



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDADE LICENCIATURA**


Samara Ferreira de Carvalho Oliveira

**POTENCIAL CITOTÓXICO, ANTIPROLIFERATIVO E BIOTECNOLÓGICO DOS
BUFADIENOLÍDEOS**

Picos - Piauí
Março de 2014

Eu, **Samara Ferreira de Carvalho Oliveira**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 04 de julho de 2014.


Assinatura

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

O48p Oliveira, Samara Ferreira de Carvalho.
Potencial citotóxico, antiproliferativo e biotecnológico
das *Bufadienolídeos* / Samara Ferreira de Carvalho Oliveira.
– 2013.
CD-ROM : il; 4 ¾ pol. (69 p.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal do Piauí. Picos-PI, 2013.
Orientador(A): Prof.Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

1.Atividade Citotóxica. 2. *Bufadienolídeos*. 3.
Prospecção Tecnológica. 4. Patentes. I. Título.

CDD 581.4

Samara Ferreira de Carvalho Oliveira

**POTENCIAL CITOTÓXICO, ANTIPROLIFERATIVO E BIOTECNOLÓGICO DOS
BUFADIENOLÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Picos - Piauí
Março de 2014

Samara Ferreira de Carvalho Oliveira

**POTENCIAL CITOTÓXICO, ANTIPROLIFERATIVO E BIOTECNOLÓGICO DOS
BUFADIENOLÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em 12 / 03 / 2014

BANCA EXAMINADORA:

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira - Orientador
Universidade Federal do Piauí

Wáldima Alves da Rocha

Profa. Me. Wáldima Alves da Rocha
Universidade Federal do Piauí – Membro

Ana Carolina Landim Pacheco

Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco
Universidade Federal do Piauí – Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus**, por me ter dado coragem e determinação e além de tudo fé para sempre seguir em frente me mostrando que sua palavra é mesma ontem, hoje e sempre, além do mais, sei que és o deus das causas impossíveis que faz o possível acontecer. Obrigado senhor por me mostrar as maravilhas da tua palavra. Aos meus queridos pais **José Ribamar** e **Marilene** que são os alicerces da minha vida por ter sempre acreditado no meu potencial me dando todo o seu apoio, incentivo, conselhos, amor e carinho durante essa longa jornada. Aos meus irmãos **Silvana** e **Samuel** pelo amor e carinho.

A minha tia **Maria das Dôres** (*in memória*) por ter sempre me incentivado e por investido no meus estudos, pelos conselhos e amor dado a minha pessoa.

Ao meu orientador Professor Dr. **Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, por ter aceitado me orientar, sempre dedicado, prestativo e por todos os ensinamentos que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A **Kátia Machado** por ter me ajudado nos levantamento dos dados da Bioprospecção me ajudando em todos os momentos que necessitei.

A minha amiga e irmã de consideração **Josiana Alves** e minhas companheiras de apartamento **Layane Meneses**, **Rayanne Carneiro** e **Samylla Moura** pelo incentivo e carinho, Em especial ao meu grupo de sala **Layana do Nascimento**, **Rafaela Alencar**, **Gardênia Rodrigues**, **Ranyce Valentim** e **Nagylla Daniela** pelos momentos de alegria, distração, estudos, até mesmo de conversa jogada fora e além de tudo pelas palavras de incentivos e amizade e enfim a todos que colaboraram direto ou indiretamente para realização desse trabalho.

Meu muito Obrigado!

“A mente que se abre a uma ideia jamais
retorna ao tamanho original.”
Albert Einstein

RESUMO

A quimioterapia, aliada à cirurgia e à radioterapia, constituem as principais modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes com diferentes tipos histológicos de câncer. Aproximadamente 60% dos fármacos utilizados atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais. Assim, este trabalho teve como objetivo revisar a biologia e a epidemiologia do câncer, escrever a atividade antiproliferativa, citotóxica e antitumoral dos bufadienolídeos, principalmente, daqueles isolados de anfíbios e realizar uma prospecção tecnológica em bases de dados nacionais e internacionais sobre o depósito de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia relacionados às atividades biológicas dos bufadienolídeos. Os bufadienolídeos são esteróides cardioativos poli-hidroxiados com 24 carbonos que se apresentam na forma livre ou conjugada na posição C-3 com sulfatos encontrados nos tecidos e fluidos corporais de sapos em cerca de 10 espécies do gênero *Rhinella*. Diferentes compostos pertencentes à classe dos bufadienolídeos possuem efeitos citotóxicos e antiproliferativos contra linhagens tumorais de cólon (26-L5, HCT-116), mama (MCF-7, MDA/MB-231), ovário (OVCAR-8), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP), bexiga (BIU-87), pulmão (A-549), carcinoma primário de fígado, glioblastoma (SF-295), carcinoma hepatocelular (HepG2), leucemias (K-562, U-937 ML-1, Jukart T, HL-60) e melanoma (MDA/MB-435), e moderada especificidade contra células normais, sendo tais efeitos por ativação de vias intrínsecas e/ou extrínsecas de morte celular apoptótica. Esse potencial biológico se refletiu em 52 depósitos de patentes desde 1964, embora os bufadienolídeos com atividade antitumoral ainda mostrem baixa expressividade do ponto de vista de desenvolvimento de propriedade intelectual apesar do grande número de artigos disponíveis nas bases científicas.

Palavras-chave: Atividade Citotóxica, Bufadienolídeos, Prospecção Tecnológica, Patentes.

ABSTRACT

Chemotherapy combined with surgery and radiotherapy are the main therapeutic modalities used in the treatment of patients with different histological types of cancer. Approximately 60 % of the drugs currently used in cancer chemotherapy are of natural origin, including natural products or derived from natural substances prototypes. This study aimed to review the biology and epidemiology of cancer, write the antiproliferative, cytotoxic and antitumor activity of bufadienolide mainly those isolated from amphibians and perform a technological forecasting based on national and international data on the application of patent databases innovation and technology related to the biological activities of bufadienolide. The bufadienolide cardioactive steroids are polihydroxylated 24 carbons present in free or conjugated C-3 position with sulphates in tissues and body fluids of frogs in 10 species of genus *Rhinella*. Different compounds belonging to the class of bufadienolide have cytotoxic and antiproliferative effects against colon tumor cell lines (L5 - 26, HCT -116), breast (MCF-7, MDA/MB-23), ovarian (OVCAR-8), prostate (DU -145, PC-3, LNCaP), bladder (BIU 87), lung (A-549), primary liver carcinoma, glioblastoma (SF -29), hepatocellular carcinoma (HepG2), leukemia (K -562, U- 937 ML - 1, Jurkat T, HL - 60) and melanoma (MDA/MB-435) and moderate specificity against normal cells, and these effects by activating intrinsic and / or extrinsic pathways of apoptotic cell death. This biological potential was reflected in 32 patent filings since 1964, although bufadienolide with antitumor activity still show low expression in terms of intellectual property development despite the large number of articles available on scientific bases.

Key-words: Cytotoxicity, Bufadienolides, Technological Forecasting, Patents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Incidência de casos de câncer no mundo.....	15
Figura 2-	A classe Amphibia é composta por três ordens de anfíbios viventes. Ordem Anura (imagem A) representada por um sapo (<i>Rhinella schneideri</i>). Ordem Urodela (imagem B) salamandra. Na imagem C observa-se um espécime de <i>Siphonops annulattes</i> (Ordem Gymnophiona) um anfíbio ápodo e fossorial.....	29
Figura 3-	(A) Exemplar do Sapo cururu <i>Rhinella scheideri</i> mostrando a glândula parotóide (retângulo vermelho). (B) Corte frontal e lateral da glândula parotóide exibindo a secreção.....	30
Figura 4-	Estrutura química geral dos bufadienólídeos.....	35
Figura 5-	Esquema demonstrando as principais vias de ativação da apoptose, suas interconexões e as alterações morfológicas mais características.....	42
Figura 6 -	Depósitos de patentes no período 1964 a 2011, considerando as bases WIPO: <i>World Intellectual Property Organization</i> ; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; EPO: <i>EuropeanProperty Organization</i> e USPTO: <i>United States Patent and Trademark Office</i>	48
Figura 7-	Países que mais depositaram patentes envolvendo bufadienólídeos.....	49
Figura 8-	Distribuição por Classificação Internacional de Patente.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Potencial citotóxico dos extratos de veneno de <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> em linhagem de células neoplásica humanas após 72 hs de exposição avaliado pelo ensaio MTT.....	37
Tabela 2-	Estudo hemolítico dos extratos de venenos de <i>Rhinella marina</i> e <i>Rhaebo guttatus</i> de espectrofotometricamente terminados a mononucleares do sangue 540 nm e atividade citotóxica em células periférico (CMSP) quantificados pelo ensaio do Alamar Blue.....	39
Tabela 3-	Total de depósitos de Patentes pesquisados nas bases do INPI, EPO, USPTO E O WIPO.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIP	Classificação Internacional de Patentes
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EPO	<i>European Property Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ICT'S	Instituições Científicas e Tecnológicas
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCE'S	<i>New Chemical Entities</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARD	poli(ADPribose)polimerase
PI	Propriedade Intelectual
SMAC/DIABLO	<i>Second Mitochondria derived Activator of Caspases/Direct</i>
SCIELO	<i>Scientific Eletronic Libray Online</i>
USPTO	<i>United States Patentand Trademark Office</i>
WIPO	<i>World Intelectual Property Organization</i>

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Biologia e Epidemiologia Do Câncer.....	22
4.2	Formas de Tratamentos.....	24
4.2.1	Cirurgia.....	24
4.2.2	Radioterapia.....	25
4.2.3	Quimioterapia.....	25
4.2.4	Fármaco Anticâncer.....	26
4.3	Moléculas Antitumorais de Origem Animal.....	28
4.4	Anfíbios.....	30
4.4.1	Biologia da Secreção da Pele dos Anfíbios.....	31
4.4.2	Principais produtos secretados pela pele dos anfíbios.....	33
4.5	Prospecção Biotecnológica.....	47
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas e primárias de saúde (WHO, 2011). Entre 1981 e 2010, das 1.073 novas entidades químicas (*New Chemical Entities* - NCEs) aprovadas como medicamento pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, apenas 36% foram classificadas como verdadeiramente sintéticas, sendo que 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, portanto, como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra infecções (fúngicas ou bacterianas), mosquitos vetores de doenças, câncer, dislipidemias e imunomodulação (BUTLER, 2004; BALUNAS & KINGNORN, 2005; NEWMAN & CRAGG, 2012; FERREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2013). O Brasil detém uma expressiva biodiversidade faunística e botânica, terrestre ou marinha, grande parte ainda não explorada em diversos aspectos, demonstrando seu potencial para exploração de produtos naturais disponíveis (COSTA-NETO, 2005).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo que cerca de 70% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2013). As formas de tratamento mais convencionais incluem a radioterapia e a quimioterapia. 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. Já a América do Sul e, portanto, o Brasil, possui uma incidência de 172 casos para cada 100 mil habitantes (**Figura 1**) (WHO, 2014).

A maioria dos quimioterápicos tem origem ou são baseados em moléculas provenientes de plantas ou animais. Desde 1500 a.C., os produtos naturais têm sido reconhecidos como detentores de potencial anticâncer (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre as fontes naturais, animais produtores de toxinas fazem parte do costume, da medicina tradicional e, até mesmo, da culinária de diversos países ao redor do mundo (COSTA-NETO, 2005). Assim, as secreções animais têm representado uma importante ferramenta para a saúde humana, auxiliando no

entendimento de diversos processos fisiológicos ou patológicos e na geração de inovações farmacológicas e de conhecimento sobre a composição química de extratos e substâncias (REJANDRA; ARMUGAM; JEYASSULAN, 2004).

Animais como os anfíbios apresentam substâncias farmacologicamente ativas em sua pele com funções principais de protegê-los contra infecções de microorganismos e defesa contra predadores (DUELLMAN; TRUEB, 1996; DALY, 1995). O veneno desses animais, apesar de serem constituídos de vários componentes tóxicos, apresenta diferentes atividades biológicas como tripanocida, leishmanicida, antibacteriana, antifúngica (CUNHA-FILHO et al., 2005; TEMPONE et al., 2007; 2008), citotóxicas (CUNHA-FILHO et al., 2010; GAO et al., 2011; SCIANI et al., 2012), inseticidas (SUPRATMAN et al., 2000) e antivirais (WANG et al., 2011). O interesse em desenvolver bufadienolídeos isolados de sapos como agentes anticâncer vem aumentando progressivamente, pois essas substâncias com ação cardiotônica revelado atividade antitumoral (IMAI et al., 1965; CUNHA-FILHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2013).



