



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE
DITERPENOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE
Casearia sylvestris Swarts

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Fortaleza – Ceará
Dezembro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE
DITERPENOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE
Casearia sylvestris Swarts

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia do Ó Pessoa

Fortaleza – Ceará
Dezembro de 2006

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa
- Orientadora -

Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará
- Examinadora -

Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista
- Examinador -

Dissertação aprovada em 31/ 01/ 07

Aos **meus pais**,
exemplos de caráter, bondade e
perseverança, e aos **meus irmãos**, pela ajuda e amizade.

AGRADECIMENTOS

À **Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa**, meus agradecimentos pela orientação e compreensão que permitiram a realização deste trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo**, pelas sugestões técnico-científicas valiosas que idealizaram muitos dos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**, pelo incentivo à pesquisa na área de produtos naturais com propriedades anti-câncer.

Ao **Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro**, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP), junto a seus pós-graduandos **Aristeu Gomes Tininis** e **André Gonzaga dos Santos**, pelo isolamento e caracterização química dos diterpenos estudados neste trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro**, por seu interesse na construção deste trabalho, apesar do pouco tempo de convívio.

A todos os **professores do curso de Pós-graduação em Farmacologia** pela contribuição para a evolução do meu saber científico e humanitário.

À **Gardênia Carmen Gadelha Militão**, por sua incontestável disponibilidade e dicas imprescindíveis e, ao **Hemerson Iury Ferreira Magalhães**, pela cooperação e distração.

À **Patrícia Marçal da Costa**, pela cumplicidade, amizade e, é claro, por nossas produções científicas, as quais estão recompensando e sempre recompensarão nossa laboriosa e honrosa pesquisa por compostos com atividade antitumoral.

Aos amigos do LOE: **Hélio Nobre, Rômulo Feio, Paula Jimenez, Patrícia Bonavides, Daniel Bezerra, Marne Vasconcellos, Danilo Damasceno, Cecília Carvalho, Bruno Cavalcanti, Diego Wilke, Ailton Teles, Washington Barros, Fernanda de Castro, Arinice Costa, Delano Marinho e Ana Jérсия** pelo agradável convívio e ajuda. Em especial, aos pertencentes ao intitulado, inesquecível e, se Deus permitir, indissolúvel “**Grupo dos Risca-Faca**”: **Carla Sombra, Patrícia Marçal, Gardênia Militão, Elthon Góes, Andrew Nunes e Ivana Dantas**, por nossas inúmeras festinhas, horas trabalhadas a fio no laboratório sem distinção de sábado (ou segunda? Que dia é hoje mesmo?), turno (já ‘tá’ de noite, nã!!) ou época (férias?).

Aos técnicos: **Silvana França**, cuja dedicação é essencial para o laboratório; **Luciana França**, **Adriano dos Santos** e **Maria de Fátima**, pelo auxílio sempre disponibilizado.

À minha família, especialmente, aos meus pais, **Josué Filho e Francisca Mirtes**, pelo amor eterno e inigualável, estímulo a continuar sempre abrindo caminhos na minha vida profissional, pela dedicação sem limites e carinho sem comparação e aos meus irmãos, **Lara Cybelle e Magdiel Pinheiro**, pelos momentos alegres e ajuda constante indispensável.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um Oceano”.

Isaac Newton

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Instituto Claude Bernard - InCb

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 – INTRODUÇÃO	19
1.1. Câncer	19
1.2. Fatores de Risco X Carcinógenos	19
1.3. O Ciclo Celular e o Câncer	23
1.4. Produtos Naturais	25
1.4.1. Drogas Anti-câncer originadas de Plantas.....	25
1.5. Planta Estudada: <i>Casearia sylvestris</i> Swartz	32
1.5.1. Propriedades Farmacológicas.....	34
1.5.2. Clerodanos Diterpenos.....	35
2 – OBJETIVOS	40
2.1. Geral	40
2.2. Específicos	40
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Materiais	42
3.2. Métodos	48
3.2.1. Material vegetal.....	48
3.2.2. Extração das casearinas L, O, U e V.....	48
3.2.3. Preparação do produto de degradação da Cas U	49
3.2.4. Determinação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	51
3.2.5. Determinação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos.....	53
3.3. Estudos de Mecanismo de Ação	53
3.3.1. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripan.....	53

3.3.2. Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU.....	54
3.3.3. Análise morfológica - Coloração por Hematoxilina/Eosina.....	55
3.3.4. Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA).....	55
3.3.5. Ensaio de Relaxamento do DNA.....	57
3.3.6. Fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo.....	57
3.4. Avaliação Citotóxica e Genotóxica em Linfócitos Humanos <i>versus</i> HL-60..	58
3.4.1. Aspectos Éticos, Coleta de Sangue e Isolamento dos Linfócitos.....	58
3.4.2. Atividade Citotóxica em Linfócitos.....	58
3.4.3. Atividade Genotóxica em Linfócitos e em células de HL-60.....	59
3.5. Estudo da capacidade antitumoral da Cas U em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	62
3.5.1. Observações Histopatológicas.....	63
4 – RESULTADOS.....	65
4.1. Atividade Citotóxica e Hemolítica.....	65
4.2. Estudos do Mecanismo de Ação.....	68
4.2.1. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán.....	68
4.2.2. Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU.....	69
4.2.3. Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina.....	70
4.2.4. Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	72
4.2.5. Ensaio de Relaxamento do DNA.....	75
4.2.6. Fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo.....	76
4.3. Atividade Citotóxica e Genotóxica em Linfócitos <i>versus</i> HL-60.....	79
4.4. Atividade antitumoral da Cas U em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	81
4.4.1. Análise Histopatológica dos Órgãos.....	82
5 – DISCUSSÃO.....	90
6 – CONCLUSÃO.....	104
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de carcinógenos.....	21
Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT.....	52
Tabela 3 – Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de diterpenos isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> frente às linhagens tumorais humanas de leucemia (CEM, HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-435, MDA/MB-231), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e para melanoma murino (B-16).....	66
Tabela 4 – Atividade genotóxica avaliada em crescentes concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) da Casearina U (Cas U) e determinada em linfócitos humanos e em células HL-60 através do ensaio do cometa após 24 h de incubação.....	80
Tabela 5 – Efeito sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento com Casearina U (Cas U) nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de alguns carcinógenos: Benzopireno (1), Dimetilhidrazina (2) e Safrol (3).....	22
Figura 2 – Ilustração esquemática evidenciando a replicação do DNA	24
Figura 3 – Estruturas químicas da Camptotecina (4) e seus análogos Topotecano (5) e Irinotecano (6) formados a partir de modificações dos anéis A e B.	28
Figura 4 – Estruturas químicas do Paclitaxel (7) e do Docetaxel (8).....	29
Figura 5 – Estruturas químicas das Combretastinas A-1 (9) e A-4 (10).....	30
Figura 6 – Estruturas químicas da Podofilotoxina (11), do Etoposídeo (12) e do Tenoposídeo (13).....	31
Figura 7 – <i>Casearia sylvestris</i> Swarts.....	33
Figura 8 – Esqueleto básico de um clerodano diterpeno (14).....	35
Figura 9 – Núcleo básico das casearinas, seus derivados estruturais (15-34) e suas respectivas CI ₅₀ contra células V-79.....	36
Figura 10 – Estruturas das casearvestrinas A (35), B (36) e C (37).....	37
Figura 11 – Estruturas da caseamembrol A (38) e da caseamembrol B (39).....	38
Figura 12 – Estrutura dos diterpenos isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> : Ácido Hardiwickiico (40), Casearina U (41), Casearina U degradada (42), Casearina V (43), Casearina X (44) e Casearina Y (45).....	50
Figura 13 – Representação dos tipos de cometa, sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA.....	61
Figura 14 – Efeito da Casearina U (Cas U) na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de incubação.....	68
Figura 15 – Inibição da síntese de DNA pela Casearina U (Cas U), expresso em percentual (%), avaliada através da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação.	69
Figura 16 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica.	71

