national and international ethical guidelines in the preparation of scientific manuscripts.

Acknowledgements

We wish to thank the Federal Brazilian agency "Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq) for financial support in the form of grants (#301976/2013-9). We are also grateful to Domingos de Jesus Rodrigues and Janaina da Costa de Noronha from University of Mato Grosso (Sinop, Brazil) for providing amphibian's images.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.004>.

References

- Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, A., Rohdich, F., 2002. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 17 (99), 12108–12113.
- Aires, M.M., 2011. *Physiology*, third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Anazetti, M.C., Melo, P.S., Duran, N., Haun, M., 2003. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol* 188, 261–274.
- Ataide, E.L., Machado, R.R., Ribeiro, M.B.C., Mattosinho, T.J.A.P., Romani, F.A., Escanhonela, C.A.F., Boin, L.F.S., 2011. Survival and tumor relapse rate according to alpha-fetoprotein level in patients submitted to liver transplantation. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 24, 43–47.
- Bagrov, A.Y., Shapiro, J.L., Fedorova, O.V., 2009. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 61, 9–38.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431–441.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., Mccoy, K.D., Wang, R., 1996. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemistry* 4, 14–19.
- Bick, R.J., Poindexter, B.J., Sweny, R.R., Dasgupta, A., 2002. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than Na₂Ca-ATPase blocking. *Life Sci.* 72, 699–709.
- Biju, S.D., Bossuyt, F., 2003. New frog family from India reveals an ancient biogeographical link with the Seychelles. *Nature* 425, 711–713.
- Bloch, K., 1992. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 57, 378–383.
- Bosmans, F., Maertens, C., Verdonck, F., Tytgat, J., 2004. The poison Dart frog's batrachotoxin modulates Nav1.8. *FEBS Lett.* 577, 245–248.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141–2153.
- Catterall, W.A., Cestéle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F., Konoki, K., Scheuer, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicol* 49, 124–141.
- Chang, W.K., Yang, K.D., Chuang, H., Jan, J.T., Shiao, M.F., 2002. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. *Clin. Immunol.* 104, 151–160.
- Chaparro, J.C., Pramuk, J., Glusenkam, P.A.G., 2007. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from the cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica* 63, 203–212.
- Chen, K.K., Chen, A.L., 1933. Notes on the poisonous secretions of twelve species of toads. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 47, 281–293.
- Chen, Z., Zhai, X.F., Su, Y.H., Wan, X.Y., Li, J., Xie, J.M., Gao, B., 2003. Clinical observation of cinobufacini injection used to treat moderate and advanced primary liver cancer. *Chin. J. Integr. Med.* 1, 184–186.
- Clarke, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions: their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev.* 72, 365–379.
- Córdova, W.H.P., Leitão, S.Z., Cunha-Filho, G., Bosch, R.A., Alonso, I.P., Pereda-Miranda, R., Gervou, R., Touza, N.A., Quintas, L.E.M., Noel, F., 2016. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophryne fustiger* (Bufonidae): inhibition of human kidney Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Toxicol* 110, 27–34.
- Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Alves, A.P.N.N., Madeira, S.V.F., Pessoa, C., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O.A., 2010. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim* 2, 47–58.
- Costa-Neto, E.M., 2005. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 33–43.
- Cunha-Filho, G.A., Resck, I.S., Cavalcanti, B.C., Pessoa, C.O., Moraes, M.O., Ferreira, J.R.O., Rodrigues, F.A., Dos Santos, M.L., 2010. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. *Toxicol* 56, 339–348.
- Cunha-Filho, G.A., Schwartz, C.A., Resck, I.S., Murta, M.M., Lemos, S.S., Castro, M.S., Kyaw, C., Pires- Jr., O.P., Leite, J.R.S., Bloch- Jr., C., Schwartz, E.F., 2005. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the *Bufo rubescens*. *Toxicol* 45, 777–782.
- Daly, J.W., Gusovsky, F., Myers, C.W., Yotsuyamashita, M., Yasumoto, T., 1994. First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*), with further reports for the bufonid genus *Atelopus*. *Toxicol* 32, 279–285.
- Daly, J.W., 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9–13.
- Daly, J.W., Noimai, N., Kongkathip, B., Kongkathip, N., Wilham, J.M., Garraffo, H.M., Kaneko, T., Spande, T.F., Nimit, Y., Nabhitabhata, J., Chan-Ard, T., 2004. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. *Toxicol* 44, 805–815.