Figura 1 – Incidência de casos de câncer no mundo. Fonte: WHO (2014).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Revisar o potencial citotóxico e antitumoral dos bufadienólídeos e realizar uma prospecção biotecnológica sobre essa classe de moléculas.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisar a biologia e a epidemiologia do câncer;
- Descrever a atividade antiproliferativa, citotóxica e antitumoral dos bufadienólídeos, principalmente, daqueles isolados de anfíbios;
- Realizar uma prospecção tecnológica em bases de dados nacionais e internacionais sobre o depósito de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia relacionados às atividades biológicas dos bufadienólídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAS E MÉTODOS

Este trabalho consiste em uma revisão bibliográfica realizada em fonte impressa e eletrônica. As fontes impressas foram livros e as de informações eletrônicas foram as bases de dados Google Acadêmico, Instituto Nacional do Câncer (INCA), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Science Direct*, Organização Mundial da Saúde (OMS), *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *European Property Organization* (EPO), Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INIPI), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO), todos consultados via on-line, utilizando as palavras-chaves: câncer, bufadienolideos ou *bufadienolides and cancer*. As buscas do material para referências foram feitas do período de Setembro de 2013 a Janeiro de 2014. A seleção do material ocorreu a partir de leitura previa dos títulos e resumos encontrados, utilizando os seguintes critérios de elegibilidade: apresentar o tema câncer, bufadienolideos ou *bufadienolides and cancer* e está disponíveis on-line nos idiomas português, inglês ou espanhol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Biologia e Epidemiologia do Câncer

O câncer é caracterizado como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de vários tipos presentes em um mesmo microambiente, geralmente se espalham pelos tecidos e órgãos adjacentes, (por metástase) para regiões distantes do organismo (KUMAR et al., 2004).

Por ser um estigma de mortalidade e dor o câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade. A palavra câncer vem de origem latina (*câncer*) significa “caranguejo” foi aplicada por sua semelhança ao modo de crescimento infiltrante, comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e impedir sua remoção (ALMEIDA et al., 2005).

O processo de carcinogênese é lento e multifatorial, podendo levar meses ou anos e inclui basicamente, três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação ocorre através da exposição de células normais a carcinógenos. A consequência disso é que as células encontram-se geneticamente alteradas. A transformação leva anos para se manifestar, podendo as células ficar no estado de dormência. Porém, nesta etapa, é impossível detectar o tumor clinicamente. No segundo estágio, a célula iniciada sofre um longo período de contato com o agente transformador, quando pelo menos dois mecanismos independentes estão envolvidos: a ativação mitótica e a atividade gênica. Neste momento, o estilo de vida pode ter efeitos vantajosos e evitar o desenvolvimento do câncer. O estágio de promoção muitas vezes interrompe a suspensão do contato célula-agente. A progressão é caracterizada por alterações metabólicas e morfológicas interpretadas como perda de diferenciação, proliferação descontrolada e alta agressividade das células malignas, evoluindo para manifestações clínicas e metástases (ALMEIDA et al., 2005; ESSERS; VERMEULEN; HOUTSMULLER, 2006).

Neoplásica é a célula que recebe os seguintes benefícios metabólicos e capacidades biológicas quando comparadas as células não transformadas: a) alterações cromossômicas (de forma e número); b) perda do controle da proliferação divisão celular; c) imortalidade celular devido à ativação da enzima telomerase; d) capacidade de invadir tecidos vizinhos ou distantes por metástases; e) capacidade

de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese); f) perda das propriedades adesivas da membrana plasmática, que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento celular; g) perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização. Dessa forma, todos os casos de câncer estão envolvidos no controle positivo e negativo do ciclo celular e da morte celular programada com as vias de transmissão de sinais biológicos (LIOTTA; KOHN, 2001; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Ainda que o câncer indique peculiares muito heterogêneas, todos os tumores malignos adquiriram atributos de crescer além dos limites conferido às células normais. O aumento clonal de uma célula alterada depende da crescente incapacidade de morrer por apoptose e do descontrole da sua capacidade proliferativa. Conseqüentemente, apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências comprovam que a resistência a apoptose é uma das características mais acentuadas da maioria dos tumores malignos (OKADA e MARK, 2004). De fato, o diagnóstico do processo de tumorigênese mostra que a disposição de resistir à morte pode ser adquirida por diversos mecanismos e ocorre em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Dentre estes, a resistência à morte por apoptose em células que resistiram do controle do crescimento e da diferenciação normais realizados por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular inclusive aquela induzida por hipóxia, por lesões no DNA ou por espécies reativas do oxigênio (ZONING et al., 2001).

O câncer é a segunda causa de mortes no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2008 foi responsável pela morte de 7,8 milhões de pessoas e acredita-se que o número de mortes continue aumentando nos próximos anos. A má alimentação, o consumo do tabaco, do álcool e a falta de exercícios físicos, junto com o envelhecimento são fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer e mais de 30% das mortes causadas pelo câncer podem ser prevenidas (INCA, 2013). A estimativa para 2014 conforme OMS (2013) é de 580 mil novos casos de câncer no Brasil, sendo os mais incidentes os cânceres de pele do tipo não melanoma (182 mil), próstata (68,8 mil), mama (57,1 mil), intestino (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil mortes ao ano) (OMS, 2013). A previsão para 2030 é que a mortalidade por câncer atinja 2,1 milhões de pessoas nas Américas sendo 45% destas na América Latina e Caribe (UICC, 2014).

4.2 Formas de Tratamento

O tratamento visa curar a doença, prolongar a vida e melhorar a qualidade de vida do paciente após o diagnóstico do câncer. O rastreamento (*screening*) é também uma forma de exame onde as pessoas saudáveis (sem sintomas de doenças) têm o objetivo de saber qual seu histórico familiar para desenvolver algum tipo de câncer, selecionando aquelas pessoas com maiores chances de ter uma doença por apresentarem exames alterados ou suspeitos e que, por conseguinte, devem ser encaminhadas para investigação diagnóstica (INCA, 2013). O rastreamento pode ser oferecido de duas formas diferentes: oportunístico (solicitação de exames de rastreamento de forma não sistemática) e organizado (solicitação de exames de rastreamento para uma população de risco dentro de um programa estruturado), sempre visando a redução da morbimortalidade pela doença (STEIN, et al., 2009).

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores com a quimioterapia e/ou tratamento radioterápico. Nos anos de 1970, estas formas clássicas de abordagem sofreram alterações significativas com a introdução do conceito de tratamento adjuvante. O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação à radioterapia e, mais recentemente, a associação destes aos anticorpos monoclonais, vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. Muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante primário tanto para as metástases como para os tumores (KUMMAR et al., 2004). Portanto, torna-se decisivo a necessidade de desenvolver e encontrar modalidades terapêuticas mais eficientes e introduzi-las no arsenal farmacológico de forma a oferecer oportunidades reais ao número crescente de pacientes com doenças malignas disseminadas.

4.2.1 Cirurgia

É a remoção do tumor junto com o tecido circundante livre de tumor, podendo haver a remoção de gânglios linfáticos regionais. Os efeitos secundários da cirurgia

dependem da área, do tipo e tamanho do câncer e das características do paciente (LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO, 2011). Logo, o câncer, em sua fase inicial, pode ser controlado e/ou curado, através do tratamento cirúrgico, quando este é o tratamento indicado para o caso. O planejamento cirúrgico deve incluir todos os cuidados referentes aos princípios gerais de uma cirurgia e ao preparo do paciente e seus familiares sobre as alterações fisiológicas e/ou mutilações que poderão advir do tratamento (KUMMAR et al., 2004).

Este tipo de tratamento pode ser dividido em: a) cirurgia curativa, apropriada para tumores iniciais e normalmente sólidos, que consiste no conhecimento do mecanismo de propagação dos tumores e na retirada de órgãos ou das regiões afetadas pela neoplasia e b) cirurgia paliativa, indicada para diminuir o sofrimento do paciente e proporcionar melhores condições de vida (SCHEINBERG, 2010).

4.2.2 Radioterapia

As radiações são empregadas para destruir ou impedir que o número de células tumorais aumente, podendo ser usada junto com quimioterapia ou outros recursos auxiliares. A radioterapia geralmente utiliza raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons π negativos, sendo usada com frequência e em conjunto com a cirurgia com o objetivo de ampliar a eficiência do tratamento. A radioterapia tem um alto índice de efeito e quando não cura melhora a condição de vida, pois diminui o tamanho do tumor, hemorragias, dores e outros sintomas (INCA, 2013). Mesmo isolada, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuindo a recorrência e a chance de metástase. Os efeitos colaterais costumemente incluem cansaço, dificuldade para ingerir alimentos e perda de apetite e alergias (ALMEIDA et al., 2005).

4.2.3 Quimioterapia

A quimioterapia se baseia no emprego de uma substância química, combinada ou isolada, com a finalidade de tratar as neoplasias malignas, agindo no nível celular, interferindo no processo de divisão, crescimento e invasão tecidual por células cancerosas (BONASSA; BLOCH; THOMSON, 2000; SOUZA et al., 2007).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre células que se encontram no ciclo celular (fases G_1 , S, G_2 e mitose), e são denominados fármacos ciclo-celular específicos. Como exemplo podemos citar compostos provenientes de vegetais como alcalóides da vinca vinblastina, vindesina e vinorelbina, que interferem na formação dos microtúbulos. Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G_0 , tais como os alquilantes (mostardas nitrogenadas e nitrosouréias) que possuem capacidade de se intercalar com o DNA ou formar ligações cruzadas que interferem na síntese do DNA (ALMEIDA et al., 2005; SRIVASTAVA et al., 2005).

O câncer pode ser tratado através de monoquimioterapia ou poliquimioterapia. Esta última é a mais utilizada por apresentar resultados mais eficientes ao reduzir o risco de resistência e atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO et al., 2003).

A quimioterapia interfere na transcrição ou síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou diretamente na produção de proteínas, operando, na maioria das vezes, em células em divisão (FERRARI e HERZBERG, 1998; FERREIRA et al., 2010, 2011). É desejável utilizar na quimioterapia doses muito altas capazes de atingir o maior nível de morte celular possível. Considerando um tumor de 1 g (cerca de 10^9 células), cada ciclo de terapia mata cerca de 99% das células. Porém, é indispensável repetir o tratamento em diversos ciclos para matar todas as células tumorais (KATZUNG, 2003).

As células-tronco cancerosas, definidas como uma subpopulação rara de células tumorais caracterizada por suas propriedades de iniciação do tumor, devido a sua multipotência de diferenciação e capacidade de autorrenovação, são muito resistentes à radioterapia e à quimioterapia (VIZZONI, 2008; MAUGERI; VIGNERI; DE MARIA, 2011).

4.2.4 Fármacos anticâncer

Os agentes antineoplásicos mais antigos, conhecidos como agentes alquilantes, interferem no processo de divisão celular e interagem quimicamente com o DNA. Na quimioterapia, de fato, são descritos muitos alvos com o intuito de

se estabelecer novos fármacos antitumorais que podem ser estudados, sendo que o DNA é um dos alvos mais estudados (KESKIN et al., 2000).

A grande maioria dos quimioterápicos são ou tem como base produtos naturais a partir de plantas, animais e microrganismos. De fato, cerca de 60% dos antineoplásicos atualmente utilizados na clínica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (SCHIFF et al., 1979; EISENHAUER; VERMORKEN, 1998; CLARDY; WALSH, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). Estes fármacos atuam sobre células que estão em constante divisão e/ou crescimento constante, como células neoplásicas, dos bulbos capilares, do trato gastrointestinal, mucosas e da medula óssea, geralmente, não havendo distinção entre elas, fato que causa alguns efeitos colaterais como diminuição da disposição física, náuseas, alopecia, perda de peso, aumento de infecções e hemorragias, inflamação das mucosas, imunossupressão, emagrecimento, vômitos e diarreia (MUSCARILIN; TIERNEY; STADTMAUER, 1993; FERRARI; HERZBERG, 1998; ANAZETTI et al., 2003; COSTA et al., 2008).

Outra alternativa mais atual no tratamento de cânceres, especialmente, os de caráter mais avançado, são as terapias dirigidas que focam no conhecimento da genética do câncer e biologia molecular (ISMAEL; SEGALLA; ROSA, 2007), aproveitando o funcionamento anormal das células neoplásicas para aumentar mecanismos que visem a redução do crescimento neoplásico. Terapias dirigidas em desenvolvimento incluem os inibidores da angiogênese, antagonistas da apoptose, inibidores dos fatores de crescimento, vacinas, antagonistas hormonais e imunoterapia (ALMEIDA et al., 2005).

Assim, muitos estudos estão sendo realizados para a maior eficiência da quimioterapia e a combinação de diversos agentes antineoplásicos, pretendo obter resultados com índices surpreendentes de cura de 75 a 90% em diversos tipos de câncer. No entanto, apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado. O carcinoma de pulmão de não-pequenas células que se encontra entre os mais frequentes em todo o mundo, apresenta respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis. Como a monoterapia apresenta apenas resposta parcial em 15% a 20% dos casos e com as associações terapêuticas não ultrapassa de 40% a 50%, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Por outro lado, a morbidade associada aos quimioterápicos

ainda é um obstáculo significativo. A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área de oncologia farmacológica, tornando-se importante a informação sobre os aspectos bioquímicos, químicos e biológicos destes quimioterápicos em potencial.

4.3 Moléculas Antitumorais de Origem Animal

Considerando o mercado farmacêutico mundial, os produtos naturais são, e provavelmente continuarão sendo, a fonte mais importante de novas substâncias bioativas, inclusive aquelas com potencial anticâncer. Novos nichos e interações ecológicas ganharam importância nas últimas décadas, como alvos alternativos para a pesquisa de produtos bioativos. Deste modo, após bilhões de anos de evolução, a natureza contempla uma enorme diversidade de organismos terrestres e marinhos. No que diz respeito ao nosso planeta, estima-se que existam cerca de 30 milhões de insetos, 1,5 milhão de algas, 1,5 milhão de fungos, 1 milhão de animais, além da existência de mais de 400 mil espécies de plantas (ROBERTS, 2002; BOEUF, 2011). Assim, existe um potencial extraordinário para a descoberta de novos fármacos anticâncer de ocorrência natural em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação. Inclusive no momento, avalia que pelo menos 2% das plantas superiores foram avaliadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica. Na realidade, uma grande quantidade de moléculas com atividade antineoplásica derivadas de animais, de plantas e microorganismo ainda pode ser revelada (ZHANG, 2002). Além disso, o conhecimento de novos alvos terapêuticos amplia a possibilidade da descoberta de novas moléculas com potencial anticâncer.