Figura 17 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência.....	73
Figura 18 – Atividade da Casearina U (Cas U) nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL, expresso em percentual (%), sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após de 24 h de incubação.	74
Figura 19 – Avaliação da atividade da Casearina U (Cas U) no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.....	75
Figura 20 – Ensaio de fragmentação de DNA por citometria de fluxo em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação.	77
Figura 21 – Percentual de fragmentação de DNA na presença de Casearina U (Cas U) determinado por citometria de fluxo em células HL-60 após 24 h de incubação.....	78
Figura 22 – Massa tumoral úmida de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	81
Figura 23 – Análise histológica do fígado de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	85
Figura 24 – Análise histológica dos rins de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	86
Figura 25 – Análise histológica do baço de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	87
Figura 26 – Análise histológica dos tumores de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento.....	88

ABREVIATURAS

BE/LA	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
BrdU	Bromodeoxiuridina
Cas U	Casearina U
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
°GL	Grau Gay-Lussac
HE	Hematoxilina/Eosina
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
Si C-18	Sílica de Fase Reversa - Octadecilsilano
TBS	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
U	Unidade
UV	Ultra-Violeta
ip	Via Intraperitoneal
v.o.	Via Oral

RESUMO

RESUMO

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DITERPENOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Swartz

Dissertação de Mestrado. Autor: **Paulo Michel Pinheiro Ferreira**. Orientadora: Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa. Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

Sabendo da importância de células de mamíferos em cultura para avaliar a citotoxicidade de novas substâncias com ação terapêutica, o presente trabalho determinou, inicialmente, a atividade citotóxica por MTT e hemolítica de 7 diterpenos clerodanos (ácido hardiwickiico, casearinas L, O, U e sua forma degradada, e casearinas X e Y) isolados a partir das folhas de *Casearia sylvestris* frente a um painel de 9 linhagens de células tumorais e a eritrócitos de camundongos. Na ausência de hemólise de todos os diterpenos, a Casearina U (Cas U) mostrou ser o mais ativo contra células tumorais. A atividade citotóxica da Cas U parece depender do anel formado pelos carbonos C-18 e C-19, uma vez que a hidrólise ácida e sua abertura levam à diminuição ou perda total da bioatividade. Posteriormente, os estudos de mecanismo de ação com a Cas U (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) revelaram redução concentração-dependente na viabilidade celular por azul de tripan e na síntese de DNA por incorporação de BrdU, sendo o mecanismo antiproliferativo da Cas U independente de ação inibitória sobre a topoisomerase I. As análises morfológicas feitas por hematoxilina/eosina e por incorporação de brometo de etídio/laranja de acridina mostraram alteração no padrão de morte em favorecimento da necrose proporcional à concentração, como desintegração membranar e picnose nuclear (1,6 µg/mL), embora tenha ocorrido também retração celular, condensação e fragmentação da cromatina nucleares (0,4 e 0,8 µg/mL), sinais condizentes com apoptose. Nos ensaios de fragmentação do DNA por citometria de fluxo e de genotoxicidade por cometa, a atividade da Cas U foi concentração-dependente e sem diferenciação entre células normais (linfócitos periféricos humanos) e cancerosas (HL-60). A avaliação antitumoral (10 e 25 mg/kg/dia, intraperitoneal; 25 mg/kg/dia, oral) em camundongos transplantados com Sarcoma 180 revelou atividade apenas na maior dose via intraperitoneal, causando redução de 90 % do crescimento tumoral e alterações renais incipientes e reversíveis, enfatizando a potencialidade da Cas U como molécula modelo para a síntese de novos compostos com propriedades anti-câncer.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*; clerodanos diterpenos; atividade antitumoral; Casearina U.

ABSTRACT

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTITUMOR POTENTIAL OF DITERPENES ISOLATED FROM LEAVES OF *Casearia sylvestris* Swarts

Master's dissertation. Author: **Paulo Michel Pinheiro Ferreira**. Supervisor: Dr. Cláudia do Ó Pessoa. Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.

Knowing the importance of mammalian cell culture in evaluating the cytotoxicity of new substances with therapeutic action, this work initially examined the cytotoxicity (by MTT assay) and hemolytic activity of 7 clerodane diterpenoids (acid hardiwickiico, casearins L, O and U and its degradation product, and casearins X and Y) isolated from leaves of *Casearia sylvestris* against a panel of 9 tumor cell lines and on mouse erythrocytes. All diterpenes studied showed no hemolytic effect, while casearin U (Cas U) was found to be the most active against tumor cells. Cytotoxic activity of Cas U seems to depend on the ring structure formed by carbons C-18 and C-19, since acid hydrolysis and ring opening led to a decrease or total loss of bioactivity. Subsequently, studies on the mechanism of action of Cas U (0.4, 0.8 and 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) revealed a concentration-dependent decrease in cell viability as determined by trypan blue dye exclusion and in DNA synthesis assayed by BrdU incorporation, where this antiproliferative mechanism of Cas U was not found to be dependent on an inhibitory action on topoisomerase I. Morphological analysis assessed by hematoxylin/eosin and ethidium bromide/acridine orange staining showed alterations in the pattern of cell death toward necrosis according to concentration, as seen by membrane disintegration and pyknotic nuclei (1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). However, there also were cell volume reduction, and condensation and fragmentation of nuclear chromatin, consistent signs with apoptosis. DNA fragmentation was examined by flow cytometry and genotoxicity determined with the comet assay, and Cas U activity was found to be dependent on concentration but did not differ between normal (human peripheral lymphocytes) and malignant (HL-60) cells. Antitumor activity of Cas U was tested in mice transplanted with sarcoma 180 (10 and 25 mg/kg/day, intraperitoneally; 25 mg/kg/day, orally), and only the highest intraperitoneal dose was found to effective, leading to 90 % inhibition of tumor growth, with reversible changes in the kidneys. These findings point to the potential of Cas U as a model molecule to synthesize new compounds with anticancer properties.

Key-words: *Casearia sylvestris*; clerodane diterpenoids; antitumor activity; Casearin U.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

A descrição mais velha de câncer em humanos foi encontrada num papiro egípcio do período de 3.000 a 1.500 anos a. C, o qual se referia a tumores de mama. Na Grécia de 400 anos a. C., Hipócrates foi considerado como a primeira pessoa a reconhecer diferenças entre tumores malignos e benignos (REDDY *et al.*, 2003).

Atualmente, a definição de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem quase 200 tipos de cânceres, correspondendo aos vários sistemas e células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadirem tecidos e órgãos, próximos ou distantes de onde se originaram (INCA, 2005).

