



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA

**INDICAN, ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS
DE *Indigofera suffruticosa* SOBRE LINHAGENS
CELULARES NEOPLÁSICAS**

JULIANA BARROS MARANHÃO

RECIFE, 2008

JULIANA BARROS MARANHÃO

**INDICAN, ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS DE *Indigofera suffruticosa*
SOBRE LINHAGENS CELULARES NEOPLÁSICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Geral- Área de concentração – Patologia Geral.

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Sônia Pereira Leite

RECIFE, 2008

Maranhão, Juliana Barros

Indican, índigo e indirubina de folhas de
indigofera suffruticosa sobre linhagens
celulares neoplásicas / Juliana Barros
Machado. – Recife : O Autor, 2009.

55 folhas. Il: fig., graf e tab.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.**

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Patologia. 2. Carcinoma de Ehrlich. 3.
Sarcoma 180. 4. Indigofera suffruticosa. I. Título.**

616-006.6
616.994

CDU (2. ed)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: JULIANA BARROS MARANHÃO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

NOME DA DISSERTAÇÃO: "Indican, índigo e indirubina de folhas de
Indigofera suffruticosa sobre linhagens celulares neoplásicas"

ORIENTADORA: Profa. Dr^a . Sônia Pereira Leite

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM PATOLOGIA GERAL

DATA: 26/06/2008

BANCA EXAMINADORA:

1-Profº Drº Roberto José Vieira de Mello

2- Profº Drº Haroudo Sátiro Xavier

3- Profª Drª Liriane Baratella Evêncio

“Pedras no caminho?

Apanho todas...

Um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

Eu pedi Força e Deus me deu
Dificuldades para me fazer forte.

Eu pedi Sabedoria... e Deus me deu
Problemas para resolver.

Eu pedi Prosperidade... e Deus me deu
Cérebro e Músculos para trabalhar.

Eu pedi Coragem... e Deus me deu Perigo
para superar.

Eu pedi Amor... e Deus me deu pessoas
com Problemas para ajudar.

Eu pedi Favores... e Deus me deu
Oportunidades.

Eu não recebi nada do que pedi...
Mas “eu recebi tudo de que precisava”.

A lição da Borboleta – Autor Desconhecido

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maria Auxiliadora, meu existir, minha base, minha formação intelectual e como ser humano, olhando o próximo como irmão e não me omitindo diante da necessidade e da dor do outro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, Ser supremo, Criador de tudo e de todos, Pai incondicional, a oportunidade de viver, aprender, ensinar, errar e poder corrigir, de amar e ser amada.

A Nossa Senhora, por sempre passar em minha frente me iluminando e me protegendo.

A minha querida orientadora professora Dra. Sônia Pereira Leite, a quem admiro, meu eterno agradecimento, pela amizade, pela acolhida, pelos ensinamentos, pelas cobranças, sendo ela muito importante em meu início de formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aqui as pessoas que permitiram a realização de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, Ivan e Auxiliadora, minha formação como ser humano;

A Narcisa pelo amor materno, participando com meus pais em minha formação;

A meu irmão Tiago, pelo amor fraterno;

A minha família, a tia Suzana e tio Riverdes e a minha avó materna, Josefa, por todo amor e orações pela minha proteção sempre;

Ao meu namorado, José Falcão “Pedrosa”, todo amor, carinho, respeito, estímulo, paciência e compreensão.

Aos amigos e amigas, Alan Lins, Ana Carolina Leite, Camila Cocentino, Cecília Melo, Luiz Henrique Pacheco, Mirella Melo, Rebeka Moraes, Silvia Crasto, Tatiana Paes, Magda Maranhão (amiga e prima) e Mário Wanderley, irmãos e irmãs que Deus me permitiu escolher e seus pais (“tios e tias”) pelo incentivo, por acreditar que eu seja muito mais do que sou.

Aos meus colegas de plantão pelas trocas em cima da hora para que eu assistisse às aulas.

Aos professores Dr. Haroudo Xavier do Departamento de Farmácia da UFPE e Dra. Ivone Souza do Departamento de Antibióticos da UFPE pelo suporte e colaboração em minha pesquisa.

Aos meus professores de graduação pela qualidade de formação, pelo incentivo, os quais me espelham em seguir seus passos.

Aos meus pacientes, em especial, as crianças da Pediatria do Hospital do Câncer, pela lição de vida, pela coragem, confiança e carinho. Por me mostrar a real importância da vida.

A Jeymesson Viera, André Aires, Izabela Lima, Emanuela Paz e Roberta Leite pelo apoio técnico, pela amizade e carinho durante toda minha pesquisa.

Ao Departamento de Histologia de UFPE onde foi desenvolvido esse trabalho.

RESUMO

Índigo e Indirubina são derivados da oxidação e dimerização do indoxil e isatan e liberados pelo composto precursor, Indican ou Isatan B. A Indirubina inibe a síntese de DNA de algumas linhagens celulares. Este trabalho experimental foi desenvolvido para avaliar os efeitos dos compostos químicos identificados e isolados de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre as linhagens celulares neoplásicas (Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich). O material utilizado foi obtido a partir screening fitoquímico onde foram evidenciados através de protocolos extrativos de identificação e isolamento de constituintes ativos de folhas *I. suffruticosa*. O protocolo do ensaio biológico foi realizado utilizando 8 grupos de 6 camundongos para implantação dos tumores e a quimioterapia foi realizada com indican, índigo e indirubina. No oitavo dia, os animais foram pesados, eutanaziados, seus tumores retirados e os pesos corporais e tumorais foram analisados. Os compostos químicos identificados e isolados foram: indican, indigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa*. O indican e o índigo não reduziram significativamente o peso corporal dos animais, no entanto, a indirubina reduziu significativamente o peso corporal dos animais portadores de Sarcoma 180. O índigo e a indirubina não reduziu significativamente o peso corporal dos animais portadores do Carcinoma de Ehrlich. O indican não reduziu significativamente o peso do tumor Sarcoma 180 na dose de 25mg/Kg por via i.p. O índigo e a indirubina de folhas de *I. suffruticosa* na concentração de 25µg/Kg sobre as linhagens celulares (Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich) não reduziram significativamente o crescimento dos tumores. Esse estudo *in vitro* sugere investigação dos indigóides derivados das folhas de *I. suffruticosa*.

Palavras-chave: *Indigofera suffruticosa*, Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich.

ABSTRACT

The indigo and indirubin are both derived by oxidation and dimerization from indoxyl and isatin, which are themselves liberated from colorless precursor conjugates, Indican or Isatan B. The indirubin inhibits DNA synthesis in several cell lines. This experimental study was developed to evaluate the effect of identified and isolated chemical composites of leaves of *I. suffruticosa* on the neoplastic cell lines (Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma). The used material was gotten through phytochemical screening protocols of extractive identification and isolation of active constituents of *I. suffruticosa* leaves. The bioassays were released with 8 groups of 6 mice to tumoral implantation and the chemotherapy was done with indican, indigo and indirubin. On the eighth day, the animals were weighted, sacrificed, the tumors were removed and the body and tumoral weight were measuremented. The isolated active constituents were: indican, indigo and indirubin. The indican and indigo did not show significant reduction on the body weight of mice with Sarcoma 180, on the other hand, indirubin showed significant reduction. The indigo and indirubin did not show significant reduction in the body weight of mice with Ehrlich Carcinoma. The indican did not show significant reduction on the tumoral weight of mice with Sarcoma 180 in dose of 25mg/Kg intraperitoneally (i.p). The indigo and indirubin of *I. suffruticosa* leaves in doses of 25µg/Kg i.p did not show significant reduction of the neoplastic cell lines (Sarcoma 180 and Ehrlich Carcinoma). The indigo and indirubin are active compounds present in *I. suffruticosa* leaves. The *in vitro* study suggests an investigation on indigoid derivates of *I. suffruticosa* leaves.

Key-words: *Indigofera suffruticosa*, indican, indigo, indirubin, Sarcoma 180, Ehrlich Carcinoma, mice and body-weight measurement.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Rendimento dos compostos isolados das frações metanólicas e diclorometano do extrato aquoso das folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	26
Tabela 2 - Esquema da quimioterapia dos compostos químicos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre as linhagens celulares neoplásicas.	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Aspecto das palmas com folhas, sementes e frutos da planta <i>Indigofera suffruticosa</i>	19
Figura 2 - Área de coleta da espécie <i>I. suffruticosa</i> (*)/ Nova Cruz – PE	23
Figura 3 - Meio de administração via intraperitoneal	29
Figura 4 - Punção central intracardiaca	30
Figura 5 - Incisão com exposição do tumor	31
Figura 6 - Pesos corporais em camundongos portadores do tumor sarcoma 180 sobre o efeito dos compostos ativos, indican, índigo e indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i> após tratamento.	33
Figura 7 - Pesos corporais em camundongos portadores do tumor carcinoma de Ehrlich sobre o efeito dos compostos ativos índigo e indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i> após tratamento.	34
Figura 8 - Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento.	35
Figura 9 - Aspecto geral dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) após sete dias de tratamento.	35

Figura 10-	Efeito dos compostos: Indican, Índigo e Indirubina sobre o Sarcoma 180 em camundongos.	36
Figura 11	Efeito dos compostos: Indican, Índigo e Indirubina sobre o Sarcoma 180 em camundongos.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µl - microlitro

µL - microlitro

CC – Cromatografia de Coluna

CCD - Cromatografia de camada delgada

CDK - ciclina-quinases dependentes

DBMA - dimetilbenzeno ((a) antraceno).