Microrganismos como as cianobactérias, bactérias e fungos são uma fonte rica de novos metabólitos biologicamente ativos, a maior parte dos produtos marinhos tem sido isolada de invertebrados tais como esponjas, tunicados, briozoários e moluscos (CAPON, 2001). Dentre as substâncias provenientes da biota marinha, as classes mais estudadas compreendem ácidos graxos (gorduras), terpenóides, policetideos, alcalóides, acetogeninas, polifenólicos (conhecidos também como aromáticos), macrolídeos e peptídeos. A variedade estrutural é aumentada quando se trata de metabólitos isolados de microrganismos marinhos,

originados em alguns casos por meio de rotas biossintéticas mistas, que podem estar relacionadas à simbiose (HAY, 1996; BLUNT et al., 2011).

As primeiras investigações do ambiente marinho foram direcionadas a metabólitos altamente halogenados produzidos a partir de algas vermelhas. Estas moléculas biologicamente e estruturalmente potentes, tais como discodermolida e hemiasterlina, são originadas de esponjas. Essas contêm bactérias simbiontes e muitos metabólitos dessas esponja têm origens bacterianas. Um estudo preliminar demonstrou que pederina é um metabólito de insetos bem conhecido com uma estrutura muito semelhante à de outros compostos de esponja que vem de origem bacteriana (PIEL, 2004).

Dentre as espécies marinhas responsáveis por fornecer produtos naturais quimicamente revolucionários, as cianobactérias marinhas (algas azuis-esverdeadas) são provavelmente as mais produtivas do ponto de vista de potência biológica (SHAH; ORLOWSKI, 2009). A apratoxina D é dos candidatos anticâncer e vem se destacando destaque por exibir uma dose de CI_{50} de 2,6 nM (concentração mínima capaz de inibir a proliferação de 50 % das células tumorais) em linhagens de células de câncer de pulmão humano da linhagem H-460. As jamaicamidas A-C, isoladas de *Lyngbya majuscula*, mostram citotoxicidade contra H-460 e neuroblastoma de camundongos (EDWARDS et al., 2004).

A didemnina B, um depsipeptídeo cíclico isolado da ascídia caribenha *Trididemnum solidum*, foi a primeira substância natural marinha a entrar para testes clínicos como um agente anticâncer. Nos estudos *in vitro* e *in vivo*, esta substância demonstrou uma potente atividade antiviral, imunossupressora e anticâncer, e valores de CI_{50} de 1nM, e excelente atividade antitumoral contra leucemias e melanomas. O mecanismo de ação da didemnina B é complexo e ainda está por ser completamente esclarecido. Independentemente, os resultados animadores dos estudos com linhagens de células tumorais e camundongos com tumores transplantados foram razão suficiente para iniciar os ensaios clínicos em 1986. (RINEHART; GLOER; COOK, 1987; BHUYAN, 1984; CRAMPTON et al., 1984; VERA; JOULLIÉ, 2002).

A trabectedina é um alcalóide tetra-hidroquinolínico extraído da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinatae* cujo mecanismo de alquilação de DNA difere da ampla maioria dos outros agentes alquilantes. Esta molécula se liga à guanina em sequências específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice, originando

uma dobra nas fitas de DNA (POMMIER, 1996). Este dobramento leva ao bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento e ligação normal de fatores de transcrição ou proteínas ligantes ao DNA, causando ativação ou inibição de determinados genes (ERBA et al., 2003). A inibição da transcrição do gene *MDR1* é um dos efeitos mais surpreendentes desta substância, sendo este gene responsável pela produção de glicoproteína-P, uma proteína que realiza o bombeamento de diversos quimioterápicos para fora das células e pode estar superexpressa em células tumorais. A glicoproteína-P confere às células tumorais um perfil de resistência a múltiplas drogas (MDR), o que pode vir a ser prevenido pelo tratamento com trabectedina (JIN et al., 2000; KANZAKI et al., 2002).

4.4 Anfíbios

Os anfíbios são membros do Reino Animalia, Filo Chordata, subfilo Vertebrata, Classe Amphibia e se subdivide nas seguintes ordens (**Figura 2**):

- a) Anura ou Salientia (sapos, rãs e pererecas);
- b) Urodela ou Caudata (Salamandras e tritões);
- c) Ápoda ou Gymnophiona (cobras cegas ou cecília).



Figura 2 - A classe Amphibia é composta por três ordens de anfíbios viventes. A) Ordem Anura representada por um sapo (*Rhinella schneideri*). Fonte: Banco Internacional de Objetos Educacionais (2013); B) Ordem Urodela representa uma espécie de salamandra encontrada no nosso país *Bolitoglossa paraensis*. Fonte: Araguaia (2013); C) Ordem Gymnophiona representada por um espécime de *Siphonops annulatus*, um anfíbio ápodo e fossorial. Fonte: Stock photo (2013).

O nome anfíbios provém do grego *amphibios* (*amphi* = dual, *bios* = vida) que significa vida dupla e corresponde às duas fases da vida dessa classe de animais, uma na água e outra na terra (DUELLMAN, 1992). Eles possuem a capacidade de

sobrevivência tanto em ambiente aquático como terrestre devido à evolução a outras adaptações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (CLARKE, 1996), com desenvolvimento de pernas em lugar de nadadeiras; alterações no metabolismo e na excreção para formar menos produtos nitrogenados tóxicos e, além disso, aquisição de órgãos dos sentidos, que funcionam tanto no ar como na água (DUELLMAN, 1992).

A família Bufonidae, contém cerca de 50 gêneros e 550 espécies originalmente difundidas por quase todo o globo terrestre, exceto Austrália, regiões oceânicas, Madagascar, Ártico e Antártico (PRAMUK, 2006; FROST, 2011). A família Bufonidae recentemente foi revisada por vários autores devido as suas relações filogenéticas. Essas revisões mudaram a nomenclatura de vários táxons, entre eles, o gênero *Bufo* (FROST et al., 2006; PRAMUK, 2006; CHAPARRO et al., 2007). Chaparro et al. (2007), baseados em dados moleculares, sugeriram que a maior parte das espécies de *Bufo* da América do Sul fossem colocadas no gênero *Rhinella*.

No Brasil, a família Bufonidae é representada por sete gêneros, sendo *Rhinella* mais representativo, têm cerca de 40 espécies. São conhecidos vulgarmente pelo nome genérico de "sapo-cururu" (do tupi *kuru'ru* - sapo grande) e inclui distintos habitats. Uma das espécies mais analisadas na região amazônica é a *Rhinella marina*, antigo *Bufo marinus* (EASTEAL, 1963).

Os anfíbios surgiram no final do período Devoniano com mudança do ambiente de aquático para terrestre em função da conquista progressiva de um conjunto de adaptações morfofuncionais e comportamentais. Entre outros órgãos, a pele destes animais apresentou alterações associadas com a nova forma de vida, apresentando glândulas exócrinas multicelulares, provenientes da epiderme, o que deve ter desempenhado um papel extraordinário para evitar a desidratação (TOLEDO, JARED, 1995).

4.4.1 Biologia da Secreção da Pele dos Anfíbios

Assim como em todos os vertebrados, a pele dos anfíbios é composta por uma epiderme e uma derme (DUELLMAN; TRUEB, 1996). A camada mais externa, a epiderme, possui origem ectodérmica e é formada basicamente por três estratos:

a) Estrato córneo, que se localiza mais superficialmente e é composto geralmente por uma única camada de células achatadas e queratinizadas (FARQUHAR; PALADE, 1965);

b) Estrato intermediário, localizado logo abaixo do estrato córneo, que é formado por diversas camadas de células poliédricas e pode ser dividido em estrato granuloso, espinoso e germinativo (basal), abaixo dos outros dois estratos, formado por uma única camada de células, frequentemente colunares e apoiadas em uma lâmina basal (FARQUHAR; PALADE, 1965). A derme é composta basicamente de duas camadas de tecido conjuntivo: o estrato esponjoso, que contém colágeno, fibras elásticas, nervos, vasos sanguíneos e glândulas (ELKAN, 1968; ANDREW; HICKMAN, 1974);

c) Estrato compacto, que contém fibras colágenas frequentemente dispostas em blocos e paralelas à superfície do corpo. Imediatamente abaixo do estrato compacto localiza-se a tela subcutânea, composta de tecido conjuntivo frouxo (ELKAN, 1968; ANDREW; HICKMAN, 1974).

A pele dos anfíbios exerce várias funções importantes, como respiração, transporte de água e solutos, regulação da temperatura corpo e de defesa contra microorganismos e predadores, sendo considerado como um dos principais fatores que garantiu a sobrevivência e a permanência desses animais no ambiente terrestre (DUELLMAN, 1992; SEBBEN et al., 1993; CLARK, 1997). Os principais mecanismos fisiológicos adaptativos relacionam-se como controle da dissecação e da pressão arterial, bem como a presença de componentes bioativos de atividade antibiótica protegendo os animais de infecções bacterianas, virais e fúngicas (DUELLMAN, 1992).

Muitos componentes bioativos presentes na pele dos anfíbios são sintetizados por glândulas cutâneas distribuídas por toda a pele (DALY, 1995). Estas podem ser de dois tipos, mucosas e granulosas (DUELLMAN, 1992). As glândulas mucosas secretam um muco altamente hidrofílico que controlam o pH e o grau de umidade da pele, proporcionando condições adequadas para respiração cutânea (TOLEDO; JARED, 1995). Já as glândulas granulosas são as principais responsáveis pela defesa passiva dos anfíbios, devido a sua secreção ser tóxica para diversas espécies de vertebrados. Nos sapos existem duas estruturas denominadas glândulas parótides (**Figura 3**), que representam um acúmulo de glândulas granulosas. Essas glândulas produzem e armazenam substâncias que são liberadas

após compressão destas glândulas exercendo uma importante função de defesa (SEBBEN et al., 1993; JARED et al., 2009).

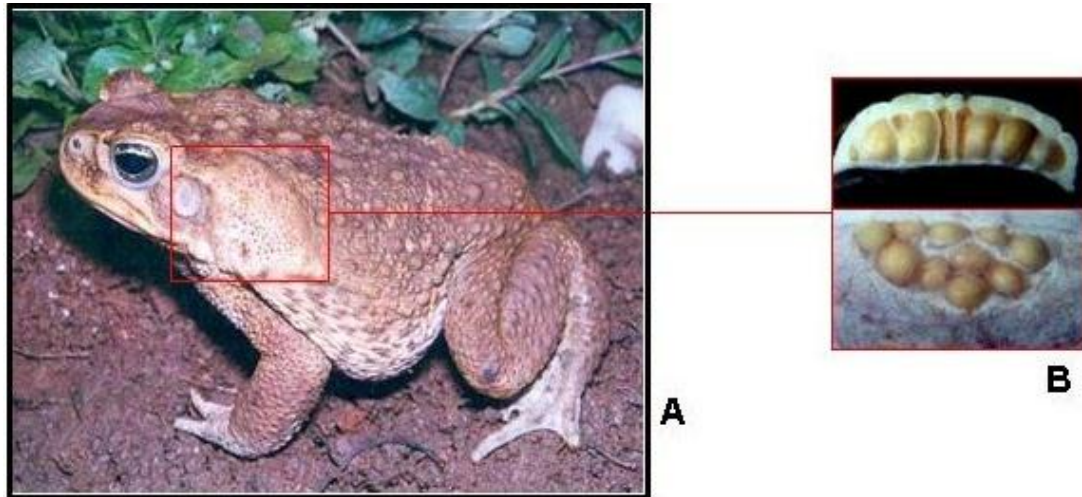


Figura 3 - (A) Exemplar do Sapo cururu *Rhinella scheideri* mostrando a glândula parotóide (retângulo vermelho). (B) Corte frontal e lateral da glândula parotóide exibindo a secreção. Fonte: Cunha-Filho (2010).

Em relação aos peptídeos, pesquisas mostram que eles estariam ausentes ou aconteceriam em baixas quantidades na secreção cutânea dos bufonídeos (CLARKE, 1997). Um estudo mais recente desenvolvido por Rashet al. (2010), demonstrou experimentalmente, que a quantidade de peptídeos na secreção venenosa das parotóides é realmente muito reduzida. Essa especialidade do veneno dos sapos torna-se ainda mais evidente quando comparada à riqueza de peptídeos encontrados no veneno das rãs (Ranidae) e pererecas (Hylidae) (PUKALA et al., 2006). Nas pererecas filomedusas, por exemplo, existe uma infinidade desses componentes. Alguns pesquisadores levantaram suspeita que os escassos peptídeos do veneno dos bufonídeos consistem em produtos de degradação de proteínas, envolvidas, sobretudo no processo de manutenção celular das próprias glândulas de veneno. Deste modo, esses componentes não devem contribuir para a toxicidade do seu veneno (RASH et al., 2010).