Com uma incidência anual estimada em 6 milhões de casos, o câncer é a segunda causa de morte, atrás apenas de mortes relacionadas a doenças cardiovasculares (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Por ter se tornado estigma de mortalidade e dor, o câncer atemoriza a sociedade atual (DONNICI *et al.*, 2004), sendo responsável por 25 % das mortes. Acredita-se que até 2020 mais 20 milhões de novos casos irão surgir (CRUK, 2006). Os homens apresentam mais casos de câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, enquanto as mulheres sofrem, principalmente, de câncer de mama, cólon, reto e estômago (REDDY *et al.*, 2003).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerá um total de 472.050 novos casos de câncer, sendo 234.570 casos para o sexo masculino e 237.480 para o sexo feminino. Somente no estado do Ceará surgirão 21.100 novos casos (4,47 % do total) (INCA, 2005).

1.2. Fatores de Risco X Carcinógenos

Os fatores de risco podem ser hereditários ou ambientais. Assim, o câncer pode ser o resultado da predisposição genética, da dieta e do meio ambiente. Pelo menos 35 % dos cânceres são causados pela dieta, mas nos casos de câncer de cólon, a dieta chega a ser responsável por até 80 %. Quando se adiciona álcool e cigarros a esta dieta, a percentagem pode ser de 60 %. A predisposição genética é responsável por aproximadamente 20 % dos cânceres. Logo, a grande maioria dos casos de câncer está associada a fatores ambientais (REDDY *et al.*, 2003). Em 1981, Doll & Peto (1981) publicaram um grande estudo mostrando que a maioria dos carcinógenos

ambientais é representada pela poluição (encontrada no ar e na água), radiação e medicação. Então, baseando-se em observações epidemiológicas que imigrantes tendem a adquirir as taxas de câncer do novo país, eles concluíram que essas taxas podem ser atribuídas, em parte, a fatores ambientais como fumo, dieta, comportamento sexual e reprodutivo, infecções e exposições ocupacionais.

Já em 480 a.C. Hipócrates reconheceu que muitos aspectos que hoje chamamos de ‘estilo de vida’ refletem na saúde humana. Ele disse: “Uma boa saúde requer o conhecimento da constituição primária do homem e do poder de muitos alimentos, ambos naturais e resultantes da habilidade humana”. O que Hipócrates chamou de ‘constituição primária do homem’ hoje chamamos de genética, e o que ele classificou como ‘resultante da habilidade humana’ equipara-se à dieta atual (REDDY *et al.*, 2003).

Dessa forma, a maioria dos cânceres humanos resulta da exposição à carcinógenos ambientais. Estes incluem produtos químicos, radiação e vírus (DOLL & PETO, 1981). Os carcinógenos podem ser divididos em várias classes, como mostrado na **tabela 1**.

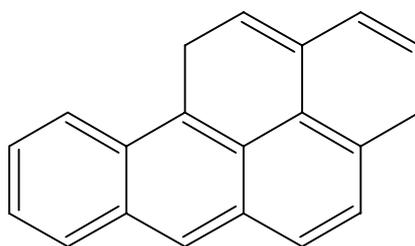
Tabela 1 – Classes de carcinógenos.

Classe	Exemplos
1. Carcinógenos Genotóxicos	
Primários, agentes alquilantes diretos	Dimetilsulfato, β -propiolactonel, etileno imina, safrol
2. Pró-carcinógenos	
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Benzo[a]pireno
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina
Hidrazina	1,2-Dimetilhidrazina
Inorgânico	Cádmio, plutônio
3. Carcinógenos Epigenéticos	
Promotores	Ésteres de forbol, sacarina, ácidos biliares
Hormônios	Estrógenos
Imunossupressores	Análogos da purina
Cocarcinógenos	Catecol
4. Não-classificados	
Proliferadores de Peroxissoma	Ésteres de ftalato

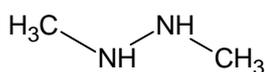
Fonte: REDDY (2003).

A diversidade molecular dos compostos iniciadores de câncer (**Figura 1**) varia desde metais a compostos químicos orgânicos complexos, ocorrendo também variação na potência. Estas variações sugerem que mais de um mecanismo está envolvido na carcinogênese (REDDY *et al.*, 2003).

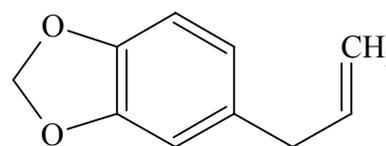
O processo de carcinogênese é, quase sempre, muito lento, podendo demorar anos para que a célula transformada origine um tumor clinicamente detectável. Esse processo inclui, basicamente, três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação se dá através da exposição de células normais a carcinógenos. A consequência disso, ou seja, a transformação pode permanecer dormente e levar anos para se manifestar. No segundo estágio, a célula iniciada sofre um longo período de contato com o agente transformador. Neste momento, o estilo de vida pode ter efeitos benéficos e evitar o desenvolvimento de cânceres. A progressão já é caracterizada pela proliferação descontrolada das células malignas, evoluindo para as manifestações clínicas e metástases (REDDY *et al.*, 2003; DONNICI *et al.*, 2004).



Benzopireno (1)



Dimetilhidrazina (2)



Safrol (3)

Figura 1 – Estrutura de alguns carcinógenos: Benzopireno (1), Dimetilhidrazina (2) e Safrol (3).