DL₅₀ – dose letal a 50% do total de indivíduos tratados

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

FDA - The Food and Drug Administration

h - hora

i.p. - intraperitoneal

kg - kilograma

LMC - Leucemia Mieloide Crônica

MCA - metil colatreno

mg - miligrama

ml - mililitro

mm - milímetro

MTT - [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio]

nm - nanômetro

p/v – peso/volume

PBS - *Phosphate buffered saline*

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1. Considerações gerais sobre a <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	18
3.2. Células neoplásicas: Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich	20
3.3. Atividade Antitumoral	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Material vegetal	23
4.2. Drogas, solventes e reagentes	24
4.3. Equipamentos	24
4.4. Animais	25
4.5. Linhagens celulares neoplásicas	25
4.6. Obtenção dos compostos químicos	25
4.7. Obtenção das linhagens neoplásicas	26
4.7.1. Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich	26
4.7.2. Manutenção das linhagens neoplásicas	27
4.7.3. Implantação do tumor	27
4.8. Formação dos grupos experimentais	27
4.9. Protocolo de quimioterapia	28
4.10. Eutanásia dos animais	29
4.11. Processamento das amostras do tumor	30
4.12. Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Compostos químicos identificados e isolados de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	32
5.2. Peso corporal de camundongos portadores de linhagens celulares neoplásicas sobre os efeitos de indican, índigo e indirubina	33
5.3. Indican, índigo e indirubina de <i>Indigofera suffruticosa</i> sobre linhagens celulares neoplásicas	35
5.4. Atividades das linhagens celulares – sarcoma 180	36
5.5. Atividades das linhagens celulares – carcinoma de Ehrlich	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	42
8. PERSPECTIVA	43
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	
1 – Artigo	
2 – Aprovação do Comitê de Ética	

3 – Normas para submissão do artigo

4 – Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

1. INTRODUÇÃO

Os compostos químicos sintetizados pelos vegetais continuam a ser importantes fontes e modelos de novos fármacos. São pesquisas potencialmente menos onerosas e mais lucrativas que os grandes programas de sínteses químicas, pelo menos em termos de novas descobertas de compostos protótipos (DUKE, 1985). Algumas plantas brasileiras possuem compostos químicos com atividade antineoplásica significativas: *Indigofera suffruticosa*, *Sesbania drumondii*, *Archidendron ellipticum*, *Carnavalia ensiforme* e *Psoralea* (CECHINEL, YUNES, 1998).

Estatísticas revelam que nos países desenvolvidos aproximadamente uma pessoa em cada cinco, poderá vir a óbito por algum tipo de neoplasia, predominantemente em decorrência de neoplasias malignas, genericamente chamadas de câncer (BRASIL, 2007). Tal fato mostra a relevância de pesquisas incessantes sobre essa doença. No contexto da biologia celular, a mesma tem uma importância ímpar, pois reflete distúrbios das regras mais fundamentais do comportamento das células em um organismo multicelular.

Para compreender o câncer e planejar formas racionais de tratamento deve-se compreender desde o funcionamento interno das células e suas interações nos tecidos, até as consequências de seu comportamento alterado no organismo (DAWE, 1982). Assim, a pesquisa em oncologia tem uma área muito ampla, abrangendo das ciências básicas ao campo clínico.

Uma neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento ultrapassa e se mostra desordenado, quando comparado ao dos tecidos normais, e persiste da mesma maneira excessiva, mesmo após o estímulo que provocou todas as mudanças ter cessado (GREENWALD, KELLOFF, 1996). O sarcoma 180 é um bom modelo de estudo, pois as células são de fácil obtenção já que são usadas em estudos em vários centros de pesquisa e, após a inoculação no camundongo, desenvolve-se o tumor em 90% a 100% dos casos (STOCK, 1955). A manutenção dos animais no biotério é de curta duração, pois os mesmos em geral não sobrevivem após o 28º dia. É um tumor já bem estudado sendo conhecidos todos os seus parâmetros de crescimento e disseminação, e sendo fácil avaliar modificações decorrentes do uso de drogas (ZUCKERBERG, 1972; KAWAKUBO *et al.*, 1980).

O vasto registro literário e folclórico acerca de plantas medicinais usadas de forma seletiva para o controle de uma diversidade de doenças, revela a habilidade da natureza em produzir uma grande variedade de entidades químicas funcionando, como autêntico "laboratório natural". Aqui vale registrar a enorme importância que isso assume quanto ao aspecto econômico e temporal para elaboração de *screening* de plantas capazes de fornecer estruturas básicas possuidoras de atividade farmacológica ou por modificação química de seus compostos ativos (BALANDRIN et al., 1985).

O índigo tem um poderoso efeito na medicina chinesa (CHEN, XIE, 1994; ZHENG, CHENG, 1983) por apresentar atividade antiviral (MAK, 2004), antiinflamatória (KUNIKATA, 2000) e antileucêmica juntamente com seu isômero, a indirubina (WU, 1979; ZHENG, 1979; ZHENG 1979; WU, 1980).

A indirubina é um composto ativo que inibe a síntese de DNA nas diferentes linhagens celulares. Descoberta recente relata que a indirubina é o ingrediente mais ativo da porção medicinal "Danggui Longhui Wan" e vem sendo utilizado no tratamento da leucemia mielóide crônica (TANG, EISENBRAND, 1992; HAN, 1994; INSTITUTE OF HAEMATOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES, 1979).

Com o objetivo, de também possibilitar uma melhor compreensão do tema o Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas e o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco vêm desenvolvendo experiências com plantas medicinais da flora nordestina. Essas plantas são estudadas quanto a seus constituintes químicos e propriedades biológicas nesses laboratórios. A interação desses setores de estudo tem detectado plantas com potentes efeitos biológicos como também os possíveis constituintes presentes em seus extratos os quais são atribuídos efeitos farmacológicos. Desse modo abrem-se perspectivas para a elaboração de pesquisas mais acuradas de plantas de expressivo potencial terapêutico. Como exemplo, podemos citar trabalhos acima referidos, com base no uso popular com *I. suffruticosa*.

A *I. suffruticosa* Mill é uma planta da família Fabaceae originária da Índia, comum em toda a região tropical e subtropical, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. No Brasil, é encontrada praticamente em todo país, é uma forrageira anual ou perene adaptada à região do Sertão Pernambucano. O uso na medicina popular é indicado para dores articulares e nevralgias, distúrbios circulatórios, afecção das vias respiratórias, inflamação aguda da pele e hemorragias nasais. A

infusão das folhas e raízes é considerada antiespasmódicas, diuréticas, estomáquicas, febrífugas, purgativas e sedativas. É empregada também com bons resultados contra epilepsia e icterícia. As folhas machucadas são utilizadas topicamente contra sarna, e as raízes e sementes secas e reduzidas a pó, para afugentar insetos (CORREIA, 1926; BRAGA, 1976; MATOS, 1999).

O registro de informações do uso popular dessa espécie tem sido investigado por diversos autores (CORREIA, 1926; BRAGA, 1976; MATOS, 1999) tais investigações são puramente teóricas, ou quando muito, baseados em esporádicas observações de campo que carecem de uma base científica. Outros autores (ROIG, 1974; RIBEIRO et al., 1991), no entanto preferem considerá-la uma planta tóxica. Estudos farmacológicos mostraram que a planta apresenta ação toxicológica e toxicogénica (RIBEIRO, 1991). Pesquisa recente tem sido realizada para explorar o potencial desta planta e dar uma base científica a sua utilização (LEITE et al., 2003, 2004, 2006; VIEIRA, 2007).

A diversidade de informações sobre o assunto leva a formulação da hipótese sobre a eficácia terapêutica e ou sobre a baixa toxicidade de compostos químicos isolados da planta. Para comprovar estes dados objetivou-se investigar os efeitos dos compostos químicos isolados; indican, indigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa* sobre linhagens de células neoplásicas.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos compostos químicos identificados e isolados de folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill sobre as linhagens celulares neoplásicas (Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich).

2.2.Objetivos específicos

Investigar a presença de compostos químicos ativos em extratos de folhas de *I. suffruticosa*;

Identificar e isolar compostos químicos, indican, índigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa*;

Avaliar os pesos corporais dos camundongos albinos suíços portadores de linhagens celulares neoplásicas submetidos ao tratamento com os compostos químicos indican, índigo e indirubina.

Avaliar os pesos tumorais dos camundongos albinos suíços portadores das linhagens de sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich submetidos ao tratamento com os compostos químicos indican, índigo e indirubina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A *Indigofera suffruticosa* Mill

Fabaceae é uma das maiores [famílias botânicas](#), também conhecida como [Leguminosae](#) ([leguminosas](#)), de ampla distribuição geográfica. São aproximadamente 18.000 espécies em mais de 650 gêneros. Uma característica típica dessa família é apresentar o [fruto](#) do tipo [legume](#), também conhecido como [vagem](#) (há exceções). No sensu de Cronquist (1981), pertence à subclasse Rosidae que é formada por uma planta considerada sob ponto de vista evolutivo como intermediário entre Magnolidae primitivas e Asteridae avançadas. Em 1989, Dahlgren relacionou o padrão metabólico filogeneticamente nas diversas subclasses em angiospermas. A partir desses estudos, esse pesquisador expandiu a classificação sistemática de Cronquist/Takhtajan, sistema este que distribuía as famílias dicotiledônicas em seis ordens, para 25 superordens em Magnoliopsida (DAHLGREN, 1995). Quase todas as espécies da família apresentam [simbiose](#) de suas [raízes](#) com [bactérias](#) do gênero [Rhizobium](#) e semelhantes, que fixam o [nitrogênio](#) da [atmosfera](#), uma característica [ecológica](#) de extrema importância. (WATSON, DALLWITZ, 1992)

As espécies da família Fabaceae são comuns em toda região tropical e subtropical. No Brasil, é encontrada praticamente em todo país. A maioria é adaptada às regiões semi-áridas. São pouco exigentes e crescem em solos de baixa fertilidade, ocorrendo naturalmente em beira de estradas (BARROSO, 1984).