4.4.2 Principais produtos secretados pela pele dos anfíbios

A maioria dos quimioterápicos tem origem ou são baseados em moléculas provenientes de plantas ou animais. Desde 1500 a.C., os produtos naturais têm sido reconhecidos como detentores de potencial anticâncer (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre as fontes naturais, animais produtores de toxinas fazem parte do costume, da medicina tradicional e, até mesmo, da culinária de diversas países ao redor do mundo (COSTA-NETO, 2005). Assim, as secreções animais têm representado uma importante ferramenta para a saúde humana, auxiliando no entendimento de diversos processos fisiológicos ou patológicos e na geração de inovações farmacológicas e de conhecimento sobre a composição química de extratos e substâncias (REJANDRA; ARMUGAM; JEYASSULAN, 2004). Dentre os princípios ativos encontrados nas peles dos anfíbios, moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de uma diversificada gama de esteróides, alcalóides, aminas biogênicas, derivados guanídínicos, proteínas e peptídeos são encontrados nesses animais (CLARKE, 1997; MONTI; CARDELLO, 1999; PRATES; BLOCH Jr., 2000). Nos bufonídeos em geral, a secreção venenosa contém basicamente esteróides, aminas biogênicas e proteínas (ZELNIK et al., 1965; TOLEDO; JARED, 1989; TOLEDO; JARED, 1995; PERRY, 2000). O veneno das espécies de sapo do gênero *Phylllobates* ficou historicamente conhecido por seu uso por tribos indígenas do oeste da Colômbia, na floresta amazônica, que envenenavam as extremidades dos dardos das zarabatanas para a prática da caça (HICKMAN JÚNIOR et al., 2009). A toxina de *Phylllobates*, responsável pela paralisia e morte desses animais, é a Batracotoxina (BTX), uma das mais potentes toxinas encontradas na natureza, 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 a inativação do canal para sódio e causa mudança de voltagem para potenciais mais negativos (CATTERALL et al., 2007). Segundo análises feitas por Bosmans et al. (2004), a BTX inibe a propagação do estímulo da dor, com potencial para a produção de analgésicos.

A secreção da pele dos anfíbios contém compostos biologicamente ativos que desenvolve diversos papéis, seja na regulação da função fisiológica da pele ou nos mecanismos de defesa contra predadores ou microorganismos (CLARK, 1997). A síntese dos peptídeos com atividade antimicrobiana em glândulas granulares localizada na pele é uma característica de várias espécies de anuros (rãs e sapos), particularmente aquelas pertencentes às famílias Bombinatoridae, Hylidae,

Hyperoliidae, Myobatrachidae, Pipidae e Ranidae (CONLON; KOLODZLEJEK; NOWOTNY, 2004; SIMMACO et al., 1998). Um fármaco produzido a partir de um análogo da magainina, uma toxina isolada de secreção de *Xenopus*, é o Locilex®, um creme antibiótico tópico de base peptídica, que causa poros em membranas de bactérias anaeróbias Gram-negativas e Gram-positivas resistentes à vancomicina e menicilina e de fungos (ULVATNE, 2003). Mas esse produto não obteve aprovação do FDA para a comercialização pelo fato dos estudos de comparação não deixarem claro a sua eficácia. Duas lectinas com atividade bacteriostática contra bactérias Gram negativas e Gram positivas foram isoladas a partir da pele do *Bufo arenarum* (RIERA et al., 2003).

Os egípcios são considerados a primeira civilização a utilizar cila (*Scilla maritima*), uma planta que contém o composto cilareno A, o primeiro bufadienolídeo encontrado, cuja estrutura foi elucidada em 1933 e usada no tratamento de doenças do coração. Culturas asiáticas (os chineses foram os primeiros) usavam diferentes venenos da pele de sapo para a preparação de remédios (KRENN; KOPP, 1998). *Chan'Su* é o veneno seco do sapo *Bufo bufogargarizans* e/ou *Bufo melanostictus*, é usado em algumas regiões da China e alguns outros países asiáticos devido às suas propriedades anestésicas, anti-inflamatórias, cardiotônicas, diuréticas e hemostáticas. Bufalina e cinobufagina são dois importantes bufadienolídeos componentes do *Chan'Su* (YE et al., 2004).

Bufadienolídeos são esteróides cardioativos poli-hidroxilados com 24 carbonos que se apresentam na forma livre ou conjugada na posição C-3 com sulfatos, ésteres dicarboxílicos e aminoácidos, sendo caracterizados por conter um anel de lactoninsaturada (NOGAWA et al., 2001; BICK et al., 2002; FERREIRA et al., 2013) (**Figura 4**). Mais de 250 bufadienolídeos já foram identificados tanto de vegetais (famílias Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae e Santalaceae) quanto de animais. São moléculas encontradas nos tecidos e fluidos corporais de sapos em cerca de 10 espécies do gênero *Rhinella* (anteriormente *Bufo*) (KRENN; KOPP, 1998), uma cobra (*Rhabdophis tigrinus*) (HUTCHINSON et al., 2007) e um artrópode (*Photinus*) (EISNER et al., 1978). A grande variedade de compostos conhecidos é principalmente devido ao número e a posição dos substituintes (LENAERTS et al., 2013; MENG et al., 2001).

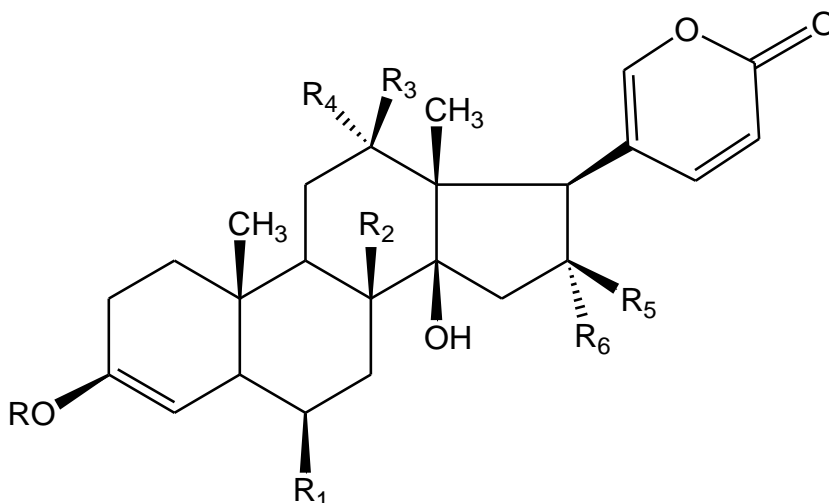


Figura 4 - Estrutura química geral dos bufadienólídeos.

Alguns bufadienólídeos possuem atividade antitumoral, como descrito para bufalina, esquilareína, bufotalina, gamabufotalina, cinobufotalina e cinobufagina e (XU et al., 2007).

Extratos do veneno de sapos macho/fêmea de *R. marina* e *Rhaebo guttatus*, após análise do perfil cromatográfico revelaram quatro bufadienolídeos nos extratos de *R. marina* (RMF-1 e RMM-5: telocinobufagina, marinobufagina, bufalina, e resinobufogenina) ao passo que no veneno de *R. guttatus* (RGF-6 e RGM-9) somente um bufadienolídeo foi identificado (marinobufagina). Estes extratos avaliados pelo ensaio do MTT revelaram atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas, principalmente aqueles extratos provenientes de *R. marina*, os quais revelaram valores de CI_{50} comparáveis aos observados com o controle positivo doxorrubicina, um fármaco muito utilizado na clínica para tratamento de carcinoma de mama e cólon. Assim, todos os extratos dos venenos de *R. marina* revelaram alta atividade citotóxica, com valores de CI_{50} variando de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ [RMF-1, RMF-4, RMF-5 (linhagem HL-60, leucemia pró-mielocítica); RMF-4, RMF-5 (SF-295, glioblastoma) e RMF-4 (HCT-116, cólon)] a 0,23 $\mu\text{g/mL}$ (OVCAR-8, ovário) (Tabela 1). Por outro lado, os extratos dos venenos de *R. guttatus* apresentaram ação citotóxica menores quando comparados aos encontrados em *R. marina* (CI_{50} variando de 2,9 a 6,6 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 1).

A análise de citotoxicidade pelo ensaio do MTT vem sendo utilizada em programa de *screening* para selecionar substâncias com ação antineoplásica, sendo

um método rápido, sensível e barato (BERRIDGE et al., 1996; FERREIRA et al., 2011, 2013). Foi descrito primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico das células com base na colorimetria da conversão do sal MTT em azul de formazan a partir de enzimas mitocondriais (como a succinil desidrogenase) presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

De acordo com o *American National Cancer Institute* (NCI), extratos que apresentam valores de CI_{50} menores que 30 $\mu\text{g/mL}$ são considerados promissores para estudos de purificação de moléculas (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990; FERREIRA et al., 2011). Anteriormente, os estudos antitumorais *in vitro* similares foram realizados com os gêneros *Rhinella* e *Rhaebo*, entre as quais secreções da pele e dos seus componentes (tais como epoximarinobufagina, bufalina, cimarinobufagina, cinobufagina, cinofagina, telocinobufagina, hellebregenina, 3 β -acetoxi-marinobufagina, 3 β -acetoxi-bufalina, 3 β -acetoxi-telocinobufagina e 20S, 21R-epoxi-marinobufagina) e bufadienolídeos isolados do fármaco tradicional da China, *Ch'anSu*, mostraram atividade contra diversas linhagens células tumorais, tais como o cólon (26-L5), leucemias (K-562, U-937 ML-1, Jukart T, HL-60), melanoma (MDA/MB-435), mama (MCF-7, MDA/MB-231), próstata (DU-145, PC-3, LNCaP), bexiga (BIU-87), carcinoma hepatocelular (HepG2), carcinoma de pulmão (A-549) e carcinoma primário de fígado (PLC/PRF/5) (ZHANG et al., 1992; NOGAWA et al., 2001; OGASAWARA et al., 2001; KAMANO et al., 2002; YEY et al., 2003; SU; XU, YE, 2009; CUNHA-FILHO et al., 2010; QI et al., 2011; SCIANI et al., 2012; LEE et al., 2014).

Tabela 1. Potencial citotóxico dos extratos de veneno de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* em linhagem de células neoplásicas humanas após 72h de exposição avaliada pelo ensaio MTT.

Extrato	CI ₅₀ (µg/mL)*			
	SF-295	OVCAR-8	HL-60	HCT-116
RMF-1	0,03	0,06	0,01	0,02
	0,03 – 0,04	0,05 – 0,09	0,008 – 0,01	0,01 – 0,02
RMF-2	0,08	0,09	0,05	0,06
	0,06 – 0,09	0,07 – 1,0	0,04 – 0,06	0,04 – 0,07
RMF-4	0,01	0,03	0,01	0,01
	0,01 – 0,02	0,02 – 0,03	0,01 – 0,01	0,01 – 0,01
RMF-5	0,01	0,03	0,01	0,02
	0,01 – 0,02	0,02 – 0,03	0,01 – 0,02	0,01 – 0,02
RMM-1	0,09	0,23	0,07	0,06
	0,08 – 0,11	0,18 – 0,28	0,05 – 0,09	0,04 – 0,08
RGF-1	4,0	2,9	3,2	4,0
	3,2 – 5,0	2,1 – 4,0	2,8 – 3,6	2,6 – 5,9
RGF-2	3,2	3,8	4,6	3,1
	2,7 – 3,8	3,1 – 4,9	2,2 – 7,5	2,0 – 4,7
RGF-3	4,8	5,2	3,6	4,9
	4,1 – 5,6	4,4 – 6,2	2,9 – 4,4	4,4 – 5,4
RGM-1	6,6	4,5	4,9	5,9
	5,2 – 8,4	3,2 – 6,5	4,1 – 6,1	3,8 – 9,1
Doxorrubicina	0,2	1,3	0,02	0,01
	0,2 – 0,3	1,0 – 1,9	0,01 – 0,02	0,01 – 0,02

* Os dados são apresentados como valores de CI₅₀ e os intervalos de confiança de 95% para a leucemia (HL-60), carcinoma do cólon (HCT-116), carcinoma do ovário (OVCAR-8) e glioblastoma (SF-295). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. *Rhinella marina* fêmea/macho (RMF / RMM); *Rhaebo guttatus* fêmea/macho (RGF / RGM). Fonte: adaptado de Ferreira et al. (2013).