- Darst, C., Menendez-Guerreo, P., Coloma, L., Cannatella, D., 2005. Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): a comparative analysis. *Am. Nat.* 165, 56–69.
- Dinara, D., Caner, S., Kopp, B., Opelz, G., Terness, P., 2003. Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1791–1801.
- Dmitrieva, R.I., Bagrov, A.Y., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Stocco, D.M., Doris, P.A., 2000. Mammalian bufadienolides is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. *Hypertension* 36, 442–448.
- Dong, Y., Yin, S., Li, J., Jiang, C., Ye, M., Hu, H., 2011. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. *Apoptosis* 16, 394–403.
- Duellman, W.E., 1992. Reproductive strategies of frogs. *Sci. Am.* 267, 80–87.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1996. *The Biology of Amphibians*, vol. 1. MacGraw-Hill, New York, p. 670.
- Eastale, S., 1963. *'Bufo marinus'* catalogue of American Amphibians and Reptiles. *Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol.* 395, 1–395.
- Eisner, T., Wiemer, D.F., Haynes, L.W., Meinwald, J., 1978. Lucibufagins: defensive steroids from the fireflies *Photinus ignitus* and *P. marginellus* (Coleoptera: Lampyridae). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 905–908.
- Elkareh, J., Kennedy, D.J., Yashaswi, B., Vetteth, S., Shidyak, A., Kim, E.G., Smaili, S., Periyasamy, S.M., Hariri, I.M., Fedorova, L., Liu, J., Wu, L., Kahaleh, M.B., Xie, Z., Malhotra, D., Fedorova, O.V., Kashkin, V.A., Bagrov, A.Y., Shapiro, J.L., 2007. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 49, 215–224.
- Enomoto, A., Rho, M., Komiyama, K., Hayashi, M., 2004. Inhibitory effects of bufadienolides on interleukin-6 in MH-60 cells. *J. Nat. Prod.* 67, 2070–2072.
- Ewart, H.S., Klip, A., 1995. Hormonal regulation of the Na⁺(+)-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.* 269, 295–311.
- Farias, D.F., Souza, T.M., Viana, M.P., Soares, B.M., Cunha, A.P., Vasconcelos, I.M., Ricardo, N.M.P.S., Ferreira, P.M.P., Melo, V.M.M., Carvalho, A.F.U., 2013. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–9.
- Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., 1997. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *Am. J. Hypertens.* 10, 929–935.
- Fedorova, O.V., Talan, M.I., Agalakova, N.I., Lakatta, E.G., Bagrov, A.Y., 2002. Endogenous ligand of α_1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride-dependent hypertension. *Circulation* 105, 1122–1117.
- Fedorova, O.V., Agalakova, N.I., Talan, M.I., Lakatta, E.G., Bagrov, A.Y., 2005. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signaling in NaCl-loaded Dahl-S rats. *J. Hypertens.* 23, 1515–1523.
- Fedorova, O.V., Simbirtsev, A.S., Kolodkin, N.I., Kotov, A.Y., Agalakova, N.I., Kashkin, V.A., Tapilskaya, N.I., Bzhelyansky, A., Reznik, V.A., Frolova, E.V., Nikitina, E.R., Budny, G.V., Longo, D.L., Lakatta, E.G., Bagrov, A.Y., 2008. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension. *J. Hypertens.* 26, 2414–2425.
- Fedorova, O.V., Zernetkina, V.I., Shilova, V.Y., Grigorova, Y.N., Juhasz, O., Wei, W., Marshall, C.A., Lakatta, E.G., Bagrov, A.Y., 2015. Synthesis of an endogenous steroidal Na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 8, 736–745.
- Feher, M., Schmidt, J.M., 2003. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43, 218–227.
- Ferreira, P.M.P., Bezerra, D.P., Nascimento, S.J., Costa, M.P., Ferreira, J.R.O., Alencar, N.M.N., Figueiredo, I.S.T., Cavalheiro, A.J., Machado, C.M.L., Chammas, R., Alves, A.P.N.N., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2016. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. *J. Ethnopharmacol.* 186, 270–279.