O gênero *Indigofera* apresenta-se como um arbusto herbáceo, vegetando espontaneamente em quase toda parte e, em especial nas imediações de cidades e vilas. Possui abundante ramagem verde – esbranquiçada e revestida de pêlos e folhas elípticas compridas e em forma de palmas (Figura 1). Suas flores, róseas e miúdas, desabrocham em pequenos cachos. Os frutos, em forma de vagens arredondadas e recurvas, contêm sementes parecidas com feijão. Possui raiz principal sobre suas ramificações. *Indigofera* é um gênero amplamente distribuído com espécies ocorrentes na Ásia, México, Europa e América (BARROSO 1984).



Figura 1. Aspecto das palmas com folhas, sementes e frutos da planta *Indigofera suffruticosa*.

Diversos usos medicinais são registrados para *I. suffruticosa* destacando-se o uso das folhas como antiespasmódico, sedativo, estomático, diurético e purgativo, da raiz como odontálgica e útil na cura da icterícia. Empregada também nas mordeduras de cobras e como insetífuga, sendo esta última propriedade extensiva as sementes após serem pulverizadas (CORREIA, 1926). Recentemente, efeitos anticonvulsivantes (ALEJO, MIRANDA, RODRIGUES, 1996), antiinflamatórios, antiparasitários, antimicrobianos, embriotóxicos, antitumorais (LEITE et al., 2003, 2004, 2006; VIEIRA, 2007) e genotóxicos (RIBEIRO, 1991). Possui propriedades medicinais nos tratamentos de febres, parasitoses, doenças de pele e problemas cardíacos (ALLEN, ALLEN, 1981).

Miller e Smith (1973) iniciaram as primeiras investigações bioquímicas sobre a *Indigofera suffruticosa*. Foi identificada como uma fonte rica em aminoácidos com prováveis ações tóxicas quando utilizado o extrato de suas sementes.

Foi relatado a extração de índigo natural com folhas de *Baphicacanthus cusia*, *Polygonum tinctorium* Aid, *Isatis tinctoria* Fort, ou *Indigofera tinctoria* L. em processos manufaturados para uso na medicina tradicional Chinesa para tratar infecções virais do trato respiratório e outras doenças infecciosas (BENSKY et al. 1986).

Apesar de o índigo ter um poderoso efeito na medicina chinesa (CHEN, XIE, 1994; ZHANG, 1983), a atividade antiviral (MAK, 2004), antiinflamatória (KUNIKATA et al, 2000) e anti-leucêmica (WU, YANG, ZHU, 1979; ZHENG, 1979a; ZHENG 1979b; WU, 1980a, 1980b) é atribuída ao seu isômero de cor vermelha, a indirubina (MAK, 2004).

3.2. CÉLULAS NEOPLÁSICAS: SARCOMA 180 E CARCINOMA DE EHRLICH

O Sarcoma 180 ou Tumor de Crocker é um tumor indiferenciado que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. Estudos de microscopia eletrônica mostram contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando ser esta neoplasia um carcinoma (ZUCKERBERG, 1973). Histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjadas em ninhos ou cordões. O pleomorfismo é acentuado. Há estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor. Frequentemente há necrose central. Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados, havendo regressão natural em 8% a 10% desses. Em geral ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após a inoculação subcutânea e os animais morrem em geral entre o 28º e o 30º dia (ZUCKERBERG, 1972; KAWAKUBO et al., 1980).

O tumor de Ehrlich foi introduzido por Ehrlich (1906) como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, sendo transplantado em animais da mesma espécie. Somente em 1932, com Loewenthal e Janh (1932), surgiu em forma ascítica, ou seja, aquela desenvolvida no peritônio de animais inoculados com células tumorais. Sua disseminação é agressiva, a partir do sétimo dia é possível observar expressivo crescimento da massa tumoral, a qual continua crescendo e invadindo os tecidos adjacentes até o 30º dia. Logo após a inoculação, observa-se a migração das células para os linfonodos regionais. Histologicamente, o tumor de Ehrlich apresenta extensas áreas de necrose. Estas são oriundas da morte das células neoplásicas, a qual é bastante intensa já na primeira semana pós-

inoculação. Intensa atipia e células extremamente anaplásicas são comumente vistas por toda a lâmina. O tumor possui poucas células inflamatórias e estroma escasso (GUPTA et al, 2004).

Os tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich se caracterizam por um alto índice mitótico e de invasividade, os quais constituem um excelente instrumento didático para o entendimento do comportamento dos tumores malignos (DAWE, 1982).

3.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL

Em busca de princípios ativos com ação sobre os diferentes tipos de tumores, estudos feitos com espécies da família Fabaceae têm mostrado resultados bastante satisfatórios.

O extrato etanólico de *Sesbania drumondii* apresentou resultados positivos quando testados em leucemia (PS) e KB (carcinoma nasofaríngeo) in “vivo” através do fracionamento isolando três compostos denominados sesbanimida A, B e C (RICHARDSON, 1984)

Em frações obtidas do extrato orgânico através da técnica de fracionamento de *Archidendron ellipticum*, Nielson mostrou atividade antitumoral contra linhagem celular de melanoma “in vivo”. (BEUTLER et al,1997)

Atividade antineoplásica em células de câncer pancreático humano foi relatada com o uso de uma proteína L-canalina, isolada da *Carnavalia ensiformes* (ROSENTHAL, 1997).

O óleo extraído de sementes de *Psoralea coryfolia* apresentou moderada atividade antitumoral sobre papiloma induzido em camundongos por DBMA (7,12 dimetilbenzeno (a) antraceno). Já em sarcoma induzido por 20-MCA (20-metil colatreno), ocorreu efeito inibitório quando comparados aos controles (LATTA, 1999).

Em 1996, o Instituto de Hematologia da Academia Chinesa de Ciências Médicas em pesquisas com Leucemia Mieloide Crônica (LMC) tratadas com 11 tipos de plantas (Chinese Pharmacopoeia, 1995), identificou o princípio ativo da mistura complexa (TANG, EISENBRAND, 1992; HAN, 1994; INSTITUTE OF HAEMATOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES, 1979). Foi

detectada a atividade de um ingrediente, Qing Dai (índigo naturalis), um forte azul escuro, preparado com folhas de *Baphicacanthus cusia* (Acanthaceae), *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae), *Isatis indigotica* (Brassicaceae), *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) e *Indigofera tinctoria* (Fabaceae), porém, o efeito anti-leucêmico é atribuído ao ingrediente de cor vermelho denominado Indirubina, sendo o menor constituinte da mistura (WU, 1979, 1980; ZHENG, 1979a, 1979b; WU, 1980).

A indirubina inibe a síntese de DNA de algumas células (HURRY, 1930; ZHENG 1979a, 1979b; WU, 1980; ZHANG, 1983; CHEN, XIE, 1984; CHANG, BUT 1987; BALFOUR-PAUL, 1998), sendo inibidor seletivo da ciclina-quinase dependente (CDK). O sistema de controle do ciclo celular é baseado em quinases ativadas por ciclinas tendo um papel fundamental no ciclo de divisão celular. Existem vários tipos de ciclinas, uma para cada etapa celular. A quinase é a unidade catalítica e a ciclina, a unidade catalizadora. A indirubina e seus análogos inibem a CDK competindo com o ATP, impedido a catalisação do glicogênio sintase quinase-3 (LECLERC et al., 2001), uma subunidade de uma quinase, bloqueando-a no estado tardio de G1 e G2/M no ciclo celular.

DAMIENS et al., 2001, utilizando o composto indirubina-3'-monoxime caracterizado e isolado por MARKO et al., (2001), investigou os efeitos da indirubina no ciclo celular de células HBL-100 e observou que apesar do composto não alterar significativamente a ação da maioria das células reguladoras, a indirubin-3'-monoxime paralisou a fase G2, sendo esse efeito revertido quando retirado à exposição ao composto, porém induziu a poliploidia apenas na fase M em células sincronizadas, mas as mesmas evoluíram com morte celular.

Alguns análogos da indirubina como o 5-halogenoindirubina (GU, 1989), *N*-etil-indirubina (JI, ZHANG, 1985), *N*-metil-iso-indigo (JI et al., 1991) e indirubin-3'-monoxime (Li et al. 1996), exibiram alta atividade antitumoral quando comparada a indirubina em modelos animais (GU, 1989).

Trabalhos recentes utilizando extrato aquoso de *I. suffruticosa* demonstraram baixa ordem de toxicidade aguda (LEITE et al., 2003). O extrato aquoso obtido por infusão 53% e maceração 62.62% nas doses de 50 mg/Kg possuem atividade antitumoral *in vivo* sob Sarcoma 180.(VIEIRA et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

O vegetal foi coletado na fase adulta, no período da floração. O material para estudo botânico foi acondicionado entre folhas de jornal, prensado e transportado até o laboratório onde foi efetuada a herborização. Aqueles destinados aos protocolos fitoquímicos foram acondicionados em saco de “nylon”, procedendo-se seu encaminhamento ao laboratório para as operações extrativas.

O material vegetal utilizado neste trabalho folhas *I. suffruticosa*, foi coletado cidade de Nova Cruz no Estado de Pernambuco – Brasil em abril 2007 (Figura 2), no período de abril de 2007. A amostra da planta encontra-se catalogada sob o número 32858, no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco.