A maioria desses extratos foi fracamente citotóxico em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), representadas pelos leucócitos (neutrófilos, especialmente), isolados a partir do sangue periférico de voluntários adultos saudáveis, não-fumantes, que não fizeram uso de qualquer droga por pelo menos 15 dias antes da coleta, com idade entre 18-35 anos. Esses extratos apresentaram CI_{50} maiores para os leucócitos em proliferação (0,8; 0,5; 0,4; 0,3; 1,1; 0,8; 16; 13,1 e 13,9 $\mu\text{g/mL}$ para a RMF-1, RMF-2, RMF-4, 5-RMF, RMM -1, RGF-1, RGF-2, RGF-3 e RGM-1, respectivamente) (**Tabela 1**) quando comparados aos valores encontrados contra a linhagem HL-60, sendo o extrato RMF-1 até 80 vezes mais seletivo contra células leucêmicas, quando comparado com leucócitos em divisão, uma vantagem muito desejada para novas moléculas alvo anticâncer. Mais recentemente, o extrato etanólico isolado da pele e das glândulas de venenosas parotóides de *Bufo bufo gargarizans* Cantor ao mesmo tempo que se mostrou citotóxico contra células cancerosas pouco interferiu na viabilidade de PBMCs (LEE et al., 2014). No contexto da terapia antineoplásica, a determinação do potencial toxicológico sobre as células normais 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 muito 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 sobrevivência não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (ANAZETTI et al., 2003; KAMB, 2005; SOUZA et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Os extratos de *R. marina* causaram não mostraram potencial hemolítico em eritrócitos humanos após 1h de incubação, sugerindo que o mecanismo de citotoxicidade está provavelmente relacionado com uma via mais específica e não está associada com danos diretos à membrana (FERREIRA et al., 2013) (**Tabela 2**). Previamente, Cunha-Filho et al. (2010) e Sciani et al. (2012) não identificaram atividade hemolítica em secreções da pele dos anfíbios de *R. crucifer*, *R. marina*, *R. schneideri* e *R. major* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, embora em *R. jimi*, *R. margaritifera* e *Phyllomedusa hipocondrialis* a ruptura da membrana celular foi demonstrada após 1h de incubação. Resultados divergentes foram vistos com extratos de venenos de *R. guttatus*, ao passo que todos eles exibiram potencialidade hemolítica, um achado contraditório quando comparado com aquele descrito por

Sciani et al. (2012), que reportou injúrias à membrana. É provável que esta diferença deve ser correlacionada com a gama de concentrações estudadas e com a presença de diferentes compostos.

Tabela 2 – Estudo hemolítico dos extratos de venenos de *Rhinella marina* e *Rhaebo guttatus* determinados espectrofotometricamente a 540 nm e atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) quantificados pelo ensaio do Alamar Blue.

Extrato	CE ₅₀ (µg/mL)*	CI ₅₀ (µg/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-4	> 200	0,4 (0,2 – 0,6)	40
RMF-5	> 200	0,3 (0,2 – 0,4)	30
RMM-1	> 200	1,1 (0,5 – 2,4)	15,6
RGF-1	33,7 (28,1 – 40,5)	0,8 (0,6 – 0,9)	0,3
RGF-2	30,8 (27,7 – 34,2)	16,0 (10,6 – 24,3)	3,5
RGF-3	20,8 (15,8 – 27,4)	13,1 (11,1– 15,4)	3,6
RGM-1	27,9 (22,8 – 34,3)	13,9 (11,0 – 17,6)	2,8
Doxorubicina	Nd****	0,9 (0,5 – 1,8)	45

* Os dados são apresentados como valores de CE₅₀ e intervalo de confiança de 95% para eritrócitos humanos, após 1 h de incubação. Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo.

**Os dados são apresentados como valores de CI₅₀ e intervalo de confiança de 95% para as CMSP após 72 h de exposição. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

*** Coeficiente de seletividade determinada pela CI₅₀ em CMSP/ CI₅₀ em células HL-60 (ver Tabela 1). *Rhinella marina* fêmea/macho (RMF / RMM); *Rhaebo guttatus* fêmea/macho (RGF / RGM).As experiências foram realizadas em triplicata.

**** Não determinado.

Fonte: adaptado de Ferreira et al. (2013)

De fato, as investigações demonstraram que algumas secreções da pele de sapo possuem compostos que são capazes de induzir parada do ciclo celular na fase G2/M ou na fase S, redução dos níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2, diminuir a viabilidade celular e a síntese de DNA, ativar caspases iniciadoras e efetoras e provocar alterações morfológicas (condensação da cromatina, fragmentação

nuclear, retração de citoplasma, descolamento celular, bolhas de membrana e corpos apoptóticos) em carcinomas da próstata e da mama (YEH et al., 2003; SU; XU; YE, 2009; SCIANI et al., 2012; FERREIRA et al., 2013),

Os bufadienólídeos bufalina e cinobufagina de *B.bufo gargarizans* induziram, em concentrações tão baixas quanto 0,1µM, a morte de células Hep G₂ após 24 de tratamento, com redução da viabilidade celular, aumento de células apoptóticas determinado por citometria de fluxo, 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 capases-3, -9, -8 e -10, inibição da apoptose por inibidores de caspases e maior expressão da proteína de morte Fas, indicando que o processo apoptótico está associado a vias dependentes da ativação das caspases-8/10 por meio do receptor de morte Fas e da ativação da caspase-9 por via mitocondrial (QI et al., 2011). O extrato etanólico, cujo compostos majoritários são a bufalina e cinobufagina, mostraram resultados semelhantes sobre as linhagens tumorais MCF-7, A-549 e leucemia de células T (Jukart T) após 48h de tratamento, detectando-se intensa redução da viabilidade celular, aumento do percentual de células apoptóticas, quebras simples e duplas das fitas do DNA detectadas pelo ensaio do cometa e indução da formação de micronúcleos (fragmentos de DNA envolvidos por membrana presentes no citoplasma de células interfásicas) (LEE et al., 2014). Todos esses achados sugerem que os bufadienólídeos causam morte celular por apoptose e efeitos genotóxicos direcionados a células tumorais.

A ativação da apoptose ocorre por duas vias gerais: via extrínseca e intrínseca (**Figura 5**). Quando a via intrínseca é ativada, o primeiro passo é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida da liberação de proteínas que normalmente estavam 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 (*Apoptoticpeptidase 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, uma DNase 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 e a laminina, o que determina a diminuição do núcleo e a picnose (KUMAR et al., 2004; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A via de receptor de morte ou via extrínseca (**Figura 5**) 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 procaspase-8 e forma caspase-8 (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; KRYSKO et al., 2008).

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 (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Após um estímulo de morte, a proteína Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir os sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa 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 protéicas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) que regulam a permeabilidade mitocondrial (HENGARTNER, 2000).

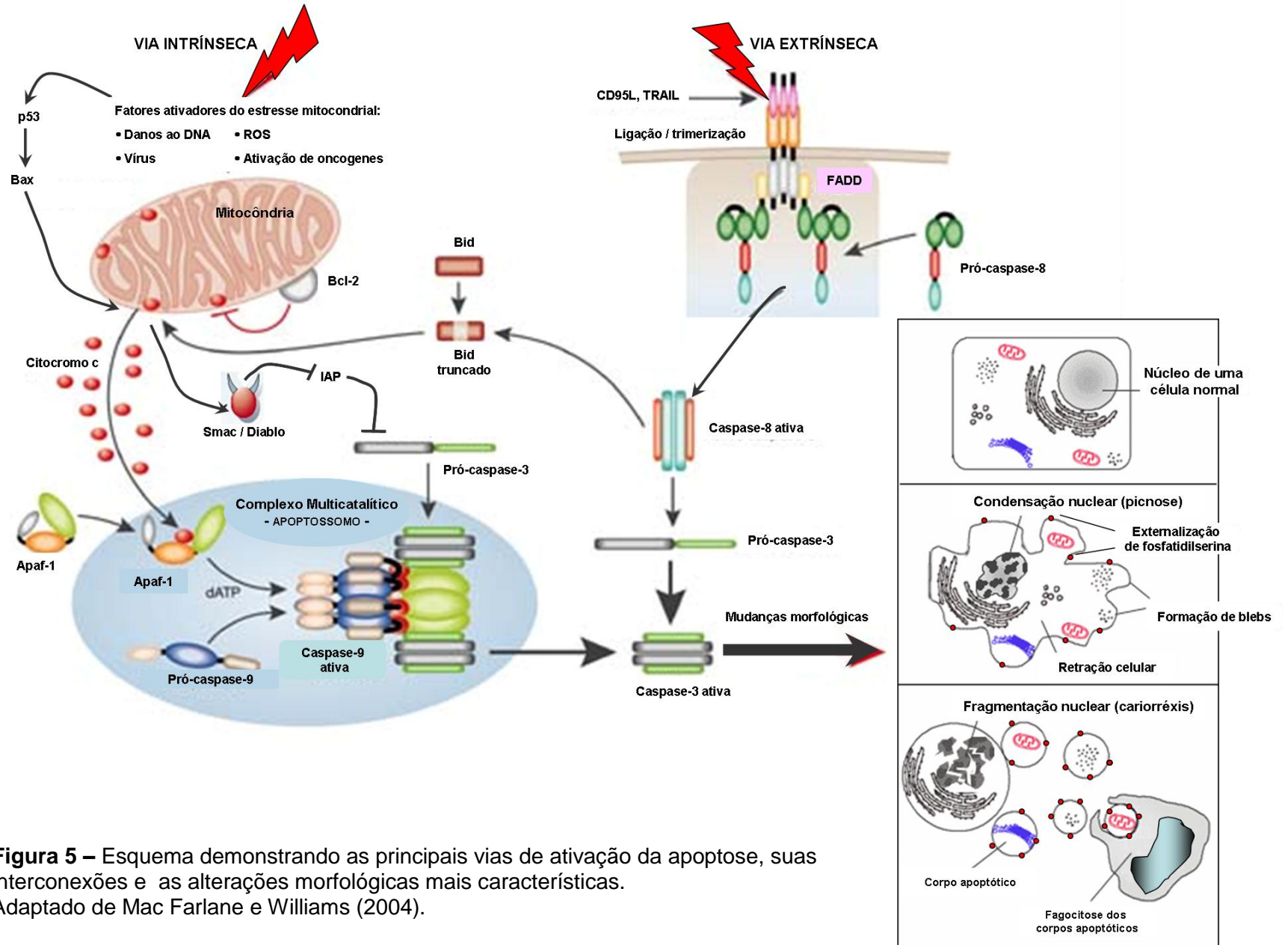


Figura 5 – Esquema demonstrando as principais vias de ativação da apoptose, suas interconexões e as alterações morfológicas mais características. Adaptado de Mac Farlane e Williams (2004).

Hashimoto e colaboradores (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 inúmeras drogas antitumorais. A inibição da Topo II promove a fragmentação do DNA, um atributo importante para apoptose das células tumorais (HASHIMOTO et al., 1997).

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a cinobufacina e os seus compostos ativos (por exemplo, bufalina e cinobufagina) exibem significativa atividade antitumoral, incluindo a inibição da proliferação celular, indução da diferenciação celular e da apoptose, a interrupção do ciclo celular, inibição da angiogênese, reversão da resistência a multidrogas e ainda interfere na regulação da resposta imune (ZHU; LIU, 2006). Em um estudo pré-clínico, camundongos *nude* transplantados com carcinoma hepatocelular humano e tratados com cinobufacina em associação com o trióxido de arsênio revelou efeitos sinérgicos que reduziram o crescimento do carcinoma, o número de vasos sanguíneos (efeito anti-angiogênico) e a expressão de receptores dos fatores de crescimento endotelial vascular e epidérmico (LIU; CHEN; QIN, 2011).

Dados clínicos mostram que cinobufacina utilizada sozinha ou em combinação com outros agentes quimioterápicos (por exemplo, gemcitabina e oxaliplatina) têm atividade antitumoral contra diversos tipos de cânceres humanos, tais como carcinoma hepatocelular avançado, de pulmão, de pâncreas e carcinoma da vesícula biliar (CHEN et al., 2003; QUIN et al., 2008; MENG et al., 2009), onde observou-se taxa de crescimento tumoral reduzida, melhora na qualidade de vida e aumento do tempo de sobrevivência (NESHER et al., 2007). No caso de tumores de fígado, o acompanhamento dos níveis de alfa fetoproteína (AFP) revelou níveis mais altos no grupo controle do que no grupo tratado com cinobufacina (CHEN et al., 2003). Essa proteína é normalmente formada por células hepáticas imaturas no feto. Ao nascimento, as crianças têm níveis relativamente altos desta proteína, que caem para níveis normais do adulto (inferior a 10 ng/mL) no primeiro ano de vida. Em adultos, níveis elevados (superior a 500 ng/mL) são vistos em casos de carcinoma hepatocelular, tumores das células germinativas (testículos e ovários) e metástases hepáticas. Assim, dosagem dessa proteína é o mais difundido marcador tumoral empregado para rastreamento e seguimento do carcinoma hepatocelular. Níveis elevados da AFP é fator de pior prognóstico em relação à agressividade da doença estando assim atrelada a tumores de diâmetros maiores e invasão vascular. O valor

sérico de corte associado à piora do prognóstico é de 200 ng/mL (ATAÍDE et al., 2011).

Outro uso potencial de bufadienólídeos no tratamento do câncer é o combate indireto da caquexia, uma patologia atentada pela excessiva produção da interleucina – 6 (IL 6) e que atinge pacientes com câncer, causando uma redução da resposta corporal, podendo levar à morte (ENOMOTO et al., 2004). Em estudo recente, Nasu e colaboradores (2005) propuseram a utilização de bufalina como um agente terapêutico no tratamento da endometriose, uma doença que provoca a proliferação exacerbada do tecido endometrial. A bufalina é capaz de produzir apoptose nas células desse tecido de forma célula-específica, em um mecanismo distinto do que acontece com a ação apoptótico de diversas células tumorais. Dessa maneira, o bufadienólídeo pode representar um candidato específico no tratamento da endometriose. A bufalina ainda exerce um efeito inibitório de células endoteliais da aorta em bovinos o que pode evitar a formação de redes de irrigação sanguínea que nutrem inúmeros tumores (LEE et al., 1997).

Uma vez que esteróides cardiotônicos de duas classes químicas, os cardenólídeos (ouabaína, por exemplo) e os bufadienólídeos se ligam especificamente às subunidades da Na^+/K^+ -ATPase (NEWMAN et al., 2008; GAO et al., 2011), acredita-se que a ativação do processo apoptótico pelos bufadienólídeos esteja associada à inibição dessa bomba.