- Ferreira, P.M.P., Lima, D.J.B., Debiase, B.W., Soares, B.M., Machado, K.C., Noronha, J.C., Rodrigues, D.J., Shinhorin, A.P., Pessoa, C., Vieira-Junior, G.M., 2013. Anti-proliferative activity of *Rhinella marina* and *Rhaebo gutatus* venom extracts from Southern Amazon. *Toxicol* 72, 43–51.
- Ferreira, R.S., Glaucius, O., Andricopulo, A.D., 2011. Integrating virtual and high-throughput screening: opportunities and challenges in drug research and development. *Quim. Nova* 34, 1770–1778.
- Fitch, R.W., Spande, T.F., Garraffo, H.M., Yeh, H.J., Daly, J.W., 2010. Phantasmidine: anepibatidine congener from the ecuadorian poison frog *Epipedobates anthonyi*. *J. Nat. Prod.* 73, 331–337.

- Frese, S., Frese-Schaper, M., Andres, A.C., Miescher, D., Zumkehr, B., Schmid, R.A., 2006. Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. *Cancer Res.* 66, 5867–5874.
- Frost, D., 2015. *Amphibian Species of the World*, an on Line Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.
- Frost, D., Conceder, T., Faivovich, J., Bain, R.H., Haas, A., Haddad, C.F.B., De Sa, R.O., Channing, A., Wilkinson, M., Donnellan, S.C., Raxworthy, C.J., Campbell, J.A., Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M., Wheeler, W.C., 2006. Amphibian tree of life. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 297, 1–370.
- Gao, H., Popescu, R., Kopp, B., Wang, Z., 2011. Bufadienolides and their antitumor activity. *Nat. Prod. Rep.* 28, 953–969.
- Geering, K., 2006. FXyD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 290, 241–250.
- Gower, D.J., Wilkinson, M., 2005. Conservation biology of Caecilian amphibians. *Conserv. Biol.* 19 (1), 45–55.
- Gutierrez, J.M., 2016. Understanding and confronting snakebite envenoming: the harvest of cooperation. *Toxicon* 109, 51–62.
- Haller, S.T., Kennedy, D.J., Shidyak, A., Budny, G.V., Malhotra, D., Fedorova, O.V., Shapiro, J.L., Bagrov, A.Y., 2012. Monoclonal antibody against marinobufagenin reverses cardiac fibrosis in rats with chronic renal failure. *Am. J. Hypertens.* 25, 690–696.
- Han, K., Huan, G., Gu, W., Su, Y.H., Huang, X.Q., Ling, C.Q., 2007. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J. Gastroenterol.* 28, 3374–3379.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haseyama, K.L.F., Carvalho, C.J.B., 2011. Distributional patterns of Amazon biodiversity: an evolutionary point of view. *Rev. Biol. Esp. Biogeogr.* 35–40.
- Hashimoto, S., Jing, Y., Kawaza, N., Masuda, Y., Nakajo, S., Yoshida, T., Kuroiwa, Y., Nakaya, K., 1997. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. *Leuk. Res.* 21, 875–883.
- Hauk, C., Frishman, W.H., 2012. Systemic hypertension: the roles of salt, vascular Na⁺/K⁺-ATPase and the endogenous glycosides, ouabain and marinobufagenin. *Cardiol. Rev.* 20, 130–138.
- Hickman Júnior, C.P., Roberts L.S., Larson A., 2009. *Princípios integrados de zoologia, eleven ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.*
- Hong, S.H., Kim, G.Y., Chang, Y.C., Moon, S.K., Kim, W.J., Choi, Y.H., 2013. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions. *Int. J. Oncol.* 42, 277–286.
- Hutchinson, D.A., Mori, A., Savitzky, A.H., Burghardt, G.M., Wu, X., Meinwald, J., Schoroeder, F.C., 2007. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2265–2270.
- Imai, S., Murase, H., Katori, M., Okada, M., Shigei, T., 1965. A study on the structure-activity relationship of the cardiotonic steroids. *J. Pharmacol.* 15, 62–71.
- INCA, 2014. *Estimativa 2014: Incidência Do Câncer No Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro.* <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
- Jared, C., Antoniazzi, M.M., Verdade, V.K., Toledo, L.F., Rodrigues, M.T., 2011. The Amazonian toad *Rhaebo guttatus* is able to voluntarily squirt poison from the paratoid macroglands. *Amphibia-Reptilia* 32, 546–549.