Figura 2 - Área de coleta da espécie *I. suffruticosa* (*)/ Nova Cruz – PE

4.2. Drogas, solventes e reagentes

Acetato de etila	PA	MERCK
Metanol	PA	MERCK
Água destilada		
Ácido Clorídrico (2N)		
Ácido Acético		
Ácido Fórmico		
Diclorometano		
Vanilina Clorídrica		
Sephadex LH-20		
Sílica Gel		
Solução salina (NaCl)		

4.3. Equipamentos

Balança FILIZOLA mod.p/5kg
Balança eletrônica de precisão GEHAKA mod. BG 1000
Coluna 0,063-0,200mm
Corante vital Azul de Tripan (Merk) 0,4% p/v
Leitor óptico ELX 800
Microscópio invertido LEITZ
Destilador FABBE-PRIMOR mod. 105
Placa aquecedora com agitador magnético, FISATON mod. 752^A
Liofilizador L202 (LIOBRAS)
Estufa bacteriológica (315 FANEM)
Capela de fluxo laminar (TROX FLV 503)
Freezer Cònsul 300L (CVU30C)
Autoclave (IBCC) mod. HI 300N
Estufa de esterilização (FANEM) mod. 311 110V
Câmara fotográfica Exilim (10.1 Mega Pixels)

4.4. Animais

Foram utilizados 48 camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus*), saudáveis, com idade de 40 dias, pesando em média 25 a 40g, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Recife, Pernambuco/Brasil. Os animais receberam água e dieta (LABINA Purina-Brasil) “*ad libitum*” e foram mantidos em condições normais de temperatura e umidade sob ciclo natural claro e escuro de 12 horas. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Protocolo do Instituto Nacional do Câncer (GERAN et al., 1972) e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob ofício de número 33/06, processo 009528/2006-60 de julho de 2005. Todas as recomendações da Lei Nacional N° 6.638, 05/11/1979 para manuseio científico dos animais foram respeitadas.

4.5. Linhagens celulares neoplásicas

Foram utilizados o sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich nas formas ascíticas mantido nos animais por transplante da suspensão de células tumorais (STOCK et al, 1955).

4.6. Obtenção dos compostos químicos

Folhas de *I. suffruticosa* (1,5kg) foram reduzidas a pequenos fragmentos e submetidas a infusões aquosas sucessivas (60°C, 3x2l), para uma concentração final de 10%. Cerca de 5 g do extrato bruto foram submetidos a uma cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 empacotada e desenvolvida com metanol. As frações eluídas (140 frações de 40 mL) foram monitoradas por CCD, reunidas aquelas contendo indican, índigo e indirubina e recromatografadas em coluna de gel de sílica Merck, 70-250 micra), empacotada em CH₂Cl₂ e eluída com esta fase móvel e gradiente de polaridade crescente desta com acetato de etila (2, 5 e 100%) e finalmente com acetato de etila-metanol (10%), perfazendo um total de 47 frações de 50 ml cada uma. As frações contendo indican - MeOH-AcOEt- 10% (Fr. 40-45; 310mg), o índigo - CH₂Cl₂-AcOEt- 2% (Fr. 17-25; 250mg) e a indirubina - CH₂Cl₂-AcOEt- 5% (Fr. 32-35; 110mg) foram isoladas.

O rendimento e caracterização das frações metanólica e diclorometano do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa* encontram-se expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento dos compostos isolados das frações metanólicas e diclorometano do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa*.

Solventes	Frações/ n°	Composto ativo	Rendimento
Metanol	40 a 45	Indican (marron)	310 mg
Diclorometano	17 a 25	Indigo (azul)	250mg
Diclorometano	32 a 35	Indirubina (vermelha)	110mg

Os compostos químicos; indican, índigo e indirubina obtidos do extrato aquoso de folhas da espécie *I. suffruticosa* foram utilizados para avaliação dos ensaios biológicos.

4.7. Obtenção das linhagens neoplásicas

4.7.1. Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich

Células do sarcoma 180 e do carcinoma de Ehrlich foram expandidas em dois frascos pequenos (cada linhagem) de cultivo celular (60 mL) contendo meio de cultura (DMEM + 10% SBF + 2,5 U/mL de penicilina + 2,5 µg/mL de estreptomicina) foram cedidas pelo Departamento de Antibióticos/UFPE. O meio de cultura contendo as células tumorais foi centrifugado (2000 rpm, por 10 min., a 4°C), o precipitado celular foi suspenso em PBS (solução tampão fosfato) e processado para manutenção da linhagem tumoral. Essa manutenção foi feita em cultivo, no qual as células foram mantidas em frascos apropriados com meio de cultura composto por Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), acrescido de penicilina, estreptomicina nas dosagens supracitadas, além de soro fetal bovino termoinativado (SFB). Os frascos eram mantidos em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, sendo que, o meio era trocado a cada 48h (STOCK et al., 1955; GERAN et al., 1972). A partir da cultura, as células do sarcoma foram mantidas em camundongos.

4.7.2. Manutenção das linhagens celulares neoplásicas

A linhagem foi mantida através de passagens intra-peritoneais semanais da seguinte maneira: após sete dias da inoculação das células tumorais no peritônio, os animais, o líquido ascítico contendo as células tumorais aspirado e as células foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade após adição do corante vital azul de Tripán e sua concentração ajustada para 10^6 células por mL. Outros camundongos foram então, inoculados com 1 mL desta suspensão celular via intraperitoneal para utilização do Departamento.

4.7.3. Implantação do tumor

O líquido ascítico contendo células tumorais foi aspirado sete dias após sua inoculação e centrifugado (70rpm, por 5min, a 4°C). De acordo com a contagem, a concentração de células viáveis era ajustada com solução de NaCl estéril, tamponada (PBS), para 5×10^7 células por mL. É importante ressaltar que somente as soluções cuja viabilidade celular foi acima de 95% foram utilizadas. O volume de 0,1 mL foi então inoculado por via subcutânea (sc) na região axilar direita de cada camundongo (SHIRAI, IZUMI e YAMAGAMI, 1991).

4.8. Formação dos grupos experimentais

Para os experimentos, os animais foram divididos em grupos de 6 animais e mantidos no Biotério do Departamento de Antibióticos/UFPE. Esses animais foram pesados e agrupados em gaiolas separadas e devidamente etiquetadas. Os grupos e seus respectivos tratamentos encontram-se expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Esquema da quimioterapia dos compostos químicos de folhas de *I. suffruticosa* sobre as linhagens celulares neoplásicas.

Grupos	Dose	Compostos químicos	Linhagens celulares tumorais
G1a	25 mg/Kg	Indican	Sarcoma 180
G1b	25µg/Kg	Índigo	Sarcoma 180
G1c	25µg/Kg	Indirubina	Sarcoma 180
G1d	0,2ml/Kg	Solução Salina	Sarcoma 180
G2b	25µg/Kg	Índigo	Carcinoma de Ehrlich
G2c	25µg/Kg	Indirubina	Carcinoma de Ehrlich
G2d	0,2ml/Kg	Solução Salina	Carcinoma de Ehrlich
G3	0,2ml/Kg	Solução Salina	Sem tumor

4.9. Protocolo de Quimioterapia

Camundongos albinos suíços machos foram pesados e divididos ao acaso em oito grupos de seis animais. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) (Figura 3). Nos grupos G1a, G1b e G1c foram injetados 0,3 mL de células do Sarcoma 180 i.p. (aproximadamente 3×10^6 células). Nos grupos G2b, G2c e G2d foram injetados 0,3 mL de células do Carcinoma de Ehrlich i.p. (aproximadamente 3×10^6 células). O tempo decorrido entre a remoção do tumor do animal doador até seu implante nos animais receptores, não ultrapassou 60 minutos, conforme recomendado (GERAN et al., 1972).

Após 48 horas do implante, será iniciada a quimioterapia via peritonral, mediante administração das frações de *I.suffruticosa* em doses diárias de 25 mg/kg (Grupo G1a), e 25µg/Kg (G1b, G1c, G2b, G2c) e 0,2 mL de solução

salina para os animais controles (Grupos G1d, G2d e G3), durante sete dias consecutivos. A dose dos compostos administrada aos animais foi definida baseando-se na DL_{50} (LEITE, 2003).

Foi preparada uma solução estoque com uma concentração de oito vezes o volume utilizado diariamente para cada grupo de animal, necessário para todo o período de tratamento. Esta solução foi acondicionada à 2°C em frasco âmbar hermeticamente fechado. No oitavo dia do experimento, os camundongos foram eutanasiados para avaliação dos efeitos sob as linhagens celulares (STOCK et al., 1955).



Figura 3. Meio de administração via intraperitoneal.

4.10. Eutanásia dos animais

Ao término do tratamento, oitavo dia, os animais foram pesados e sedados com éter etílico (MERCK), coletado amostra sanguínea através de punção central intracardíaca (TESH, 2001) para coleta sanguínea, precedendo a morte do animal (Figura4).



Figura 4. Punção central intracardíaca

4.11. Processamento das amostras do tumor

Após incisão na pele de cada camundongo receptor (Figura 5), o tumor foi removido e transportado para uma placa de Petri esterilizada, contendo solução de gamicina, a uma concentração de 2 mg/100mL de NaCl 0,9 % (p/v). Os fragmentos foram pesados e fixados em formol tamponado (solução tampão de aldeído fórmico neutro), sendo o volume de fixador 10 vezes maior que o volume do fragmento. A fixação ocorreu em temperatura ambiente durante 24 horas (GERAN et al., 1972).

Os procedimentos foram realizados dentro do protocolo estabelecido da Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos de acordo com Geran et al. (1972). Cuidados foram devidamente tomados, para evitar a contaminação e o esmagamento dos tumores no processo de manipulação. Materiais cirúrgicos estéreis e individuais para manipulação dos tumores foram utilizados. Balança analítica foi necessária para o procedimento da pesagem dos mesmos. O tempo decorrido da retirada do tumor do animal doador, até a sua implantação, não deverá exceder 30 minutos.