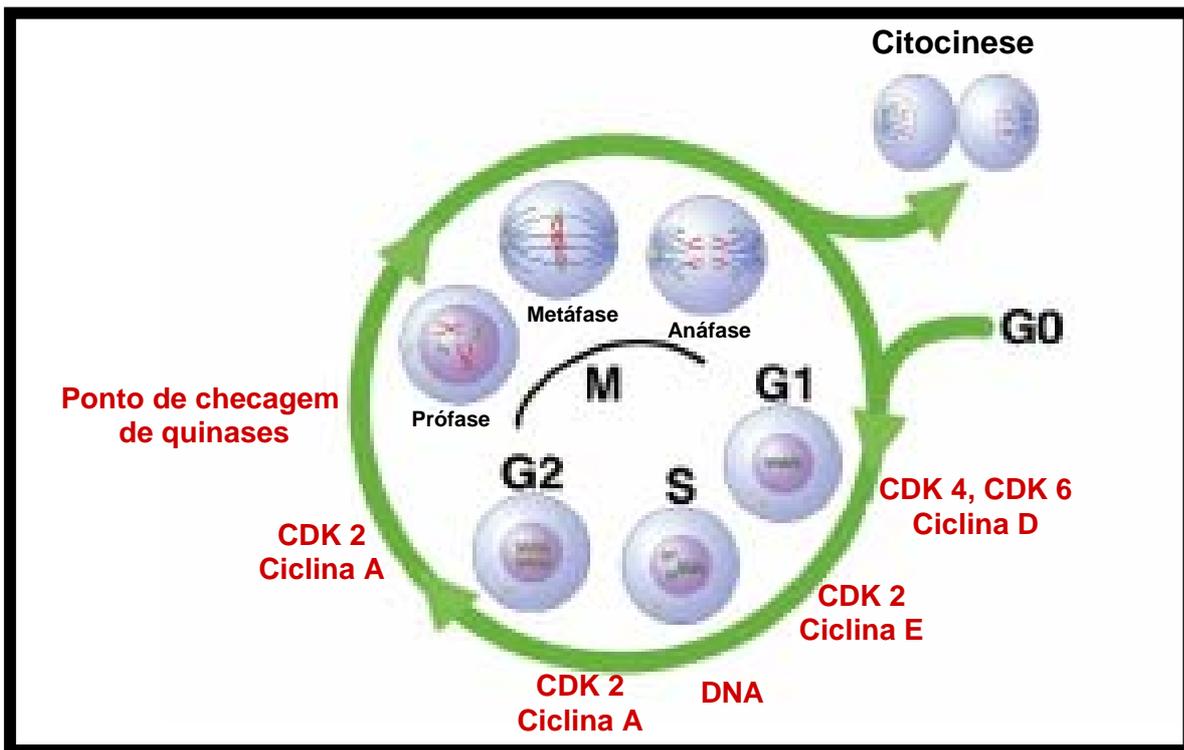
1.3. O Ciclo Celular e o Câncer

A integridade contínua de todo organismo depende da habilidade de seus componentes celulares de manter a fidelidade do material genético durante a divisão celular. A principal tarefa do ciclo celular é, portanto, permitir e garantir a replicação do DNA livre de erros, a segregação cromossômica e a citocinese. Em respostas a sinais proliferativos extracelulares, a célula sai do estado de repouso G₀ e entra no ciclo celular ao ultrapassar o ponto de restrição G₁, no qual a célula se prepara para duplicar o DNA (**Figura 2**). Além deste ponto, o programa de ciclo celular se torna autônomo e sua fidelidade é questionada em vários estágios (FISCHER *et al.*, 2004).

Os pontos de checagem operam durante todo o ciclo, especialmente antes (transição G₁-S), durante e depois da síntese de DNA (S), no momento em que as células entram em G₂ e quando elas se preparam para a mitose (M). Mesmo durante a mitose, a separação centrossômica, a condensação cromossômica e a formação de fusos mitóticos são pré-requisitos indispensáveis para a separação correta das cromátides-irmãs e para o deslocamento dos cromossomos para as células filhas. Todo esse processo requer um intenso controle por retroalimentação com o objetivo de assegurar que todas as etapas moleculares sejam sequenciais e orientadas corretamente. Essa progressão ordenada através das diversas fases do ciclo é orquestrada pelas ciclinas, quinases ciclina-dependentes (CDK's) e por seus inibidores (FISCHER *et al.*, 2004).

Sendo o câncer uma doença do ciclo celular por excelência, erros somáticos de mutação podem causar transformação e muitos dos genes afetados estão direta ou indiretamente envolvidos na proliferação celular. De fato, os processos oncogênicos exercem mais efeito sobre os reguladores da fase G₁. As células normais dependem de estimulação mitogênica para entrar no ciclo celular, já as células cancerosas permanecem neste ciclo indefinidamente. Além disso, os pontos de checagem são freqüentemente ignorados nas células transformadas, resultando em instabilidade genética adicional e vantagens proliferativas comparadas às células normais. Essa situação sugere que restabelecimento do controle do ciclo com drogas que agem sobre os pontos de regulação pode ser uma estratégia viável na terapia anticâncer. (FISCHER *et al.*, 2004).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. Assim, por exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias; com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, à morte do paciente (DONNICI *et al.*, 2004).



Fonte: FISCHER *et al.*(2004)

Figura 2 – Ilustração esquemática evidenciando a replicação do DNA, a segregação cromossômica, a divisão celular, as ciclinas e as quinasas ciclina-dependentes envolvidas na regulação da transição entre as etapas do ciclo celular.

1.4. Produtos Naturais

A natureza é uma fonte atrativa de compostos farmacologicamente ativos candidatos ao tratamento de patologias devido a enorme diversidade química encontrada nas milhões de espécies de plantas, animais e microorganismos (ROCHA *et al.*, 2001).

Os produtos naturais têm sido ferramentas valiosas para a compreensão da biossíntese e como base para o desenvolvimento de novos fármacos. Entre 1981 e 2002, das 1.031 novas entidades químicas aprovadas como drogas pelo 'US Food and Drug Administration (FDA)', 5 % foram produtos naturais e 23 % foram derivados de produtos naturais. No mesmo período, outros 20 % foram moléculas sintéticas que mimetizam as naturais (NEWMAN *et al.*, 2003). Apesar do interesse na modelagem molecular, na química combinatória e outras técnicas de síntese química pelas instituições de pesquisa e indústrias farmacêuticas, os produtos naturais e, particularmente, as plantas medicinais, permanecem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra doenças infecciosas (fúngicas ou bacterianas), câncer, dislipidemias e imunomodulação (ROCHA *et al.*, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003). Em 2001 e 2002, aproximadamente 25 % das drogas mais vendidas no mundo foram produtos naturais ou derivadas destes (BUTLER, 2004).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000). As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985). As principais classes de constituintes químicos de plantas que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MATOS, 1988).

1.4.1. Drogas Anti-câncer originadas de Plantas

A descoberta de drogas a partir de plantas medicinais possui um importante papel no tratamento do câncer e, de fato, muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados tem sido direcionadas ao combate do câncer (NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004). De todas as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40 % foram produtos naturais ou derivados de produtos naturais e outros 8 % foram substâncias sintéticas inspiradas em moléculas naturais (NEWMAN *et al.*, 2003).

A camptotecina, um alcalóide natural (4), foi primeiramente isolado do caule da planta ornamental chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) (WALL *et al.*, 1966). Com potente atividade citotóxica, a camptotecina inibe a topoisomerase I, agindo principalmente contra tumores de pâncreas e de cólon (REDINBO *et al.* 1998; STAKER *et al.*, 2002). Ao ser aprovado pela FDA no início da década de 1970, a camptotecina causou efeitos adversos imprevisíveis, como mielossupressão, vômito, diarreia e cistite hemorrágica, levando à interrupção dos estudos na fase II em 1972, embora tenha apresentado boa atividade antitumoral em pacientes com câncer gastrointestinal (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Devido a sua severa toxicidade, muitas pesquisas têm tentado sintetizar derivados menos tóxicos. A manipulação estrutural produziu análogos solúveis em água, incluindo o Topotecan (Hycamptin®) (5) e o Irinotecan (Camptosar®) (6), os únicos aprovados para uso clínico (ORMROD & SPENCER, 1999).