- Jia, J., Gao, K.Q., 2016. A new basal salamandroid (Amphibia, urodela) from the late jurassic of qinglong, hebei province, China. *PLoS One* 11, e0153834.
- Johnson, P.H., Walker, R.P., Jones, S.W., Stephens, K., Meurer, J., Zajchowski, J.A., Luke, M.M., Eeckman, F., Tan, Y., Wong, L., Parry, G., Morgan Jr., T.K., McCarrick, M.A., Monforte, J., 2002. Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1293–1304.
- Juncker, T., Cerella, C., Teiten, M.H., Morceau, F., Schumacher, M., Ghelfi, J., Gaascht, F., Schneckeburger, M., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M., 2011. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 81, 13–23.
- Kamano, Y., Satoh, N., Nakayoshi, H., Pettit, G.R., Smith, C.R., 1988. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 326–332.
- Kamano, Y., Yamashita, A., Nogawa, T., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., Segawa, T., Yukita, A., Saito, K., Katsuyama, M., Pettit, G.R., 2002. QSAR evaluation of the *ChanSu* and related bufadienolides against the colchicine-resistant primary liver carcinoma cell line PLC/PRF/5. *J. Med. Chem.* 45, 5440–5447.
- Kamb, A., 2005. What's wrong with our cancer models? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 161–165.
- Kashkin, V.A., Bagrov, A., Federova, O.V., Bagrov, Y.Y., Agalokova, N.I., Patkina, N.A., Zartau, E.E., 2002. Marinobufagenin (MBG) suppression of ethanol-seeking behavior is associated with inhibition of brain cortex Na⁺/K⁺-ATPase in mice. *Eur. Neuropharmacol.* 12, 217–223.
- Kennedy, D.J., Vetteh, S., Periyasamy, S.M., Kanj, M., Fedorova, L., Khouri, S., Khouri, S., Kahaleh, M.B., Xie, Z., Malhotra, D., Kolodkin, N.I., Lakatta, E.G., Fedorova, O.V., Bagrov, A.Y., Shapiro, J.L., 2006. Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension* 47, 488–485.
- Kolmakova, E.V., Haller, S.T., Kennedy, D.J., Isachkina, A.N., Budny, G.V., Frolova, E.V., Piecha, G., Nikitina, E.R., Malhotra, D., Fedorova, O.V., Shapiro, J.L., Bagrov, A.Y., 2011. Endogenous cardiotonic steroids in chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transpl.* 26, 2912–2919.
- Krenn, L., Kopp, B., 1998. Bufadienolides from animal and plant sources. *Phytochem* 48, 1–29.
- Krysko, D.V., Vanden, B.T., D'Herde, K., Vandenabeele, P., 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44, 205–221.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins, S.L., Cotran, R.S., 2004. *Pathology Basis of Disease*. WB Saunders, China.
- Laursen, M., Gregersen, J.L., Yatime, L., Nissen, P., Fedosova, N.U., 2015. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺/K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1755–1760.
- Lee, D.Y., Yasuda, M., Yamamoto, T., Yoshida, T., Kuroiwa, Y., 1997. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis *in vitro*. *Life Sci.* 60, 127–134.
- Lee, S., Lee, Y., Choi, Y.J., Han, K.-S., Chung, H.W., 2014. Cyto-/genotoxic effects of the ethanol extract of Chan Su, a traditional Chinese medicine, in human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 152, 372–376.
- Lefranc, F., Mijatovic, T., Kondo, Y., Sauvage, S., Roland, I., Debeir, O., Krstic, D., Vasic, V., Gailly, P., Kondo, S., Blanco, G., Kiss, R., 2008. Targeting the alpha-1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery* 62, 211–221.
- Li, B.J., Tian, H.Y., Zhang, D.M., Lei, Y.H., Wang, L., Jiang, R.W., Ye, W.C., 2015. Bufadienolides with cytotoxic activity from the skins of *Bufo bufo gargarizans*. *Fitterapia* 105, 7–15.
- Lichtstein, D., Gati, I., Babila, T., Haver, E., Katz, U., 1991. Effect of salt acclimation on digitalis-like compounds in the toad. *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 65–68.