Figura 5. Incisão com exposição do tumor.

A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula abaixo. A relação T/C deve ser considerada como atividade significativa da droga, correspondendo a uma inibição de 58% (GERAN et al., 1972).

$$TWI\% = C - T \times 100, \text{ onde}$$

C

TWI% = Percentual de inibição do peso tumoral

C = Média do peso dos tumores do grupo controle

T = Média do peso dos tumores do grupo tratado

4.12. Análise estatística

Os parâmetros corporais dos animais estão expressos em média $\pm$ EP seguido do teste “t” student, $p < 0,005$. Os parâmetros das linhagens celulares tumorais foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguidos de Kruskal-Wallis onde $p < 0.001$. As avaliações das linhagens celulares dos tumores foram expressas em Mediana (min-max).

5. RESULTADOS

5.1. Compostos químicos identificados e isolados de folhas de *I. Suffruticosa*.

No ensaio fitoquímico foram identificados e isolados compostos químicos obtidos do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*. O extrato revelou a presença de indican por cromatografia de camada delgada (CCD). Posteriormente deste extrato foi obtido duas frações; MeOH e CH₂Cl₂. Da MeOH foi isolado o composto químico indican. Da CH₂Cl₂ foram isolados dois compostos químicos, o índigo e a indirubina. Os compostos químicos indican, índigo e indirubina foram utilizados nos ensaios biológicos.

5.2. Peso corporal de camundongos portadores de linhagens celulares neoplásicas sobre os efeitos de indican, índigo e indirubina

O peso corporal dos animais portadores de linhagens celulares neoplásicas sobre os compostos químicos; indican, índigo e indirubina obtidos de frações MeOH e CH₂Cl₂ do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* está expresso nas figuras 6 e 7. O experimento demonstrou que os grupos portadores dos tumores Sarcoma 180 (Figura 6) sobre o efeito dos compostos químicos apresentaram os seguintes resultados: na concentração de 25mg/Kg o indican apresentou 3,09±1,76, concentração de 25µg/Kg o índigo apresentou 1,43±2,59 e indirubina 1,22±2,37; para os grupos controles salina/tumor foi de 4,49±3,38 e salina/sem/tumor foi de 2,12±1,63. De um lado, o indican e índigo não foram significativos quando comparados com os controles salina/tumor e salina/sem/tumor. Por outro lado, indirubina apresentou redução significativa dos pesos corporais dos animais com percentual de 57,37% quando comparado com o salina/tumor e 8,02% quando comparado com salina/sem/tumor, ambos os controles apresentaram desenvolvimento de 100%.

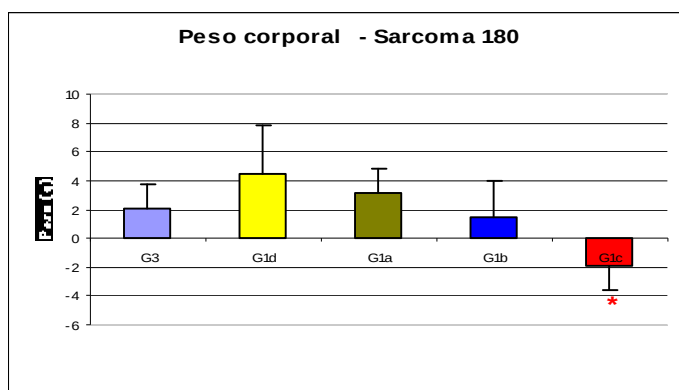


Figura 6 - Pesos corporais em camundongos portadores do tumor sarcoma 180 sobre o efeito dos compostos ativos, indican, índigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa*. Os dados estão expressos com média ± EP seguido do teste one way – Análise de Variância em 28 animais, $p < 0,005$. Os grupos com sarcoma 180: G1a – Indican 3,09±1,76; G1b – Índigo 1,43±2,59 e G1c – Indirubina 1,22±2,37. Grupos controles: G1d – Salina/tumor 4,49±3,38 e G3 – Salina/sem/tumor 2,12±1,63

Os pesos corporais dos animais dos grupos portadores do Carcinoma de Ehrlich (Figura 7) sobre o efeito do Índigo apresentou $1,48 \pm 3,21$ e Indirubina $1,02 \pm 1,21$. Esses dados não foram significativos quando comparados com os controles, salina/com/tumor $2,38 \pm 1,78$ e salina/sem/tumor $2,12 \pm 1,63$.

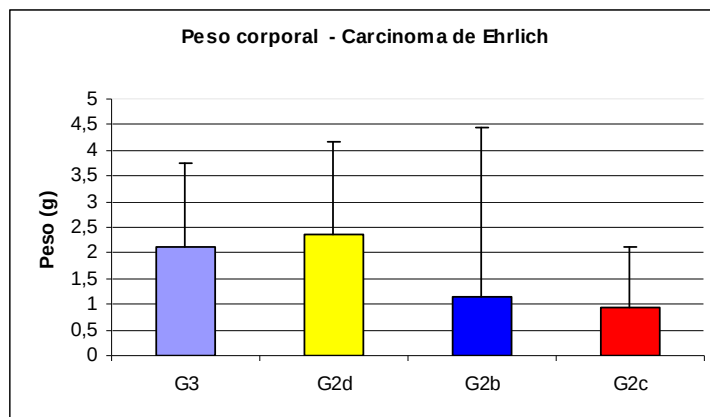


Figura 7 - Pesos corporais em camundongos portadores do tumor carcinoma de Ehrlich sobre o efeito dos compostos ativos índigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa*. Os dados estão expressos com média $\pm$ EP seguido do teste one way – Análise de Variância em 23 animais, $p < 0,005$. Os grupos com carcinoma: G2b – Índigo $1,48 \pm 3,21$ e G2c – Indirubina $1,02 \pm 1,21$ Grupos controles: G2d – Salina/com/tumor $2,38 \pm 1,78$ e G3 – Salina/sem/tumor. G3 $2,12 \pm 1,63$

5.3. Indican, índigo e indirubina de *Indigofera suffruticosa* sobre linhagens celulares neoplásicas.

Os aspectos gerais dos tumorais Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich de camundongos após sete dias de tratamento com compostos químicos; Indican, Índigo e Indirubina encontram-se registrados nas figuras 8 e 9. Contudo, as atividades dos compostos químicos sobre as linhagens celulares estão expressos nas figuras 10 e 11.

Com relação aos aspectos gerais do tamanho dos tumores dos grupos tratados com índigo e indirubina, foram observados que os tumores com sarcoma (Figura 8 - G1B, G1C) e carcinoma (Figura 9 - G2B, G2D) apresentaram-se bastantes reduzidos. Como visto, nestas linhagens celulares não foi demonstrado inibição dos tumores.

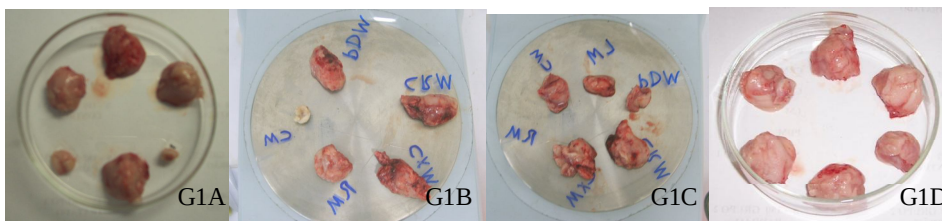


Figura 8 - Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento. G1A – Sarcoma 180 com Indican; G1B – Sarcoma 180 com Índigo; G1C - Sarcoma 180 com Indirubina; G1D – Sarcoma 180 com Salina.

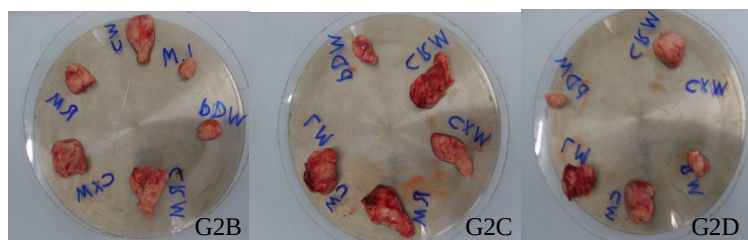


Figura 9 - Aspecto geral dos tumores (Carcinoma de Ehrlich) após sete dias de tratamento. G2B – Carcinoma Ehrlich com Índigo; G2C – Carcinoma Ehrlich com Indirubina; G2D – Carcinoma de Ehrlich com Salina.

5.4. Atividades das linhagens celulares - sarcoma 180

O Indican na concentração de 25 mg/Kg por via i.p. apresentou redução do peso do sarcoma 180 G1A – ($1,04 \pm 0,791$) com percentual de inibição de 34,98%, entretanto, neste grupo foram observados dois tumores com tamanho bastante reduzido (Figura 7 G1A). Os animais com Sarcoma 180, tratados com o índigo G1B ($4,030 \pm 2,150$) e a indirubina de G1C ($4,302 \pm 2,656$) apresentaram um percentual de crescimento de 36,15% e 45,27% respectivamente quando comparados ao grupo controle sarcoma/salina G1D ($2,96 \pm 0,79$) com desenvolvimento de 100%.