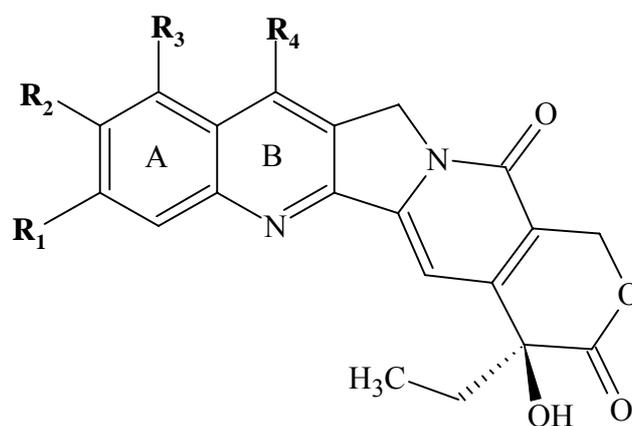
O Paclitaxel (Taxol®) (7), um diterpenóide complexo polioxigenado, foi isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) durante um extensivo programa de ‘screening’ por agentes antineoplásicos em materiais vegetais (WANI *et al.*, 1971). Mostrou resultados promissores nas fases I e II em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e foi aprovado pela US FDA na dose de 135 mg/m² para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER & VERMORKEN, 1998). Sua principal desvantagem é a baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água, possuindo como principal modo de ação a estabilização dos microtúbulos, ao se ligar à tubulina sem permitir a despolimerização dos microtúbulos ou ao interferir a reunião organizada das tubulinas (SCHIFF *et al.*, 1979; HORTWIZ, 2004). Células cancerosas não possuem um ponto de checagem para detectar a ausência de fusos mitóticos verdadeiros e tentam se dividir, o que leva à morte (NICOLAOU *et al.*, 1994).

Apesar de ter sido a droga mais vendida no ano de 2000, o paclitaxel causa fortes náuseas, formigamento nos pés e mãos, leucopenia e trombocitopenia. Docetaxel (Taxotere®) (8), um análogo estrutural, possui propriedades farmacológicas melhores que o taxol (atividade antitumoral e solubilidade aquosa) (BISSERY *et al.*, 1991; RINGEL & HORWITZ, 1991), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão (PAZDUR *et al.*, 1993), embora cause supressão da medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos e alopecia. Com solubilidade 1.800 vezes maior que o paclitaxel, a pró-droga Isotaxel é uma molécula inativa, mas após 12 min em pH fisiológico, ocorre a migração de um grupamento acil N-O intramolecular, convertendo isotaxel a taxol (HAYASHI *et al.*, 2003).

Como moléculas antitumorais, podemos citar ainda as Combretastinas, agentes antimitóticos encontrados na casca da árvore africana *Cobretum caffrum*. As combretastinas A-1 (CA-1) (9) e a

A-4 (CA-4) (**10**) são derivados de estilbeno possuindo dois anéis separados por uma ligação dupla de carbono. A combretastina mais potente, a CA-4 [cis-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil) eteno], é uma estilbeno simples que compete com o sítio de ligação da colchicina em microtubulinas, mostrando potente citotoxicidade contra uma variedade de linhagens celulares de câncer (McGOWN & FOX, 1990; EL-ZAYAT *et al.*, 1993). Esse composto age contra cânceres de cólon, pulmão e leucemias, possuindo uma CL₅₀ de 0,007 µM contra a linhagem murina de células leucêmicas L1210. A (CA-) (OHSUMI *et al.*, 1998).

Índios americanos usavam extratos das raízes da *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae) no tratamento de cânceres de pele e verrugas venéreas. Seu principal constituinte, a podofilotoxina (**11**), um lignano bioativo, é efetivo contra tumores de Wilms, de pulmão, linfoma não-Hodgkin e contra vários cânceres genitais (UTSUGI *et al.*, 1996; SUBRAHMANYAM *et al.*, 1998). Ao se ligar à tubulina, a podofilotoxina causa quebras na fita do DNA durante a fase G₂, parando, assim, o ciclo celular na metáfase devido ao bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II (GORDALIZA *et al.*, 2004). Apesar disso, a aplicação prática foi frustrada por inúmeros efeitos colaterais (náuseas, vômito, danos a tecidos normais etc.). Modificações estruturais resultaram em duas drogas semi-sintéticas mais potentes e menos tóxicas, etoposídeo (**12**) e tenoposídeo (**13**), as quais são mundialmente prescritas para o tratamento de linfomas, leucemia aguda, teratomas, cânceres de ovário, pulmão, bexiga e cérebro (SCHACTER, 1996).



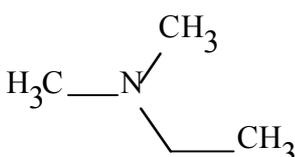
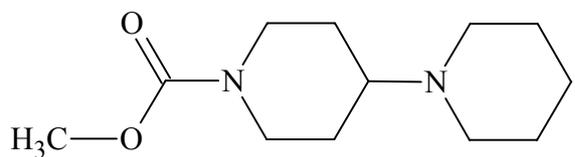
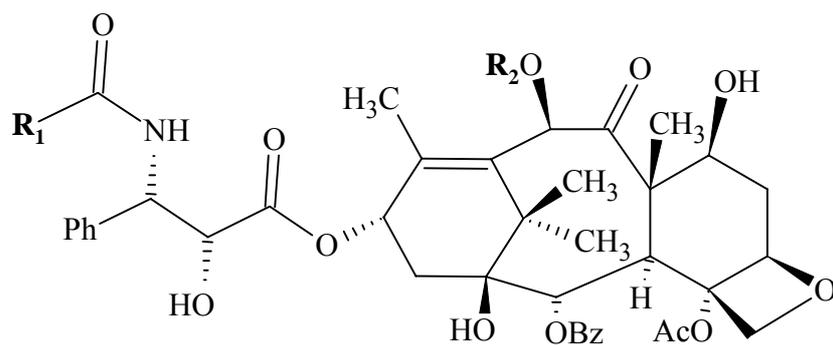
	R₁	R₂	R₃	R₄
Camptotecina (4)	H	H	H	H
Topotecano (5)	H		CH ₂ N(CH ₃) ₂	H
Irinotecano (6)	H		H	Etil

Figura 3 – Estruturas químicas da Camptotecina (**4**) e seus análogos Topotecano (**5**) e Irinotecano (**6**) formados a partir de modificações dos anéis A e B.



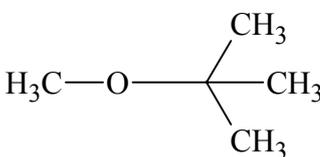
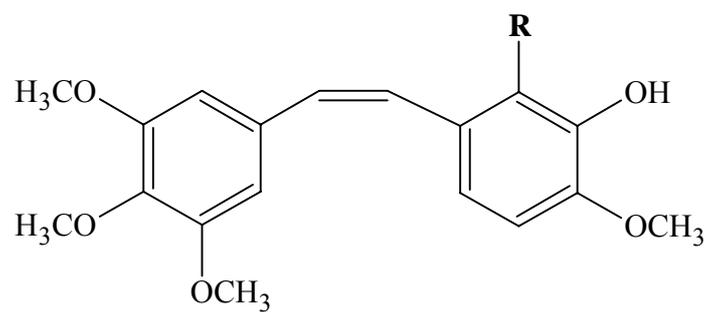
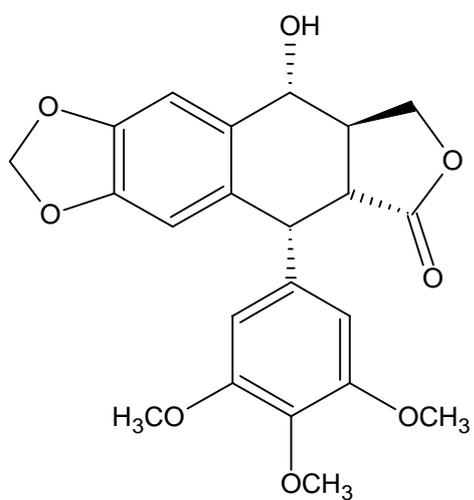
	R₁	R₂
<p>Paclitaxel (7)</p>	$-\text{C}_6\text{H}_5$	Ac
<p>Docetaxel (8)</p>		H

Figura 4 – Estruturas químicas do Paclitaxel (7) e do Docetaxel (8).