- Lima, A.P., Erdtmann, L.K., Ferrão, M., Costeira, J.M., Oliveira, A.S., Oliveira, D.M.S., Silva, K.M., 2012. SAPOTECA: library of sounds and videos from Amazon frogs. CENBAM, Manaus, Amazonas, Brazil.
- Lingrel, J.B., 2010. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 395–412.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* 23, 3–25.
- Liu, L., Chen, B.A., Qin, S.K., 2011. Anti-angiogenesis effect of arsenic trioxide plus cinobufacin on human hepatocarcinoma transplantation model nude mice. *Chin. J. Integr. Med.* 31, 67–72.
- Manunta, P., Hamilton, B.P., Hamlyn, J.M., 2001. Structure-activity relationships for the hypertensinogenic activity of ouabain: role of the sugar and lactone ring. *Hypertension* 37, 472–477.
- MacFarlane, M., Williams, A.C., 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 5, 674–678.
- McCubrey, J.A., Abrams, S.L., Fitzgerald, T.L., Cocco, L., Martelli, A.M., Montalto, G., Cervello, M., Scalisi, A., Candido, S., Libra, M., Steelman, L.S., 2015. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* 57, 75–101.
- Meng, Y., Whiting, P., Sik, V., Rees, H.H., Dinan, L., 2001. Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborus torquatus* (Ranunculaceae). *Phytochem* 57, 201–407.
- Meng, Z., Yang, P., Shen, Y., Bei, W., Zhang, Y., Ge, Y., Newman, R.A., Cohen, L., Liu, L., Thornton, B., Chang, D.Z., Liao, Z., Kurtzrock, R., 2009. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, non small-cell lung cancer, or pancreatic cancer. *Cancer* 115, 5309–5318.
- Mijatovic, T., Dufasne, F., Kiss, R., 2012. Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. *Pharm. Pat. Anal.* 1, 91–106.
- Min, M.S., Yang, S.Y., Bonett, R.M., Vieites, D.R., Brandon, R.A., Wake, D.B., 2005. Discovery of the first Asian plethodontid salamander. *Nature* 435, 87–90.
- Monção, N.B.N., Araújo, B.Q., Silva, J.N., Lima, D.J.B., Ferreira, P.M.P., Airoldi, F.P.S., Pessoa, C., Cito, A.M.G.L., 2015. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. *Molecules* 20, 4204–4224.
- Moreno Y Banuls, L., Urban, E., Gelbcke, M., Dufasne, F., Kopp, B., Beijo, R., Zehl, M.E., 2013a. Structure-activity relationship analysis of bufadienolide-induced *in vitro* growth inhibitory effects on mouse and human cancer cells. *J. Nat. Prod.* 76, 1078–1084.
- Moreno Y Banuls, L., Katz, A., Miklos, W., Cimmino, A., Tal, D.M., Aimbinder, E., Zehl, M., Urban, E., Evidente, A., Kopp, B., Berger, W., Feron, O., Karlish, S., Kiss, R., 2013b. Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar *in vitro* growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Mol. Cancer* 26, 12–33.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16, 55–63.
- Murrell, J.R., Randall, J.D., Rosoff, J., Zhao, J.L., Jensen, R.V., Gullans, S.R., Haupt Jr., G.T., 2005. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal. *Circulation* 112, 1301–1308.
- Nasu, K., Nishida, M., Ueda, T., Takai, N., Bing, S., Narahara, H., Miyakawa, I., 2005. Bufalin induces apoptosis and the G₀/G₁ cell cycle arrest of endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 817–823.
- Nesher, M., Shpolansky, U., Rosen, H., Lichtstein, D., 2007. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci.* 16, 2093–2107.

- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.
- Newman, R.A., Yang, P., Pawlus, A.D., Block, K.I., 2008. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol. Interv.* 8, 36–49.
- Niles, A.L., Moravec, R.A., Riss, T.L., 2008. Update on *in vitro* cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 655–669.
- Nogawa, T., Kamano, Y., Yamashita, A., Pettit, G.R., 2001. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug *Ch'an Su*. *J. Nat. Prod.* 64, 1148–1152.
- Ogasawara, M., Matsubara, T., Suzuki, H., 2001. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 720–723.
- Pascolutti, M., Quinn, R.J., 2014. Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries. *Drug Discov. Today* 19, 215–221.
- Payne, A.H., Hales, D.B., 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25, 947–970.