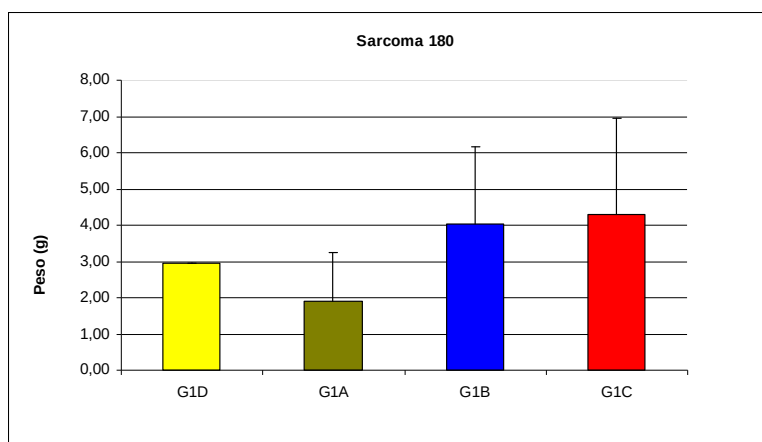


Figura 10 – Efeito dos compostos: Indican, Índigo e Indirubina sobre o Sarcoma 180 em camundongos. Os dados estão expressos com média $\pm$ EP seguido do teste one way – Análise de Variância em 23 camundongos, $p < 0,005$. Os grupos tratados: G1A – Indican $1,04 \pm 0,791$; G1B – Índigo $4,030 \pm 2,150$ e G1C – Indirubina $4,302 \pm 2,656$. Grupos controles: G1D – Salina/com/tumor $2,96 \pm 0,79$.

5.5. Atividade das linhagens celulares - carcinoma de Ehrlich

Os animais portadores do Carcinoma de Ehrlich sobre o efeito dos compostos químicos na concentração de 25µg/kg por via i.p. para o índigo 2,738±1,021 e indirubina 3,916±1,895, apresentaram percentuais de crescimento de 27,44% e 43,6% respectivamente. Estes grupos tratados com os compostos químicos foram comparados ao grupo controle Salina/com/tumor (2,15±1,30) que demonstrou desenvolvimento tumoral de 100%.

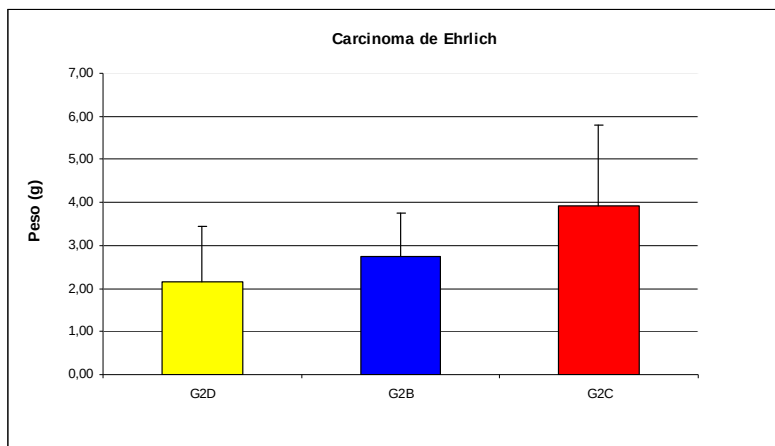


Figura 11 – Efeito dos compostos: Índigo e Indirubina sobre o Carcinoma de Ehrlich em camundongos. Os dados estão expressos com média ± EP seguido do teste one way – Análise de Variância em 23 camundongos, $p < 0,005$. Os grupos tratados: G2B – Índigo 2,738±1,021 e G2C – Indirubina 3,916±1,895. Grupos controles: G2D – Salina/com/tumor 2,15±1,30.

6. DISCUSSÃO

Diversos usos medicinais foram registrados para *I. suffruticosa* destacando-se o uso das folhas como antiespasmódico, sedativo, estomático, diurético, purgativo (CORREIA, 1926), anticonvulsivantes (ALEJO, MIRANDA, RODRIGUES, 1996), recentemente tem sido descritos atividades antiinflamatórias, antiparasitários, embriotóxicos antimicrobianos, antitumorais (LEITE et al., 2003, 2004, 2006; VIEIRA, 2007).

O presente estudo foi realizado para investigar os efeitos dos compostos químicos isolados indican, índigo e indirubina, obtidos de folhas de *I. suffruticosa*, sobre o peso corporal e tumoral em camundongos portadores de linhagens de células neoplásicas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a presença predominante do indican no extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*. Posteriormente foram isolados deste extrato, os compostos químicos índigo e a indirubina.

Schunck em 1855 descreveu um componente que nomeou indican, o qual considerou o precursor do índigo extraído da *Indigofera* sp. e *Polygonum tinctorium* Ait. Em 1900, Hoogewerff e Meulen estabeleceram sua estrutura como -indoxyl - glucoside* (Systematic name: 1-O-(1H-indol-3-yl)-__-glucose or 1H-indol-3-yl-β-D - glucoside) (HURRY, 1930). Estudos preliminares utilizando extrato metanólico da *Isatis tinctoria* demonstraram a presença do Isatan B, o derivado direto do Indican e o Isatan A, maior precursor do índigo (OBERTHUR, 2004).

Com relação a essas moléculas encontra-se na literatura consultada, relato que são compostos químicos ativos na inibição da síntese de DNA em varias linhagens celulares (HURRY, 1930; ZHENG 1979a, 1979b; WU, 1980; ZHANG, 1983; CHEN, XIE, 1984; CHANG, BUT 1987; BALFOUR-PAUL, 1998) Alguns estudos têm demonstrado que a indirubina e seus derivados inibem a CDK competindo com o ATP, impedido a catalisação do glicogênio sintase quinase-3 (LECLERC et al., 2001), uma subunidade de uma quinase, bloqueando-a no estado tardio de G1 e G2/M no ciclo celular.

A ocorrência desses compostos foi evidenciada através de levantamento na literatura, onde primeiramente, consultaram-se coleções genéricas, Chemical Abstracts (1907-2002) e o banco de dados (NAPRALERT 2003), específicos para

produtos naturais. A partir destes dados, acredita-se que é justificado um estudo fitoquímico futuro, na caracterização destes compostos químicos visto que eles são abundantes em *Indigofera*.

O uso de drogas quimioterápicas do câncer envolve o risco de toxicidade nos pacientes. Pesquisas, contudo, são realizadas a fim de desenvolver drogas que atuam seletivamente no tumor.

De um lado, o indican e índigo não apresentaram redução significativa dos pesos corporais dos animais quando comparados com salina/com/tumor e salina/sem/tumor. Por outro lado, a indirubina apresentou redução significativa dos pesos corporais dos animais com percentual de 57,37%

Em nossos resultados constatou-se uma redução não significativa de peso corporal dos animais portadores de sarcoma 180 sobre os efeitos do indican e índigo quando comparados com salina/com/tumor e salina/sem/tumor. Por outro lado, a indirubina apresentou redução significativa dos pesos corporais dos animais com percentual de 57,37%.

O peso corporal de animais portadores sarcoma 180 sobre o efeito de folhas de *I. suffruticosa* foi reportado por Vieira, 2007, similar ao presente trabalho não apresentaram alteração de massa muscular significativa.

Os pesos corporais dos animais portadores de Carcinoma de Ehrlich tratados com índigo e indirubina não apresentaram peso significativo.

Entretanto ao comparar o peso corporal dos animais portadores de sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich ambos submetidos aos efeitos dos compostos químicos, não apresentaram diferença significativa.

Em nosso estudo, a manutenção do peso corporal dos animais pode ser justificada por duas hipóteses. Aumento de líquido ascítico ou baixa toxicidade da substância.

O líquido ascítico é a fonte nutritiva direta para as células neoplásicas (PRASAD E GARI, 1994) e sugere uma maior agressividade do tumor influenciando em seu peso tumoral, mascarando as alterações nutricionais do animal (GUPTA, et al. 2006).

Ensaio toxicológico realizado com *I. suffruticosa* podem ser considerados praticamente atóxicos visto que a DL₅₀ não pôde ser determinada, pois o extrato

aquoso de folhas nas diferentes doses de 50 a 2.000mg/kg i.p. não provocou índice de mortalidade em camundongos albinos suíços durante 72hs de observação, sugerindo baixa ordem de toxicidade (LEITE et al., 2006), dados estes encontrados também por Jiménez-Medina (2006) em ensaio antitumoral utilizando extrato de *Calendula officinalis*, onde associou a toxidade da substancia à perda de peso e conseqüente morte do animal.

Em ensaio utilizando extrato metanólico de *Careya arbórea* em quatro linhagens neoplásicas não apresentaram redução significativa de peso corporal nos animais experimentais apesar de apresentar redução significativa nas contagens celulares neoplásicas (SENTHILKUMAR et al., 2007).

Em nossos experimentos, constatou-se que os efeitos dos compostos: indican, índigo e indirubina sobre camundongos portadores de sarcoma 180 e índigo e indirubina sobre o carcinoma de Ehrlich apresentaram redução não significativa dos tumores. Estes resultados concernentes aos compostos químicos de folhas de *I. suffruticosa* não corroboram com os resultados encontrados por Vieira et al (2007) que utilizando extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração sobre Sarcoma 180 em camundongos nas concentrações de 50mg/Kg ip., apresentaram redução significativa do peso tumoral de 64,53% e 62,62% respectivamente. Entretanto, em relação aos aspectos gerais dos tumores dos grupos; tratados com indican, índigo e indirubina sobre as linhagens celulares neoplásicas, alguns tumores apresentaram-se bastante reduzidos.

Damiens et al. (2001), utilizando o composto indirubina-3'-monoxime caracterizado e isolado por MARKO et al., (2001), investigou os efeitos da indirubina no ciclo celular e observou que apesar do composto não alterar significativamente a ação da maioria das células reguladoras, a indirubina paralisou a fase G2, sendo esse efeito revertido quando retirado à exposição ao composto, porém induziu a poliplóidia apenas na fase M em células sincronizadas, mas as mesmas evoluíram com morte celular. Leite et al. (2004) investigando o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* em células embrionárias de camundongos, utilizando diferentes concentrações, observou na dose de 10mg/Kg uma paralisação durante o processo de divisão dos blastômeros.