Os cardiotônicos são esteróides que compõem uma classe de compostos que se distinguem por interagir com a principal proteína transportadora das células eucariotas, a bomba de sódio (Na^+/K^+ -ATPase). Estas bombas são proteínas enzimáticas de membrana plasmática pertencentes à família das ATPases do tipo P e conservadas em invertebrados, vertebrados e protozoários (BRAGROV; SHAPIRO; FEDEROVA, 2009). A bomba trabalha como um transportador eletrogênico de íons Na^+ e K^+ entre os meios extracelular e intracelular, conservando o potencial de membrana das células, fundamentais para o funcionamento celular. Determinada funções da enzima são: manutenção e restauração do potencial de repouso de membrana em células excitáveis, transporte de nutrientes e aminoácidos acoplados ao Na^+ , balanço osmótico e regulação do volume celular. Em insuficiência cardíaca, glicosídeos cardiotônicos são recomendados e o mecanismo terapêutico desses esteróides consiste na interação dos esteróides cardiotônicos com Na^+/K^+ -ATPase provoca o aumento na concentração de íons sódio ($[\text{Na}^+]$) intracelular. Este

aumento no sódio causa a formação de um de íons cálcio ($[Ca^{+}]$) intracelular secundário, via troca de Na^{+}/Ca^{+} , no retículo sarcoplasmático. O acréscimo resultante de absorção de $[Ca^{+}]$ pelo retículo sarcoplasmático provoca o aumento da força de contração do miocárdio, aliviando os sintomas das cardiopatias (WASSERSTROM; AIRPRUT, 2005).

Espera-se que esteróides do tipo digitálicos podem desempenhar papel hormonal como moduladores do sistema nervoso e cardiovascular ou estão envolvidos com quadros fisiológicos da hipertensão. Níveis elevados de marinobufalina foram detectados em estados de hipertensão, doenças cardíacas e em pacientes com falha renal (KENNEDY, 2005). Por outro lado, a resibufagenina é conhecida por diminuir hipertensão em modelos animais durante quadros de pré-eclâmpsia (VU, 2006). Estudos mostram que a marinobufagina também pode estar relacionada com a dependência ao etanol, pois os bufadienólídeos atenuou a busca pelo álcool via interação com Na^{+}/K^{+} -ATPase no córtex cerebral de modelos animais (KASHKIN et al., 2002).

Além da citotoxicidade para células tumorais e imunológicas os bufadienolídeos e seus derivados já foram analisados quanto aos estudos de relações-atividade para as atividades anestésicas, cardiotônicas, inseticida e inibitória da enzima Na^{+}/K^{+} -ATPase. Neste campo novos horizontes podem ser obtidos quanto ao emprego de bufadienólídeos como fármaco, ou melhor, quanto ao emprego deste para o desenho de análogos que possuam requerimentos estruturais que os habilitem como fármaco (MANUNTA et al., 2001).

4.5 Prospecção Biotecnológica

A prospecção tecnológica pode ser definida como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (CARUSO; TIGRE, 2004). Essa prospecção deve ser desmistificada, tornando-se uma ferramenta rotineira e influenciando nos processos de tomada de decisão, podendo facilitar a apropriação com qualidade da Propriedade Intelectual (PI) e melhorar a gestão da inovação ao aumentar o senso crítico e ampliar a visão dos gargalos tecnológicos e das oportunidades a eles associadas em cada aspecto técnico de energia e de preservação do ambiente, além de outras áreas (QUINTELLA et al., 2011). Dentro do contexto das plantas medicinais, esse instrumento permite direcionar a pesquisa de acordo com que já foi produzido e formar parcerias ou cooperações que possam alavancar a inovação, determinadas pelas necessidades das instituições públicas, privadas e órgãos governamentais (SIMÕES et al., 2012). Diante disso, essa parte do trabalho teve como objetivo realizar uma prospecção tecnológica em bases de dados nacionais e internacionais sobre o depósito de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia relacionados às atividades biológicas dos bufadienolídeos.

Avaliou-se o número de patentes cadastradas nas bases de dados usando os termos Bufadienolideos ou *bufadienolides* e Câncer ou *câncer* e também a associação desses dois termos (Bufadienolideos e câncer ou *Bufadienolides and câncer*) (**Tabela 3**). Na base de dados do INPI não foram verificados patentes referentes ao termo *bufadienolideos* nos campos de título e resumo. Utilizando o termo Câncer foram encontrados 2.107 patentes. Porém, após a associação dos termos nenhuma patente foi encontrada. Na base EPO o termo *bufadienolides* identificou 27 patentes. Aplicando o termo *cancer*, 100.000 patentes foram encontradas. Por outro lado, na busca por estes termos confrontados (*bufadienolides and cancer*) apenas 1 patente foi detectada. Na base de dados USPTO utilizando o termo *bufadienolides* foi encontrada apenas 1 patente; *cancer* 26.309 patentes foram detectadas, porém quando associados ambos os termos nenhuma patente foi encontrada. Na base de dados mundial WIPO 25 patentes relacionadas ao termo *bufadienolides* foram encontradas; com o termo *cancer*,

136.805 patentes; quando confrontados os termos *bufadienolides and cancer* foi encontrada apenas 1 patente.

As pesquisas científicas e os produtos gerados a partir dos recursos naturais merecem maior atenção no que se refere à proteção desse conhecimento, não só pelos recursos financeiros, humanos e tempo investido, mas também pela exploração econômica realizada para estes produtos e o retorno deste capital para novas pesquisas (MOREIRA et al, 2004). Para melhor exploração destes produtos a proteção pela propriedade intelectual é um recurso ainda pouco utilizado pelo meio acadêmico, entre estes recursos a proteção por meio de patentes vem sendo difundida a fim de proteger o detentor de um produto ou processo gerado (PEREIRA et al., 2013). Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgado pelo Estado aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Em contrapartida, o inventor se obriga a revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente (INPI, 2014). Os produtos naturais movimentam anualmente bilhões de dólares, sem incluir a economia informal da utilização popular de plantas medicinais nos países em desenvolvimento. O crescimento deste setor vem estimulando pesquisadores e indústrias farmacêuticas internacionais a investir nas pesquisas e patenteamento de novos produtos (SANT'ANA, 2002).

Tabela 3-Total de depósitos de patentes pesquisadas nas bases do INPI, EPO, USPTO e WIPO.

Palavra-chave	INPI	EPO	USPTO	WIPO
Bufadienolideos ou <i>bufadienolides</i>	0	27	1	25
Câncer ou <i>cancer</i>	2.107	100.000	26.309	136.805
Bufadienolideos e câncer ou <i>Bufadienolides and cancer</i>	0	1	0	1
Total	2.107	100.028	26.310	136.831

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; EPO: *European Property Organization*; USPTO: *United States Patent and Trademark Office* e WIPO: *World Intellectual Property Organization*.

As primeiras patentes com o termo Bufadienólídeos ou *bufadienolides* (3 no total) foram registradas no ano de 1964. A figura 6 descreve o acompanhamento do depósito de patentes a partir de 1964, verificando-se que um pico de depósitos na década de 1970 (24 no total). A partir do ano 2000, 16 novas foram depositadas.

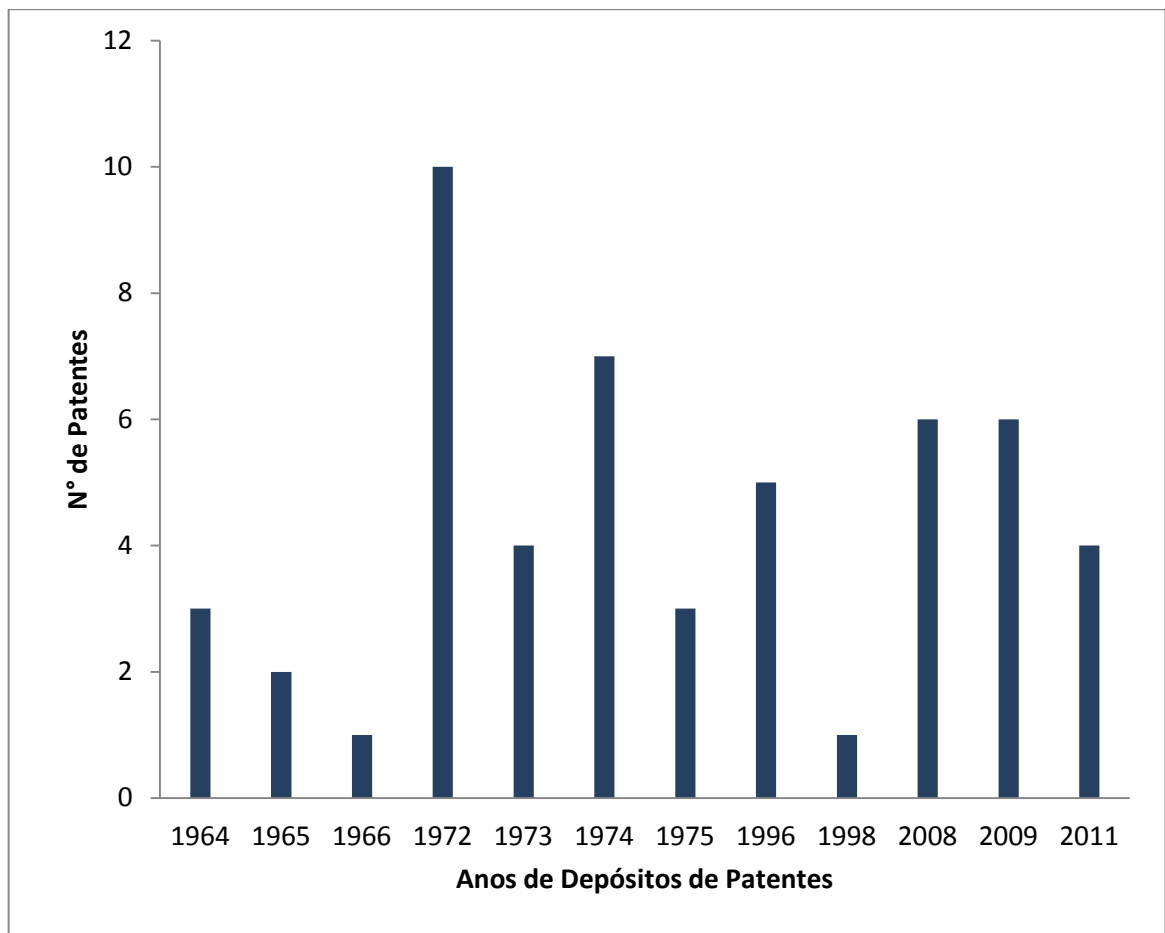


Figura 6 - Depósitos de patentes no período de 1964 a 2011, considerando as bases WIPO: *World Intellectual Property Organization*; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; EPO: *European Property Organization* e USPTO: *United States Patent and Trademark Office*.

Na análise das patentes o país que mais apresentou pedidos de depósitos para o termo Bufadienólídeos ou *bufadienolides* foi os Estados Unidos (18 patentes, 38,3% do total), seguido pelo Canadá (13 patentes, 27,7%) (**Figura 7**). Ironicamente, o Brasil não possui nenhuma proteção tecnológica registrada nas bases de dados pesquisadas. Esse achado é contraditório, pois o Brasil tem uma área de 8,5

milhões km² e possui várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido no Norte, o semiárido no Nordeste e áreas temperadas no Sul. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas). Segundo Kato (2001), o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta, muitas das quais sendo endêmicas. Assim, o Brasil possui baixa concorrência e apresenta pouco esforço em inovar na área de invenções tecnológicas, provavelmente devido à alguma falha do sistema de inovação (articulação competente entre governo, empresas e instituições, capaz de promover um sistema de Produção & Desenvolvimento de Medicamentos - P & D).

O fato do Brasil não possuir nenhuma proteção por meio de patentes que envolvam bufadienólídeos não condiz com a grande produção brasileira de artigos científicos que relatam sobre a identificação, isolamento e avaliação das propriedades farmacológicas e toxicológicas de compostos isolados da secreção glandular dos sapos e como bem relatado durante todo esse trabalho, sugerindo que não há incentivo nas pesquisas para o desenvolvimento de invenções envolvendo os bufadienólídeos. Além disso, a produção científica no Brasil caracteriza-se por ser recente (últimos 100 anos), e tem uma grande concentração institucional nas universidades públicas e centros de pesquisa e, com honrosas exceções, em instituições privadas, como consequência das políticas públicas em Ciência e Educação no país (SPEZIALI; GUIMARÃES; SINISTERRA, 2012). Esse é, certamente, ainda um dos grandes desafios no sistema nacional de inovação brasileiro para a transferência da tecnologia gerada nas Universidades e nos Centros de Pesquisa para a Indústria, de tal forma que sejam gerados novos processos e produtos, intensivos em conhecimento, oriundos dessas instituições.