- Pereira, J.B.A., Rodrigues, M.M., Morais, I.R., Vieira, C.R.S., Sampaio, J.P.M., Moura, M.G., Damasceno, M.F.M., Silva, J.N., Calou, I.B.F., Deus, F.A., Peron, A.P., Abreu, M.C., Militão, G.C.G., Ferreira, P.M.P., 2015. The therapeutic role of the Program Farmacia Viva and the medicinal plants in the center-south of Piauí. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 550–561.
- Perne, A., Muellner, M.K., Steinrueck, M., Craig-Mueller, N., Mayerhofer, J., Schwarzwinger, I., Sloane, M., Uras, I.Z., Hoermann, G., Nijman, S.M., Mayerhoffer, M., 2009. Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PlosOne* 4, 1–9.
- Perry, P., 2000. Proteins of parotoid gland secretions from toads of genus *Bufo*. *Contemp. Herpetol.* 2000, 1–3.
- Pramuk, J.B., 2006. Phylogeny of south American toad *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined analyses. *Zool. J. Linn. Soc.* 146, 407–452.
- Prates, M.V., Bloch-Júnior, C., 2000. Peptídeos antimicrobianos—Uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. *Biotecnologia, Cienc. Desenvolv* 17, 30–36.
- Qi, F., Inagaki, Y., Gao, B., Cui, X., Xu, H., Kokudo, N., Li, A., Tang, W., 2011. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas-and mitochondria-mediated pathways. *Cancer. Sciences* 102, 951–958.
- Qin, T.J., Zhao, X.H., Yun, J., Zhang, L.X., Ruan, Z.P., Pan, B.R., 2008. Efficacy and safety of Gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 14, 5210–5216.
- Riera, A.S., Daud, A., Gallo, A., Genta, S., Ybar, M.A., Sanchez, S., 2003. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *Biocell* 27, 37–46.
- Santos, A.C.B., Silva, M.A.P., Santos, M.A.F., Leite, T.R., 2013. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 15, 442–458.
- Santos, A.G., Ferreira, P.M.P., Vieira-Júnior, G.M., Perez, C.C., Tininis, A.G., Silva, G.H., Bolzani, V.S., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Cavalheiro, A.J., 2010. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chem. Biodivers.* 7, 205–215.
- Saporito, R., Donnelly, M., Norton, R., Garraffo, H., Spande, T., Daly, J., 2007. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8885–8890.
- Schmeda-Hirschmann, G., Quispe, C., Theoduloz, C., Sousa Junior, P.T., Parizotto, C., 2014. Antiproliferative activity and new arginyl bufadienolide esters from the “Cururu” toad *Rhinella* (*Bufo*) *Schneideri*. *J. Ethnopharmacol.* 155, 1076–1085.
- Sciani, J.M., De-Sá-Júnior, P.L., Ferreira, A.K., Pereira, A., Antoniazzi, M.M., Jared, C., Pimenta, D.C., 2013. Cytotoxic and antiproliferative effects of crude amphibian skin secretions on breast tumor cells. *Biomed. Prev. Nutri* 1, 10–18.
- Simoes, E.R.B., Santos, E.A., Abreu, M.C., Silva, J.N., Nunes, N.M.F., Costa, M.P., Pessoa, O.D.L., Pessoa, C., Ferreira, P.M.P., 2015. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 4, 256–263.
- Simpson, C.D., Mawji, I.A., Anyiwe, K., Williams, M.A., Wang, X., Venugopal, A.L., Gronda, M., Hurren, R., Cheng, S., Serra, S., Behesti-Zavareh, R., Datti, A., Wrana, J.L., Ezzat, S., Schimmer, A.D., 2009. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. *Cancer Res.* 69, 2739–2747.
- Souza, M.V.N., Pinheiro, A.C., Ferreira, M.L., Gonçalves, R.S.B., Lima, C.H.C., 2007. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. *Rev. Fitos* 3, 25–41.
- Steyn, P.S., Heerden, F.V., 1998. Bufadienolides of plant and animals origin. *Nat. Prod. Rep.* 15, 397–413.
- Stuart, S., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinction worldwide. *Science* 306, 1783–1786.
- Stynoski, J., Torres-Mendoza, Y., Sasa-Marin, M., Saporito, R., 2014. Evidence of maternal provisioning of alkaloid-based chemical defenses in the strawberry poison frog *Oophaga pumilio*. *Ecology* 95, 587–593.