Em nossos resultados, apenas quatro animais morreram durante a quimioterapia. Uma observação interessante, por um lado o grupo controle aumentou o peso corporal dos animais com menor crescimento tumoral. Por outro

lado, nos grupos portadores das linhagens celulares neoplásicas, ocorreu um aumento de líquido ascítico de aspecto hemorrágico em região peritoneal.

Os critérios de confiança para julgar o valor de toda a substância com atividade antitumoral é o aumento na expectativa de vida. (Clarkson e Burchenal, 1965). Badami et al. (2003) demonstrou em seus estudos que a redução das ascite foi encontrada em animais com redução significativa da contagem de células neoplásicas aumentando a expectativa de vida dos animais.

Em nossa pesquisa, os animais portadores das linhagens celulares neoplásicas tratados com índigo e indirubina apresentaram redução de peso corporal sugerindo uma desnutrição dos animais, no entanto a *I. suffruticosa* apresenta baixa ordem de toxicidade (LEITE et al., 2006). A contagem de células não foi realizada, sendo parâmetro para avaliação o peso do tumor (Badami et al., 2003)

Apesar de nosso estudo não apresentar inibição significativa das linhagens celulares neoplásicas, a ação da indirubina na literatura tem seus pilares bem firmados.

Alguns análogos da indirubina como o 5-halogenoindirubina (GU, 1989), *N*-etil-indirubina (JI, ZHANG, 1985) e *N*-metil-iso-indigo (JI et al., 1991), indirubin-3'-monoxime (LI et al. 1996), apresentaram alta atividade antitumoral quando comparados em modelos animais (GU, 1989). Uma característica importante é que alguns análogos da indirubina apresentam-se com pouca absorção e solubilidade (JI, ZHANG, 1985).

Os resultados deste estudo indicam que os compostos ativos isolados do índigo e indirubina podem ser um análogo com pouca absorção e solubilidade, neste caso não interferindo diretamente nos efeitos das atividades antitumorais nas linhagens celulares neoplásicas estudadas.

Este resultado motivou trabalhos adicionais ora desenvolvidos nos departamentos de Farmácia e Histologia e Embriologia da UFPE visando a caracterização do índigo e da indirubina de folhas de *I. suffruticosa*, o que possibilita a perspectiva da identificação de seus análogos assim como investigar suas atividades sobre as diferentes as linhagens células.

.Esta é uma planta promissora para estudos futuros no desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas.

7. CONCLUSÕES

Os constituintes químicos identificados e isolados das frações metanólica e diclorometano do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa* foram o indican, índigo e indirubina.

O composto indirubina influenciaram significativamente na redução ponderal dos camundongos albinos suíços.

O indican não reduziu significativamente o peso médio do tumor Sarcoma 180 na dose de 25mg/Kg por via i.p.

O índigo e indirubina na dose 25µg sobre as linhagens celulares dos tumores Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich na dose 25µg/Kg não apresentaram inibição tumoral significativa quando comparados com os grupos controle.

8. PERSPECTIVA

Com base neste estudo e em dados encontrados na literatura observamos que os compostos químicos isolados, índigo e indirubina são inibidores seletivos do sistema de controle do ciclo celular, isto nos leva a questionar o porquê de não apresentaram efeitos inibitórios sob as linhagens celulares utilizadas. Sabemos que alguns análogos apresentam maior predisposição à solubilidade e absorção. Assim futuramente estudaremos a caracterização destes compostos e seus análogos e os possíveis efeitos inibitórios em outros tipos de linhagens celulares neoplásicas.

9. REFERÊNCIA

ALEJO, J. P.; MIRANDA, R.; RODRIGUES, G. Actividad Anticonvulsivante; (Antiepileptica) del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). **Rev Cubana plant Méd**, v.1, n.2, p.7-10, 1996.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E. Leguminosae: source book of Characteristics, uses and nodulation. **Washington: The University of Wisconsin Press**, p. 813, 1981.

BADAMI, S. et al. Antitumor activity of total alkaloid fraction of solanum pseudocapsicum leaves. **Phytotherapy Res**.17:1001–1004, 2003.

BALANDRIN, M.F. et al. Natural plant chemicals sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, n. 4704, p. 1154-60, 1985.

BALFOUR-PAUL, J. *Indigo*. **British Mus. Press**, London, ed.1, 1998.

BARROSO, G.M. Sistemática da Angiosperma do Brasil. **São Paulo: EDUSP**, v.2, 1984.

BENSKY, D. et al. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica (3rd edn). **Eastland Press**, 1986.

BEUTLER, J. et al., "Isolation and characterization of novel cytotoxic saponins form *Archidendron ellipticum*," **Bioorg. Med. Chem.**, 5(8):1509-1517, 1997.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialidade do Ceará. 4ª edição. **Natal: Editora Universitária da UFRN**, 1985.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DO CÂNCER. **Câncer no Brasil**: dados dos registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

CECHINEL, F.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. **Quim. Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CLARKSON, B.D. BURCHENAL, J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Prog Clin Cancer**.1:625–629, 1965.

CORREIA, M.P. **Dicionário de plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas**. 1,Rio de Janeiro, 1971.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. H. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica **World Scientific Pub. Co.**, Singapore, v.2, 1987.

CHEN, D. H.; XIE, J. X. Chemical constituents of traditional Chinese medicine Qing Dai. **ChineseTrad. Herb. Drugs** 15, 6–8,1984.

DAHLGREN, G. On Dahlgrenograms a system of classification of the angiosperms and its use in mapping characters. **An Acad. Bras. Ci.**, v.67, n.3, p.384-404, 1995.

DAMIENS et al., Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. **Oncogene**. 20, p.3786 -3797, 2001.

DAWE, C.J. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. **Cancer medicine**. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, p. 209, 1982.

DUKE, J.A. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. Florida: **CRC Press**, Inc, p. 78, 1985.

EHRLICH, P. Experimentally carcinomstudien an Mäusen. **Arb Inst Exp Ther Frankfurt**, 1:78-80, 1906.

GERAN, R.I. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v.3, n.2, p.208-209, 1972.

GREENWALD, P.; KELLOFF, G.J. The role of chemoprevention in cancer control. In: Stewart, B.W.; McGregor, D.; Kleihues, P. editors. Principles of Chemoprevention. IARC Scientific Publication. N.139. Lyon: IARC 13-22, 1996.

GU, Y. C. et al. Synthesis of some halogenated indirubin derivatives. **Acta Pharm. Sin.** 24, p.629–632, 1989.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacol Sin**, v.25, n.8, p.1070-1076, 2004.

HAN, R. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. **Stem Cells** 12, p.53–63, 1994.

HOESSEL, R. et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nature Cell Biology**. 1, 60-67, 1999.

HURRY, J. B. *The Woad Plant and its Dye* (Oxford Univ. Press, Oxford, 1930).

INSTITUTE OF HAEMATOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES. Clinical studies of Dang Gui Lu Hui Wan in the treatment of CML. **Chinese J. Intern. Med.** 15, 86–88, 1979.

JI, X. J. et al. Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. **Biomed. Environm. Sci.** 4, 332–337, 1991.

JI, X. J.; ZHANG, F. R. Antineoplastic effect of indirubin derivatives and their structure-activity relationship. **Acta Pharm. Sin.** 20, 137–139, 1985.

JI, X. J. et al. Studies on the antineoplastic effect and toxicity of synthetic indirubin. **Acta Pharma. Sin.** 16, 146–148, 1981.

JIMÉNEZ-MEDINA, E. et al. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. **BMC Cancer**. 6:119, 2006.

KAWAKUBO, Y. et al. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113-118, 1980.

KUNIKATA, T. et al. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delay-type hypersensitivity. **Eur J Pharmacol**, v. 410: 93-100, 2000.

LATTA, P.G.; PANIKKAR, K.R.; Inibition of Chemical Carcinogenesis by *Psoralea corylifolia* seeds. **Journal of Ethonopharmacology**, v.68, p.295-298, 1999.

LECLERC, S. et al.(2001).. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? **J Biol Chem**. v. 5;276(1):251–260, 2001.

LEITE, S.P. et al. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **Revbrasa**, v.7, n.1, p.47-52, 2003.

LEITE, S.P. et al. Antimicrobial Activity of *Indigofera Suffruticosa*. **eCAM**, v. 3, n.2, p.261-265, 2006.

LEITE, S.P. et al. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v.18, n.5, p.701-705, 2004.

LEITE, S.P. *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas. **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2003.

LI, C. et al. The synthesis, antileukemic activity, and crystal structures of indirubin derivatives. **Bull.Chem. Soc. Jpn** 69, 1621–1627, 1996.

LOEWENTHAL, H. JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mause-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, 37:439, 1932.

MAK, N et al. Inhibition of RNATES expression by indirubin in influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. **Biochem Pharmacol** v.67: 167-174, 2004.

MARKO et al., Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. **Oncogene**, v.20, (29) 3786-3797, 2001.

MATOS, F. J. DE ABREU. Plantas da Medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. **Fortaleza: Ed. UFC**, p.78, 1999.

MILLER, R.W.; SMITH, J.R. Seeds of *Indigofera suffruticosa* species: Their content of amino acids that acids that may be deleterious. **J. Agr. Food Chem.**, v.21, n.5, p.909-912, 1973.