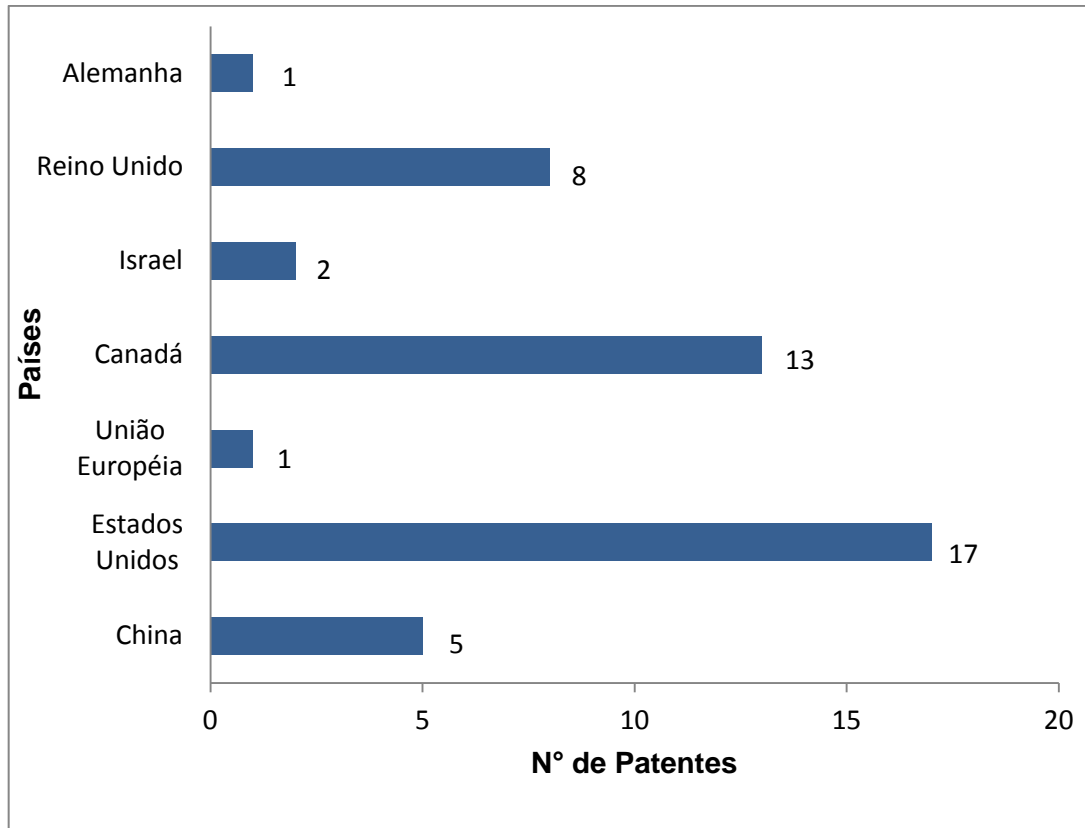


Figura 7 - Países que mais depositaram patentes envolvendo bufadienólídeos.

A Classificação Internacional de Patentes (CIP), na qual as patentes são classificadas de acordo com a aplicação, são divididas em oito (8) seções, 21 subseções, 120 classes, 628 subclasses e 69.000 grupos (SERAFINI et al., 2012). Assim, foram analisados os documentos conforme CIP (**Figura 8**) e observou-se que a seção A (necessidades humanas) é a mais depositada para ambos os termos, seguida pela A G (física) e pela C (química; metalurgia) no termo bufadienólídeos.

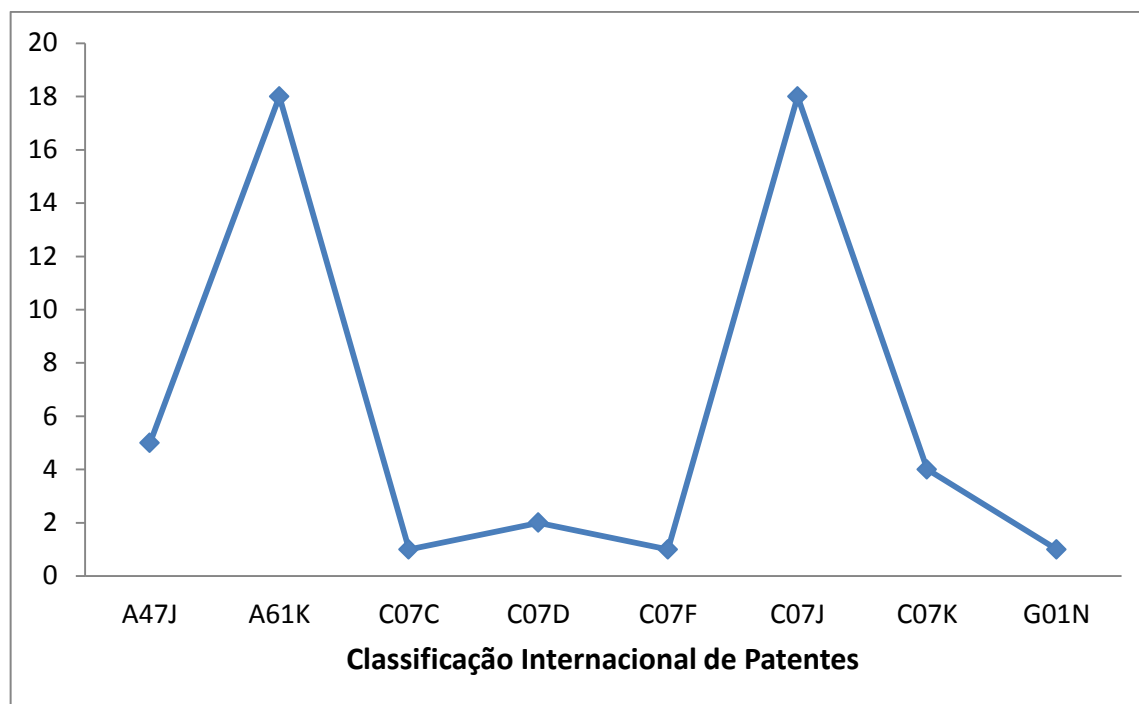


Figura 8 - Distribuição por Classificação Internacional de Patentes (CIP). A47J: Móveis ou aparelhos domésticos; Moinhos de café; Moinhos de especiaria; Aspiradores em geral; A61K: Preparações para finalidades Médicas, Odontológicas ou Higiênicas; C07C: Compostos Acíclicos ou Carbocíclicos; C07D: Compostos Heterocíclicos; C07F: Compostos Acíclicos, Carbocíclicos ou Heterocíclicos contendo outros elementos que não o carbono, o hidrogênio, o halogênio, o nitrogênio, o enxofre, o selênio ou o telúrio; C07J: esteróides e abrange os compostos contendo um esqueleto de ciclopenta[a]hidrofenantreno ou uma estrutura cíclica derivada do mesmo; C07K: Peptídeos; G01N: investigação ou análise dos materiais pela determinação de suas propriedades químicas ou físicas.

Na seção A61K que se refere a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas foram detectados 18 depósitos de pedidos de patentes em relação ao termo bufadienólídeos, comprovando que os bufadienólídeos vêm sendo estudados com a perspectiva de gerar produtos com potencial terapêutico. Na C07J, que se refere aos esteróides e abrange os compostos contendo um esqueleto de ciclopenta[a]hidrofenantreno ou uma estrutura cíclica derivada do mesmo, foi constatado para o termo bufadienólídeos 18 patentes nessa classe e na última seção analisada.

Quando associados os termos bufadienólídeos e câncer, apenas uma patente e de origem chinesa foi encontrada (*Use of bufadienolides compound and bufadienolides salinization compound in preparing medicine for treating gynecological tumor*– Patente N° 200910025008). Essa patente trata do uso de um composto da classe dos bufadienólídeos de um sal de bufadienólídeos para o

tratamento de tumores ginecológicos. Assim, testes com as linhagens humanas de câncer de ovário (A-2780, SKOV-3), de carcinoma cervical humano (SiHa) e carcinoma de endométrio (Shikawa) realizados *in vitro* com um extrato de bufadienolideo e compostos monoméricos isolados (cinobufagina, bufalina, bufotalina e gamabufotalina), bem como cloridratos ou sulfatos dos quatro compostos monoméricos, revelaram atividade citotóxica superior ao paclitaxel com e efeitos colaterais mais brandos (NANJING UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE, 2009). Esse pedido de depósito de patente é do ano 2009, mostrando que há pelo menos 4 anos não tem sido realizadas pesquisas inovadoras relacionadas com o tema. A classificação internacional de patentes é a A61K reafirmando que os bufadienolideos estão sendo estudados quanto sua ação biológica e a importância das substâncias ativas advindas de animais.

É importante enfatizar que a economia de um país, sendo essencialmente rural, torna-se duplamente favorável à utilização de seus recursos naturais, pois, ao mesmo tempo em que a região é propícia ao seu desenvolvimento (pela praticidade advinda do contato estreito com a terra) também se configura como uma alternativa de tratamento (ALVIM et al., 2006). Desta forma, o mercado atende de diferentes formas o consumidor (BRANDÃO et al., 1997), uma vez que o Brasil, possuidor de grande quantidade de espécies nativas, é um grande produtor de produtos naturais tanto para o consumo da população (consumo interno) quanto para fins de exportação (consumo externo), além da grande relevância para as pesquisas que incentivem a comprovação da eficácia terapêutica e recuperação da saúde (GALLOTE; RIBEIRO, 2005).

Em 2004 foi promulgada a Lei de Inovação Tecnológica Nº 10.973, e regulamentada em 2005 pelo Decreto Nº 5.563.11 Essa lei regula, entre outros assuntos, os estímulos para a participação de Instituições Científicas e Tecnológicas (ICT's) no processo de inovação, para a inovação nas empresas, para o inventor independente e para a criação de fundos de investimentos para a inovação. É a primeira lei brasileira que trata do relacionamento entre Universidades e/ou Instituições de Pesquisa com empresas e da criação dos Núcleos de Inovação Tecnológica (NIT's), trazendo como consequência o amadurecimento institucional dos mesmos com o intuito de fazer gestão estratégica da propriedade intelectual das ICT's brasileiras (BRASIL, 2014).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O câncer, a segunda causa de morte no mundo, é uma doença de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais imortalizadas, de diferentes tipos presentes em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo espalhar-se (metástase) para regiões distantes do organismo. Seu tratamento se baseia, principalmente no uso de quimioterápicos, a maioria dos quais tem origem de produtos naturais. Dentre as classes mais recentes de moléculas com potencial bioativo, os bufadienolídeos tem se destacado com elevada citotoxicidade e moderada especificidade contra células normais por ativação de vias intrínsecas e/ou extrínsecas de morte celular apoptótica. Esse potencial biológico se refletiu em 52 depósitos de patentes desde 1964, embora os bufadienolídeos com atividade antitumoral ainda mostrem baixa expressividade do ponto de vista de desenvolvimento de propriedade intelectual apesar do grande número de artigos disponíveis nas bases científicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGUAIA, M. **Reino Animalia Filo Chordata Classe Amphibia Ordens Caudata, Gymnophiona e Anura.** Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/biologia/anfibios.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásico Ciclo-Celular Específico e Ciclo-Celular não Específico que interagem com DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118-129, 2005.
- ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v.14, p.9-17, 2006.
- 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.
- ANDREW, W.; HICKMAN, C. P. Histology of the vertebrates: A comparative text. **Saint Louis : Mosby**, v.7, p.43, 1974.
- ATAIDE, E. C.; MACHADO, R. R.; RIBEIRO, M. B. C.; MATTOSINHO, T. J. A. P.; ROMANI, F.; ESCANHONELA, A.; FAZZIO, C. A.; BOIN, I. F. S. F. Correlação do nível de alfa-Feto proteína, índice de sobrevida e recidiva tumoral em pacientes submetidos a transplante hepático. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v.24, p.43-47, 2011.
- BALUNAS, M. J.; KINGNORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.
- BANCO INTERNACIONAL DE OBJETOS EDUCACIONAIS. **Ordem anura *Rhinella schneideri*.** Disponível em: <<http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/6742>>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEINº10.973, de 2 de dezembro de 2004. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil03/ato2004-2006/2004/lei/l10.973.htm>>. Acesso: 21 fev. 2014.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemical**, 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 NaC, KC-ATPase blocking, **Life Science**, v.72, p.699-709, 2002.

BOEUF, G. Marine biodiversity characteristics. **Comptes Rendus Biologies**, v.334, p.435-440, 2011.

BONASSA, E. M. A.; BLOCH, A.; THOMSON, C. A. Position of the American Dietetic Association: Enfermagem em terapêutica oncológica. 2. ed. **Atheneu**: Sao Paulo, 2000.

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.

BRANDAO, M. G. L. Programa de Educação Ambiental In: **Biodiversidade, População e Economia: Uma Região de Mata Atlântica**. Belo Horizonte: UFMG; CEDEPLAR; ECMVS, PADCT, CIAMB, 1997.

BROGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDEROVA, O. V. Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology targets. **Pharmacological Reviews**, v.61, p.9-38, 2009.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141-153, 2004.

BLUNT, J.W.; COPP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOLE, P.T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v.28, p.196-268, 2011.

CAPON, J. R. European journal of organic chemistry, Marine Biospecting-Trawling for treasure and pleasure. **Journal of Organic Chemistry**, v.2001, p.633-645, 2001.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends in Cell Biology**, v.5, p.229-237, 2003.

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

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, Z.; ZHAI, X. F.; SU, Y. H.; WAN, X. YL. I. J.; XIE, J. M.; Zhong, Xi.; Yi, Jie.; He, Xue. Bao Clinical observation of cinobufacini injection used to treat moderate and advanced primary liver cancer. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v.1, p.184-6, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829-837, 2004.

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.

CONLON, J.M.; KOLODZLEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1696, p.1–14, 2004.

COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells in Vitro. **Toxicology**, v.22, p.854-863, 2008.