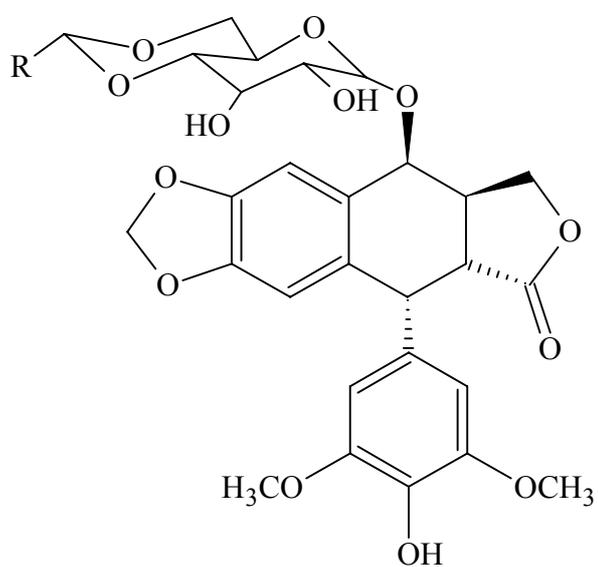


	R
Combretastina A-1 (9)	OH
Combretastina A-4 (10)	H

Figura 5 – Estruturas químicas das Combretastinas A-1 (**9**) e A-4 (**10**).



Podofilotoxina (11)



R

Etoposídeo (12)

-CH₃

Tenoposídeo (13)

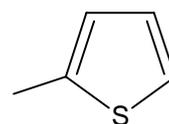


Figura 6 – Estruturas químicas da Podofilotoxina (11), do Etoposídeo (12) e do Tenoposídeo (13).

1.5. Planta Estudada: *Casearia sylvestris* Swarts

Casearia sylvestris Swarts (**Figura 7**) pertence à família Flacourtiaceae, a qual é composta de 89 gêneros e 1300 espécies encontradas em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo. Somente o gênero *Casearia* possui quase 1000 espécies conhecidas (MOSADDIK *et al.*, 2004).

Muito comum nas Américas, a espécie *C. sylvestris* ocorre desde Cuba e Porto Rico passando pelo Brasil, Bolívia e Peru até Argentina e Uruguai. Seu gênero é representado por 70 espécies em terras brasileiras, sendo encontrada nos estados de Amazonas, próximo ao rio Tapajós, e de São Paulo, nos arredores da capital (MAISTRO *et al.*, 2004). Anatomicamente, suas estruturas vegetativas e reprodutivas são caracterizadas pela presença de inclusões cristalinas e células glandulares repletas de óleos essenciais, inclusive suas folhas. Estas são um tanto assimétricas, persistentes, glabras ou ásperas, pecioladas, lanceoladas, serreadas, alternas, brilhantes em cima, de 6-12cm de comprimento por 3-5cm de largura. As flores são pequenas e numerosas, de colorações esverdeadas, actinomorfas, diclamídeas e hipóginas. Os frutos são cápsulas septicidas com sementes envolvidas por arilo vermelho. Floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro, prolongando-se até meados de novembro (ABSY & SCAVONE, 1973).

No Brasil, *C. sylvestris* é muito conhecida como guaçatonga, uma palavra originária do tupi-guarani, o que sugere o antigo uso da planta pelas comunidades indígenas brasileiras. Outros nomes populares são herva-de-lagarto, língua-de-giú e cafezinho-do-mato (HOEHNE, 1939).



Folhas



Inflorescência



Frutos

Fonte: BLANCO (2006)

Figura 7 – *Casearia sylvestris* Swartz.

1.5.1. Propriedades Farmacológicas

A família Flacourtiaceae tem uma longa história de uso no tratamento da lepra e de outras doenças de pele (HEGNAUER, 1966). A planta *C. sylvestris* possui inúmeras aplicações populares, muitas das quais já corroboradas pela comunidade científica.

Partes aéreas da planta mostram ação antipirética semelhante àquela encontrada na casca, ação anti-diarréica e contra herpes de contato. O extrato das folhas tem uso corrente na medicina popular brasileira como antiséptico, cicatrizante e anestésico tópico. Certamente, a ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* explica o uso popular no tratamento de feridas, pequenas ulcerações de pele e diarreia (HOEHNE, 1939). Investigações clínicas demonstraram cicatrização progressiva de lesões intra e extra-orais causadas por herpes simples depois da aplicação tópica de extratos de *C. sylvestris* (CAMARGO, 1993).

Ruppelt *et al.* (1991) provaram que o extrato alcoólico inibe a difusão de azul de Evans para a cavidade peritoneal e prolonga a fase aguda do processo inflamatório quando administrado na dose de 300 mg/kg (ALMEIDA, 2000). Inúmeras pesquisas têm realçado essa atividade antiinflamatória de extratos preparados a partir das folhas de guaçatonga. Rica fonte de compostos inibidores de fosfolipase A₂, o extrato aquoso das folhas inativa as atividades tóxicas e enzimáticas exibidas por uma variedade de venenos de cobras. Esses inibidores são efetivos, principalmente, contra as classes I (Família Elapidae) e II (Família Viperidae) de fosfolipases A₂. Assim, o extrato inibe a atividade miotóxica de venenos de cobras do gênero *Bothrops* e de outras miotoxinas, além de prevenir parcialmente a formação de edema e aumentar a sobrevivência dos animais tratados com doses letais de miotoxinas puras com atividade de fosfolipase A₂ (BORGES *et al.*, 2000).

Ao estudar o efeito de decocto de 5 % das folhas de *C. sylvestris* no reparo de defeito femoral preenchido com matriz óssea bovina desvitalizada, percebeu-se uma menor quantidade de formação óssea, certamente resultado da presença de compostos fitoquímicos com ação antiinflamatória, de forma semelhante ao dos fármacos antiinflamatórios não esteroidais, que promovem inibição da síntese de prostaglandinas, causando diminuição da ativação de macrófagos, fibroblastos e formação de fibras colágenas, como efeito inibitório sobre a osteogênese (SASSIOTO *et al.*, 2004).

1.5.2. Clerodanos Diterpenos

A grande maioria dos compostos isolados das folhas de *Casearia* sp. é representada por clerodanos (**14**), um novo grupo de diterpenóides com atividade biológica. Há um aumento constante do número de clerodanos diterpenóides descobertos graças a ensaios de fracionamento bioguiado, mostrando que muitos deles, especialmente os ricos em oxigênio, possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas e de repelência de insetos (OBERLIES *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004).

Os clerodanos diterpenos isolados das folhas de *C. sylvestris* são mais conhecidos como casearinas, existindo quase o alfabeto inteiro destas (A-T) (**15-34**) (MORITA *et al.*, 1991). Além das casearinas, novos diterpenos também têm sido encontrados, como as casearvestrinas A (**35**), B (**36**) e C (**37**) em *C. sylvestris* (OBERLIES *et al.*, 2002) e as caseamembróis A (**38**) e B (**39**) em *C. membranacea* (SHEN *et al.*, 2004).