NAPRALERT.Natural Products Alert, 2003. Illinois University,Chicago.
<http://www.uic.edu/pharmacy/depts/PCRPS/NAPRALERT.htm>

OBERTHUR, C. et al. The Elusive Indigo Precursors in Woad (*Isatis tinctoria* L.) - Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan A, and a Structure Revision of Isatan B. **Chemistry & Biodiversity**.v.1, p. 174 -182, 2004.

PRASAD, S.B. GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. *Indian J Expt Biol.* 32:155– 162, 1994.

RIBEIRO, I. M. et al. Levantamento botânico de leguminosas forrageiras nativas da bacia leiteira do Estado de Alagoas. Maceió: EPEAL - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Alagoas, 1984 (Comunicado Técnico).

RIBEIRO, R.L. Toxicological and Toxicogenetic Effects of Plants used in popular Medicine and in Cattle Food. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, n.3, p.89-91, 1991.

RICHARDSON, et al. The complete aminoacid and sequences of major α subunit of lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Eur.J.Biochem.**, v.144, p.101-111, 1984.

ROIG, T.; MESA, J.T. Plantas Medicinales, Aromaticas y Venenosas de Cuba. **Habana: Editorial Científico-Técnico**, v.5, p. 163, 1974.

ROSENTHAL, G.A. L-canaline: A potente antimetabolite and anti-cancer agent from leguminous plants. **Life Science**, v.60, n.19, p. 1635-1641, 1997.

SCHUNCK, - M. E. *Ann. Chim. Phil. Mag.* 10, 73, 1855.

SENTHILKUMAR , N. et al. Antitumor Activity and Antioxidant Status of the Methanol Extract of *Careya arborea* Bark Against Dalton's Lymphoma Ascites-Induced Ascitic and Solid Tumor in Mice. **J Pharmacol Sci** 103, 12 – 23, 2007.

SHIRAI M; IZUMI, H; YAMAGAMI, T. Experimental transplantation models of mouse Sarcoma 180 mice for evaluation of antitumour drugs. **Journal of Veterinarian Medical Sciences**, 53(4): 707–713, 1991.

SPORN, M.B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the neoplastic period. **Cancer Res.** v. 36, p. 2689-702, 1976.

STOCK, C.C. et al. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Research**, v.2, p.179-331, 1955.

TANG, W; EISENBRAND, G. Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine (Springer, Heidelberg, 1992).

TESH, R.B et al.,. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, Biochemical and Immunologic studies. **J Infect Dis.** 183:1431-1436, 2001.

VIEIRA, J.R.C; SOUZA, I.A; NASCIMENTO, S.C; LEITE, S.P. *Indigofera suffruticosa*: An Alternative Anticancer Therapy. **eCAM**, 12, p.1-5, 2007.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. 1992 onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 1st June 2007. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em 10 abr, 2007.

WU, G. Y. et al. Studies on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effects on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells. **Chinese Med. J.** 60, 451–454, 1980a.

WU, G.Y. et al. Study on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. **Chinese Med J**; v.60: 451-454, 1980b.

WU, L.M; YANG, Y.P; ZHU, Z.H. Studies on the active principles of *Indigofera tinctoria* in the treatment of CML. **Comm Chinese Herb Med**, 9: 6-8, 1979.

ZHANG, S. X. Studies on the chemical constituents of *Isatis indigotica* root. **Chinese Trad. Herb. Drugs** 14, 247–248, 1983.

ZHENG, Q. T., LU, D. J. YANG, S. L. Pharmacological studies of indirubin. I. Antitumor effect. **Comm Chinese Herb. Med.** 10, 35–39, 1979a.

ZHENG, Q. T., QI, S. B.; CHENG, Z. Y. Pharmacological studies of indirubin. II. Absorption, distribution and excretion of 3H-indirubin. **Comm. Chinese Herb. Med.** 10, 19–21, 1979b.

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

ANEXO 2.

Aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 033/06

Recife, 12 de julho de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Profa. Sônia Pereira Leite
Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE
Processo nº 009528/2006-60

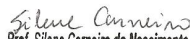
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "Análise bioquímica em camundongos portadores de sarcoma 180 sob a ação de *Indigofera suffruticosa*".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO 3.

Comprovante de submissão do artigo a Revista Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)

Manuscript Central

Página 1 de 1



Evidence Based
Complementary and
Alternative Medicine

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) |



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as Ju

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.

Manuscript ID: ECAM-08-0132

Title: Indirubin and Indigo from *Indigofera suffruticosa* leaves on neoplastic cell lines

Maranhão, Juliana
Vieira, Jeymesson
Aires, Andre

Authors: Souza, Ivone
Xavier, Haroudo
Lima, Izabela
Leite, Sonia

Date Submitted: 30-May-2008

Print Return to

Manuscript Central™ v4.10 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

ANEXO 4.

Normas para submissão do artigo

After preliminary examination of a submitted manuscript by the Editorial Office staff to check that all the necessary elements are present, the manuscript is passed to the Editor-in-Chief and Managing Editor. Submitted manuscripts will be assigned to at least two reviewers for evaluation. The Editor-in-Chief or Managing Editor may ask authors for revisions. Revised manuscripts should be resubmitted within three months. A final decision on publication made by the Editor-in-Chief will be transmitted by the Managing Editor to the author through the Editorial Office.

Article format Manuscripts should be written in clear and concise, grammatical English. A contributor whose native language is not English is recommended to have the manuscript checked by a native speaker of English. The Editor-in-Chief and Managing Editor will not assume the responsibility of making extensive revisions so that manuscripts are clear for referees.

All documents should be double-spaced. A clear, legible single font (Times/Times New Roman, Helvetica/Arial preferred) and point size of 11 should be used throughout. All submitted manuscripts should be page numbered.

In original articles and reviews, authors should submit three to five keywords that do not occur in the title of the article. Very general terms like "bacteria" and terms already present in the title should be avoided, as should nonstandard abbreviations.

Title page The title page should carry a) the title of the article; b) authors names with institutional affiliations; c) corresponding authors name with phone and fax numbers and E-mail address; e) a running head of no more than 50 characters including spaces.

Abstract The second page should carry an abstract of no more than 250 words.

References Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus.

List all authors, but if the number exceeds six, give names of six followed by "et al." All references should be available in English and must be current. When citation of articles written in languages other than English is unavoidable, enter the language in parenthesis at the end of the reference.

Article: 1. White A, Hayhoe S, Hart A, Ernst E. Adverse events following acupuncture: prospective survey of 32 000 consultations with doctors and physiotherapists. *Br Med J* 2001;323:485-486.

Book: 2. Butler K, Barrett S. Consumer's Guide to Alternative Medicine: A Close Look at Homeopathy, Acupuncture, Faith Healing, and Other Unconventional Treatments. Buffalo: Prometheus Books 1992.

Chapter within a book: 3. Filshie J, Cummings TM. Western medical acupuncture. *In:* Ernst E, White A, editors. *Acupuncture: A Scientific Appraisal*. Oxford: Butterworth Heinemann: 1999, 31-59.

Tables Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table.

Figures Figures should be professionally drawn and photographed. Letters, numbers and symbols should be clear, consistent throughout, and large enough that when reduced for publication each item will still be legible. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.

Color photographs will principally be published with the full cost borne by the authors (350 GBP). Manuscripts submitted with color photographs will be reviewed on the assumption that the authors will cover the publication cost if accepted.

Supplementary data Files containing supplementary data (for example large tables or a questionnaire) will be linked with the article published online as an extra resource for readers. Please contact the Editorial Office for further details.

Abbreviations (and nomenclature) Nonstandard nomenclature and abbreviations should be defined at the first occurrence. Introduce abbreviations only where multiple use is made.

Statistics The methods of statistical analysis should be described in sufficient detail. The word "significant" should be used only if a result is statistically significant and where exact P values are given. In clinical articles, outcome variables should be given as point estimates, with 95% confidence intervals rather than standard deviations or standard errors.

Assignment of copyright Manuscripts are considered on the understanding that after acceptance and before publication the authors will grant an exclusive license to publish to Oxford University Press.

ANEXO 5.

Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

Maranhão, J. B.; Negreiros, N.V.M; Aires, A.L.; Souza, I.A.; Leite, S.P. INDIGOFERA SUFFRUTICOSA: ATIVIDADE TUMORAL EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA 180 In: II Reunião Reginal da FeSBE, 2007, Recife.

Negreiros, N.M.V; **Maranhão, J. B.**; Vieira, J.R; Leite, S,P.; Souza, I.A.; Aires, A.L. ESTUDO MORFOLÓGICO DO TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS SOB A AÇÃO DE INDIGOFERA SUFFRUTICOSA. In: **II Reunião Reginal da FeSBE**, 2007, Recife.

Lima, I.R.; **Maranhão, J.B.**; Leite, S.P. ANÁLISE BIOQUÍMICA EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA 180 SOB A AÇÃO DA INDIGOFERA SUFFRUTICOSA.. In: **XV CONIC**, Recife, 2007.

Lima, I. R.; **Maranhão, J. B.**; Estabile, P. C.; Vieira, J. R. C.; Souza, I. A.; Xavier, H. S.; Leite, S. P. AVALIAR OS EFEITOS DO ÍNDIGO E INDIRUBINA DE *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* SOBRE LINHAGENS CELULARES NEOPLÁSICAS. In: **XXIII Reunião Anual da FeSBE, 2008.**

Lima, I. R.; **Maranhão, J. B.**; Estabile, P. C.; Vieira, J. R. C.; Souza, I. A.; Xavier, H. S.; Leite, S. P. PESOS CORPORAIS DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE LINHAGENS CELULARES NEOPLÁSICAS SOBRE OS EFEITOS DO ÍNDIGO E INDIRUBINA DE *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA*. In: **XXIII Reunião Anual da FeSBE, 2008.**