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.; ANN. BRAZ. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.33-43, 2005.

CRAMPTON, S. L.; ADAMS, E. G.; KUENTZEIL, S. L.; Li, L. H.; BADINER, G.; BHUYAN, B. K. Biochemical and Cellular Effects of Didemnins A and B. **Cancer Research**, v.44, p.1796-1801, 1984.

CRUZ, J. S.; MATSUDA, H. E. J. **Pharmacol**, v.2939, p.223, 1993

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 secretion of toad *Bufo rubescens*. **Toxicon**, v.45, p.777-782, 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.

CUNHA-FILHO, G. S. A. **Bufadienolídeos da secreção cutânea de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae)- Isolamento caracterização das atividades biológicas**. 2010. 8 f. (Tese Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília. 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.

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

DUELLMAN, 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.

EDWARDS, D. J. et al. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chemical Biology**, v.11, p.817-833, 2004.

EISENHAUER, E. A.; VERMORKEN, J. B. Pharmacology and therapeutic potential. Drug. **The taxoids: comparative clinical**, v.55, p.5-30, 1998.

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

ELKAN, E. Mucopolysaccharides in the anuran defence against desiccation. **Journal Zoology London**, v.155, p.9-53, 1968

EMOTO, A.; RHO, M. C.; FUKAMI, A.; HIRAKU, O.; KOMIYAMA, K.; HAYASHI, M. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.323, p.1096, 1997.

ERBA, E.; SERAFINI, M.; GAIPA, G.; TOGNON, G.; MARCHINI, S.; CELLI, N.; ROTILIO, D.; BROGGINI, M.; JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; BIONDI, A.; D'INCALCI, M.; Effect of Aplidin in acute lymphoblastic leukaemia cells. **British Journal of Cancer**, v.89, p.763-773, 2003

ESSERS, J.; VERMEULEN, W.; HOUTSMULLER, A. B. DNA damage repair: anytime, anywhere? **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, p.240-246, 2006.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Cell junctions in amphibian skin. **The Journal of Cell Biology**, v.26, p.263-291, 1965.

FERRARI, C.; HERZBERG, V. **Tenho cancer e agora? Enfrentado o cancer sem medos ou fantasias**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Oncologia Clinica, 1998.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F., VIANA, M. P., SOUZA, T. M., VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O.;

CARVALHO, A. F. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, p. 1045–1058, 2011.

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

FROST, D. Amphibian species of the world, an on line reference. Version 5.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <http://reaserach.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. Acessado em: 23 set de 2013.

FROST, D. et al. Amphibian Tree of Life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.297, p.1-370, 2006.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do horto da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, Santa Teresa, ES. **Natureza On Line**, v.3, p.19-24, 2005.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 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, 1997.

HAY, M.E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**, v.9, p.10, 1996.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HICKMAN JÚNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 11ª ed. 2009.

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.2265-70, 2007.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Perguntas e respostas sobre radioterapia. Disponível em:http://www.inca.gov.br/cancer/PDF/perguntas_rx.pdf. Acesso em: 12 dez. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (INPI). Guia Básico – Patentes. Disponível em:http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_basico_patentes. Acesso em: 21 fev. 2014.

ISMAEL, G. F. V.; SEGALLA, J. G. M.; ROSA, D. D. O desenvolvimento de drogas com alvo molecular e o seu impacto no tratamento do cancer. **Revista de Prática Hospitalar**, v.9, p.54, 2007.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDÃO, A. E. C.; SILVA, J. R. M. C.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M. T. Parotid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defense. **Toxicon**, v.54, p.197-207, 2009.

JIN, S.; GORFAJN, B.; FAIRCLOTH, G.; SCOTTO, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.67-75, 2000.

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. **J. 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.

KANZAKI, A.; TAKEBAYASHI, Y.; REN, X. Q.; MIYASHITA, H.; MORI, S.; AKIYAMA, S.; POMMIER, Y. Overcoming multidrug drug resistance in P-glycoprotein/MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.1, p.1327, 2002.

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 Neuropharmacology**, v.12, p. 217-223, 2002.

KATO, M.J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v.57, p.621-623, 2001.

KATZUNG, G. B. Basic and Clinical Pharmacology. **USA: McGraw-Hill Medical**, v.67, p.1088, 2003.

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

KESKIN, O.; I. BAHAR, R. L .; JERNIGAN.; T. G. MYERS, J. A.; BEUTLER, R. H. SHOEMAKER.; E. A. SAUSVILLE, D. G. COVELL. Characterization of anticancer agents by their growth inhibitory activity and relationships to mechanism of action and structure. **Anti-Cancer Drug Desing**, v.15, p.79-98, 2000.

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.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS & COTRAN. **Pathology Basis of Disease**, 7a. ed, **WB Saunders**: China, 2004.

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

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

LIGA PORTUGUESA CONTRA O CANCRO. **Métodos de tratamento contra o cancro**. Disponível em:<<http://www.Ligcontracancro.pt/ga/index.php?id=175>>. Acesso em: 12 out. 2013.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C.; LIU. L.; CHEN, B.; QIN, SK.; YI, ZH. X.; ZHI ,J. H. Z. The microenvironment of the tumourhost interfaceAnti-angiogenesis effect of arsenic trioxide plus cinobufacin on human hepatocarcinoma transplantation model nude mice, v. 31, p. 67-72, 2011.

MANUTA, P; HAMILTON, B. P HAMYLN, J. M. Endogenous ouabain in renal Na⁺ handling and related diseases. **Hypertension**, v.37, p.472, 2001.

MAUGERI-SACCA M, VIGNERI, P.; DE MARIA R. Cancer stem cells and chemo sensitivity. **Clinical Cancer Research**, v.17, p.4942-4947, 2011.

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 fufu chansu in patients with hepatocellular carcinoma, non-small-cell lung cancer, or pancreatic cancer. **Cancer**, v.115, p.5309–5318, 2009.

MOREIRA, A.C.; ANTUNES, A.M. de S.; PEREIRA JUNIOR, N. Patentes, extratos de plantas e derivados. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ed. 3, jul /dez, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for Cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MUSCARILIN, E.; TIERNEY, D. K.; STADTMAUER, E. A. Autologous bone marrow transplantation: a review of the principles and complications. **Cancer Nursing**, v.3, p. 204-13, 1993.

NANJING UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE. Duan Jinao, Ma Hongyue, Tang Yuping, Zhou Jing. Use of bufadienolides compound and bufadienolides salinization compound in preparing medicine for treating gynecological tumor. CN PI n. 200910025008, 16 fev. 2009, 09 jul. 2009.

NASU, K.; NISHIDA, M.; UEDO, T.; TAKAI, N.; NARAHARA, H.; MIYAKADA, I. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. **Molecular Human Genetics**, v.11, p.817, 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.2093–107, 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 Intervention**, v.8, p.36–49, 2008.

NOAWA, 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.

NUNES, J. D. S.; OLIVEIRA, L. G. D.; **Universidades Brasileiras – Utilização do Sistema de Patentes de 2000 a 2004**, Instituto Nacional da Propriedade Industrial: Rio de Janeiro, 2007.

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

OKADA H, MAK. T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.592-603, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Estimativas do Câncer para 2014**. Acessado 29 jan de 2014.

PEREIRA, S. A.; ALVES, H.P.; SOUSA, C.M.; COSTA, G. L. S. PROSPECÇÃO SOBRE O CONHECIMENTO DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS – inajá (*Maximiliana maripa Aublt.*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba Mart.*). **Revista GEINTEC**, v.3, p.110-122, 2013.

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

EISENHAUER, E. A.; VERMORKEN, J. B. The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs Review**, v. 55, p. 5-30, 1998.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Nature Products**, v.21, p.519–538, 2004.

POMMIER, Y.; KOHLHAGEN, G.; BAILLY, C.; WARING, M.; MAZUMDER, A.; KOHN, K. W.; DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate Ecteinascidia Turbinata. **Biochemistry**, v.35, p.13303-13309, 1996.

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.

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

PUKALA, T. L.; BERTOZZI, T.; DONNELLAN, S. C.; BROWIE, J. H.; SURINYAJOHNSON, K. H.; LIU, Y.; JACKWAY, R. J.; DOYLE, J. R.; LLEWELLYN, L. E.; TYLER, M. J. Host-defence peptide profiles of the skin secretions of

interspecific hybrid tree frogs and their parents, female *Litoria splendida* and male *Litoria caerulea*. **FEBS Journal**, v. 273, p.3511-3519, 2006.

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 Gastroenterol**, v.14, p.5210–6, 2008.

RASH, L. D.; MORALES, R. A. V.; VINK, S.; ALEWOOD, P. F. De novo sequencing of peptides from parotoid secretion of the cane toad, *Bufo marinus* (*Rhinella marina*). **Toxicon**, v.57, p.208-216, 2010.

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

RIBEIRO, L. R. SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003. 356 p.

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

RINEHART, K. L.; GLOER, J. B.; COOK, J. C.; J. Am. Estrucures of the didemnis, antiviral and antitumor depsipeptides from Caribbean. **Chemical Society**, v.103, 1857-1859, 1981

ROBERTS, C.M. Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. **Science**, v.295, p.1280-1284, 2002.

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.

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 Medicinai**s, v.15, p.442-458, 2013.

SCHEINBERG, G. Câncer: as novas frentes de ataque. **Revista Galileu**, v.120, p.41-52, 2010.

Schoner, W.; Scheiner-Bobis, G.: glicosídeos cardíacos Endógenos: hormonas, utilizando a bomba de sódio como transdutor de sinal, v. 25, p.343-351, 2005.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v.277, p.665-667, 1979.

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, 2012.

SIMÕES, E. R. B; MARQUES, L. G. A; PINHEIRO, B. M; SANTOS, M. R. C; PESSOA, C. Technological Forecasting on Phytotherapics Development in Brazil. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.67, p.186-187, 2012.

SPEZIALI, M. G; GUIMARÃES, P. P. G; SINISTERRA, R. D. DESMISTIFICANDO A PROTEÇÃO POR PATENTES NAS UNIVERSIDADES, **Química Nova**, v.35, p.1700-1705, 2012.

SERAFINI, M. R.; QUINTANS, J. DE S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; DOS SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. **Revista GEINTEC**, v.2, p.427-435, 2012.

SHAH, J. J. & ORLOWSKI, R. Z. Spotlight review series on multiple myeloma. **Leukemia**, v.23, p.1964, 2009.

SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; BARRA, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? **Biopolymers**, v.47, p.435–450, 1998.

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.

AMES, B. N.; GOLD, L. S, Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer **Science**, v.221, p.1256, 1983.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONCALVES, R. S. B.; 49 LIMA, C. H. C. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Revista Fitos**, v.3, p.25-41, 2007.

STEIN, A. T, ZELMANOWICZ, A. M, ZERWES, F.P, BIAZUS, J. V. N, LÁZARO. L, FRANCO, L. R. Rastreamento do câncer de mama: recomenda coes baseada sem evidências. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v.53, p.438-446, 2009.

STOCK PHOTO. **Ringed Caecilian (Siphonops annulatus) on forest floor, Amazon Rainforest, Ecuador**. Disponível em: <<http://www.superstock.com/stock-photos-images/4201-33166>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

SU. J.;XU. ZJ.;YE. MS BAO, XI.; YU FEN.; Zi MIAN.; YI XUE.; ZA ZHI. An

experimental study of bladder cancer cell apoptosis induced by cinobufacin. **Article in Chinese**, v.25, p.351-3, 2009.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettamann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. **Academic Press**, v.80, 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 macroglând secretion. **Toxicon**, v.52, p.13–21, 2008.

TERNESS, P; NAVOLON, D; DUFFER, C; KOPP, B; OPERLZ, G. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater **International immunopharmar**, v.1, p.119, 2003.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Estudo histológico das macroglândulas lombares de *Pleurodema thaul* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.49, p.421-428, 1989.

ULVATNE, H. Antimicrobial Peptides: Potential Use in Skin Infections. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.4, p.591-595, 2003.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTA O CÂNCER (ICC) – Dia Mundial do Câncer 2014. Acessado em: 09. fev. 2014.

VERA, M. D.; JOULLIÉ, M. M. Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. **Medicinal Research Version**, v.22, p.102-145, 2002.

VEZZONI. L, PARMIANI. G. **Limitations of the cancer stem cell theory**. Cytotechnology 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10616-0089166-8>>.Acessado em: 13 dez. 2013.

VU, H; IANOSI-IRIMIE, M; DANCHUK, S; RABON, E; NOGAWA, T; KAMANO. O; PETTIT, G. R; WIESE, T; PUSCHETE, J. B. **Experimental Biology and Medicine**. 2006.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer).Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 30 jan. 2014.

WASSETROM, J. A.; AIPRUT, G. L. AM. J. **Heart and Circulatory Physiology**, v.289, p.1782, 2005.

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.

ZELNIK, R. A natureza Química do Veneno do Sapo. **Ciência e Cultura**, v.17, p.10-14, 1965.

ZHANG, J. T. What's the relative risk? A method of correcting the odds ratio in cohort studies of common outcomes. **Therapie**, v.57, p.2137, 2002.

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

ZIEGLER U, GROSCURTH, P. Morphological features of Cell Death. **News Physiological Sciences**, v.19, p.24-128, 2004.

ZORNIG M, HUEBER.A, BAUM.W, EVAN. G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimical Biophysica Acta**, v.1551, p.1-37, 2001