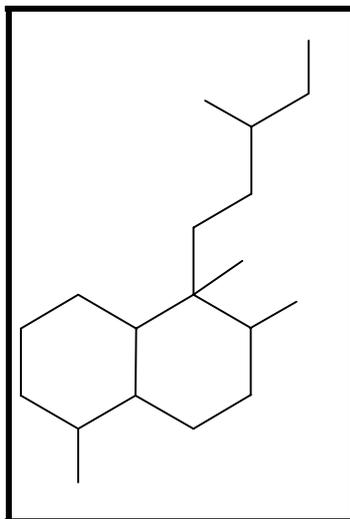
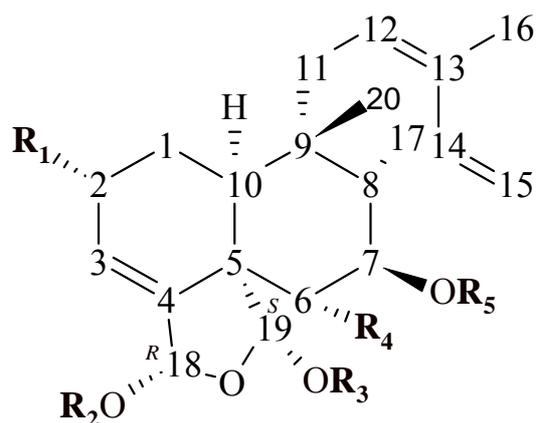


Figura 8 – Esqueleto básico de um clerodano diterpeno (**14**).



Casearinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	CI ₅₀ (μmol/L) ^a
A (15)	OMe	Ac	Ac ^b	OH	Bu ^c	1,0
B (16)	OMe	Ac	Ac	OAc	Bu	8,5
C (17)	OH	Ac	Ac	OAc	Dc ^d	0,77
D (18)	OH	Bu	Ac	OH	Bu	1,8
E (19)	OH	Et	Ac	OH	Dc	4,7
F (20)	OH	Et	Ac	OH	Bu	29
G (21)	OMe	Ac	Ac	H	Bu	0,17
H (22)	OH	Ac	Ac	H	Bu	0,37
I (23)	OH	Ac	Bu	H	Bu	0,51
J (24)	OMe	Bu	Ac	OH	Bu	1,1
K (25)	OAc	Ac	Ac	OH	Bu	0,52
L (26)	OMe	Bu	Ac	OAc	H	1,6
M (27)	OH	Bu	Bu	OAc	H	1,8
N (28)	OMe	Ac	Bu	OAc	Bu	5,9
O (29)	OMe	Bu	Ac	OAc	Bu	6,0
P (30)	OMe	Ac	Ac	OAc	Ac	7,8
Q (31)	OH	Ac	Ac	OAc	Bu	4,3
R (32)	=O	Ac	Ac	OH	Bu	5,4
S (33)	OMe	=O	Ac	H	Bu	^e
T (34)	OMe	OAc	Ac	H	Bu	^e

Fonte: MORITA *et al.* (1991)

^a Atividade citotóxica contra a linhagem V-79 (células de pulmão de hamster chinês);

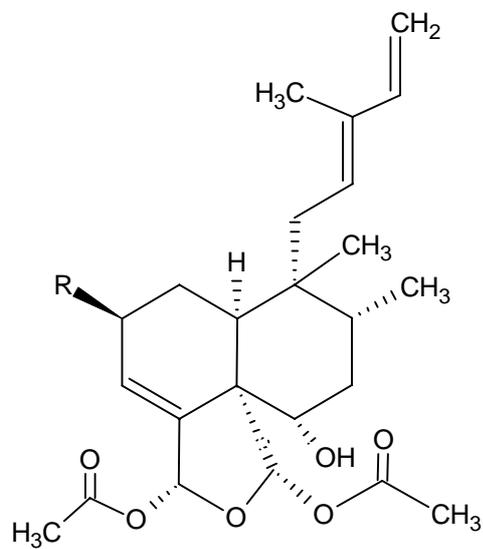
^b Acetato;

^c Butilato;

^d Decanoato;

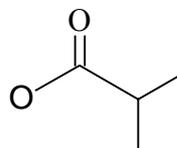
^e Não determinado.

Figura 9 – Núcleo básico das casearinas, seus derivados estruturais (15-34) e suas respectivas CI₅₀ contra células V-79.

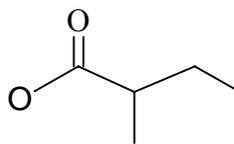


R

Casearvestrina A (**35**)



Casearvestrina B (**36**)



Casearvestrina C (**37**)

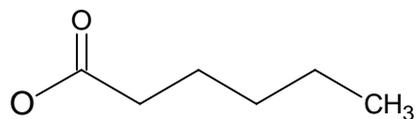
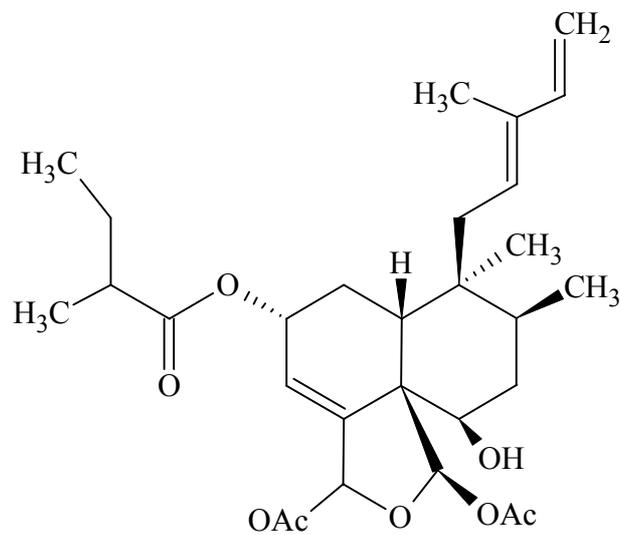
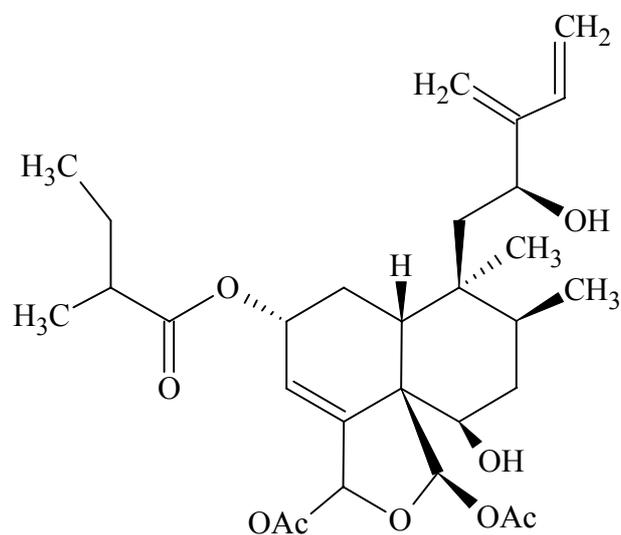


Figura 10 – Estruturas das casearvestrinas A (**35**), B (**36**) e C (**37**).