- Su, J., Xu, Z.J., Ye, M.S., 2009. An experimental study of bladder cancer cell apoptosis induced by cinobufacin. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* 25, 351–353.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. *Method. Plant Biochem.* 6, 71–133.
- Supratman, U., Fugita, T., Akiyama, K., Hayashi, H., 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 64, 1310–1312.
- Tempone, A.G., Pimenta, D.C., Lebrun, I., Sartorelli, P., Taniwaki, N.N., De Andrade Jr., H.F., Antoniazzi, M.M., Jared, C., 2008. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon* 52, 13–21.
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2008. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7, 678–693.
- Toledo, R.C., Jared, C., 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 111, 1–29.
- Touza, N.A., Poças, E.S., Quintas, L.E., Cunha-Filho, G., Santos, M.L., Noel, F., 2011. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on Na⁺/K⁺-ATPase activity in human kidney membrane preparation. *Life Sci.* 88, 39–42.
- Uno, Y., Hosaka, S., Yamazaki, H., 2014. Identification and analysis of CYP7A1, CYP17A1, CYP20A1, CYP27A1 and CYP51A1 in cynomolgus macaques. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1647–1650.
- Vitt, L.J., Caldwell, J.P., 2014. Frogs. In: Vitt, L.J., Caldwell, J.P. (Eds.), *Herpetology: an Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, fourth ed. Academic Press, San Diego, pp. 471–522.
- Vu, H., Ianosi-Irimie, M., Danchuk, S., Rabon, E., Nogawa, T., Kamano, O., Pettit, G.R., Wiese, T., Puschete, J.B., 2006. Resibufogenin corrects hypertension in a rat model of human preeclampsia. *Exp. Biol. Med.* 231, 215–220.
- Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *PNAS* 105, 11466–11473.
- Wang, D., Bi, Z., 2014. Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway. *Tumor Biol.* 35, 4885–4890.
- Wang, D.L., Qi, F.H., Tang, W., Wang, F.S., 2011. Chemical constituents and bio-activities of the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *Chem. Biodivers* 8, 559–567.
- Wang, Z., Zheng, M., Li, Z., Li, R., Jia, L., Xiong, X., Southall, N., Wang, S., Xia, M., Austin, C.P., Zheng, W., Xie, Z., Sun, Y., 2009. Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. *Cancer Res.* 69, 6556–6564.
- World Health Organization (WHO), 2012. All Cancers (Excluding Non-melanoma Skin Cancer). Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- Xu-Tao, C., Dong, W., Na, W., Zheng, C., 2009. Water-soluble constitutions from the skin of *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *Chin. J. Nat. Med.* 7, 181–183.
- Yang, J., Zhang, Y.H., Miao, F., Zhou, L., Sun, W., 2010. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch. *Fitoterapia* 81, 636–639.
- Yang, P., Menter, D.G., Cartwright, C., Chan, D., Dixon, S., Suraokar, M., Mendoza, G., Liansa, N., Newman, R.A., 2009. Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: importance of Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunits as drug targets. *Mol. Cancer Ther.* 8, 2319–2328.
- Ye, M., Qu, G., Guo, H., Guo, D., 2004. Novel cytotoxic bufadienolides derived from bufalin by microbial hydroxylation and their structure-activity relationships. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 87–98.
- Yeh, J.Y., Huang, W.J., Kan, S.F., Wang, P.S., 2003. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate* 54, 112–124.
- Zhang, H., Qian, D.Z., Tan, Y.S., Lee, K.A., Gao, P., Ren, Y.R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., Dang, C.V., Liu, J.O., Semenza, G.L., 2008. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19579–19586.
- Zhang, J.T., Yu, K.F., 1998. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. *JAMA* 280, 1690–1691.
- Zhu, X.Y., Liu, L.M., 2006. Research progress on the antitumor mechanism of Cinobufacini injection and its active ingredient. *Tumor J. World* 5, 272–275.
- Zhu, Z., Sun, H., Ma, G., Wang, Z., Li, E., Liu, Y., Liu, Y., 2012. Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2025–2035.
- Ziegler, U., Groscurth, P., 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* 19, 124–128.
- Zografos, A.L., 2016. From Biosynthesis to Total Synthesis: Strategies and Tactics for Natural Products. John Wiley & Sons, New Jersey.