Caseamembrol A (38)



Caseamembrol B (39)

Figura 11 – Estruturas da caseamembrol A (38) e da caseamembrol B (39).

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2.3. Específicos

- Determinar as atividades citotóxica e hemolítica dos diterpenos em células tumorais e em eritrócitos de camundongos, respectivamente.
- Avaliar o provável mecanismo de ação da Casearina U, usando células leucêmicas HL-60 como modelo e através do ensaio de inibição da topoisomerase I.
- Comparar a genotoxicidade da Casearina U entre células HL-60 e linfócitos periféricos humanos.
- Determinar a atividade antitumoral *in vivo* da Casearina U em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Fluxo laminar, VECO®

Incubadora de células, (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microondas, Panasonic®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Microscópio de fluorescência, Olympus®

Micrótomo, Slee Mainz®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences®

Sistema de Fotodocumentação, Kodak®

Soluções, Reagentes e Fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etilico	-	Vetec®
Agarose 1 %	0,5 g de agarose Água deionizada q. s. p. 50 mL	FMC - Bioproducts®
Agarose LMP 1,5 %	1,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Agarose NMP 0,5 %	0,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako®
Anticorpo biotinilado anti- imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -

Camptotecina	-	TopoGEN®
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB 1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2 µL de H ₂ O ₂	Immunotech® Proquímios® Proquímios®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac®
EDTA	-	Qeel®
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina 80 mL de Álcool etílico 0,5 mL de Ácido acético 20 mL de H ₂ O	Doles® -
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma® Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®

	H ₂ O q. s. p. 1 L	
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina	Doles®
	10 mL de Glicerina	Labsynth®
	25 g de Sulfato de alumínio	Labsynth®
	0,1 g de Iodeto de potássio	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 500 mL de solução	-
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo	Boehringer®
	PBS q.s.p. 50 mL	
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL)	Fluka®
	H ₂ O q.s.p. 10 mL de solução	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF	
	10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT	Sigma®
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0,600g	Laboratórios
	Cloreto de Potássio = 0,030g	Biosintética®

	Cloreto de Cálcio 2H ₂ O = 0,020g Lactato de Sódio = 0,30g Água q. s. p. 100 mL	
Sulfato de Gentamicina	-	Gentamicin Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5M, EDTA 100mM Tris 10mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH = 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %	-
Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H ₂ O q.s.p 1 L de solução	Labsynth® Reagen® -
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H ₂ O	-
Tampão de corrida 50 X (TAE)	242 g de TRIS 57,1 mL de ácido acético glacial	-

	100 mL de EDTA 0,5 M	
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth®
	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H ₂ O	-
Topoisomerase I Drug Screening Kit	-	TopoGEN®
	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar®
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído	Dinâmica®
	H ₂ O q. s. p. 1 L	
5- Fluorouracil	2,5 mg/1 mL	ICN Farmacêutica®

Modelos biológicos

Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (**Tabela 2**)

Linfócitos humanos isolados de voluntários sadios

3.2. Métodos

3.2.1. Material vegetal

As folhas de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo-SP) em março e julho de 2004. Exsiccatas dos indivíduos coletados (AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19) foram depositadas no herbário Maria Eneida P. Kaufmann do Instituto Botânico do Estado de São Paulo. O material vegetal foi seco de forma mista (à temperatura ambiente e em estufa à 40 °C) por 7 dias. Sua fragmentação foi realizada em moinho de facas.

3.2.2. Extração e isolamento das casearinas L, O, U e V

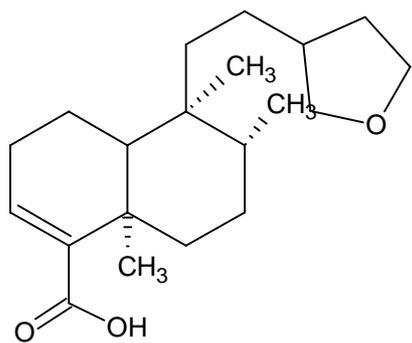
O isolamento e identificação das casearinas foi realizado no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara-SP). As folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (20,5 kg) foram extraídas com cerca de 200 L de etanol em extrator (aço inox; sistemas de circulação de solvente e de aquecimento; capacidade 300 L) à 40°C por cerca de 24 h. O extrato líquido foi concentrado sob pressão reduzida e, em seguida, seco em capela, fornecendo 1.540,0 g de extrato seco. Parte deste extrato (473,6 g) foi fracionada através de uma EFS utilizando carvão ativo/sílica gel 60-200µm (1:1) como fase estacionária e os eluentes Hex/AcOEt (95:05), AcOEt e MeOH, fornecendo 3 frações. Análises por RMN de ¹H revelaram que apenas EFS2 (AcOEt, 124,1 g) apresentou os sinais característicos de casearinas. 16,0 g da fração EFS2 foram submetidos a fracionamento por CC em sílica gel 40-63 µm num gradiente de Hex/AcOEt/IPA 78:20,5:1,5 até 60:37,2:2,7, fornecendo 45 frações. As frações CC8+9 (1.328,0mg) e CC15+16+17+18+19 (3.100,0mg) foram submetidas à CLAE preparativa (C-18, 72% MeOH, modo isocrático, fluxo 15,0 mL/min, λ =235 nm) fornecendo as casearinas U (650,0 mg), V (850,0mg), X (13 mg) e Y (15 mg), respectivamente. O fracionamento por CLAE preparativa (C-18, 74% MeOH, modo isocrático, fluxo 15,0 mL/min, λ =235 nm) da fração 6CC (507,1mg) resultou na purificação das casearinas L (43,0 mg) e O (128,5mg). O ácido hardwickiico foi obtido da fração AcOEt, obtida da EFS do extrato bruto em carvão ativo/sílica. Essa fração foi submetida à CC em sílica gel eluída sequencialmente com hexano/AcOEt e AcOEt. A fração 11, eluída com hexano/AcOEt 1:1, foi submetida a EFS em C18 eluída com MeOH/água 98:02, fornecendo 29 mg do ácido hardwickiico.

A identificação das substâncias foi realizada através de experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

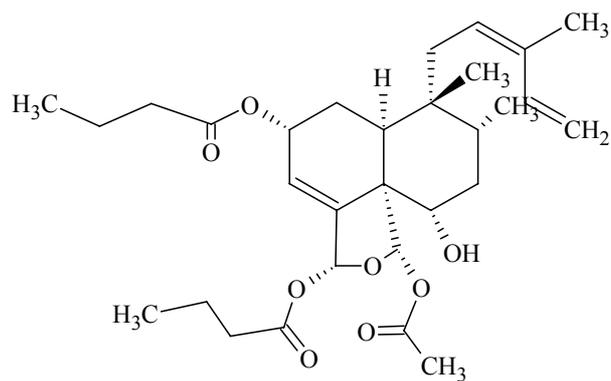
3.2.3. Preparação do produto de degradação da casearina U

A abertura do anel diacetálico da casearina U foi obtido através da solubilização da casearina U em clorofórmio (20 mg/mL). Após 4 dias o clorofórmio foi evaporado e o produto de degradação obtido e caracterizado por RMN de ^{13}C .

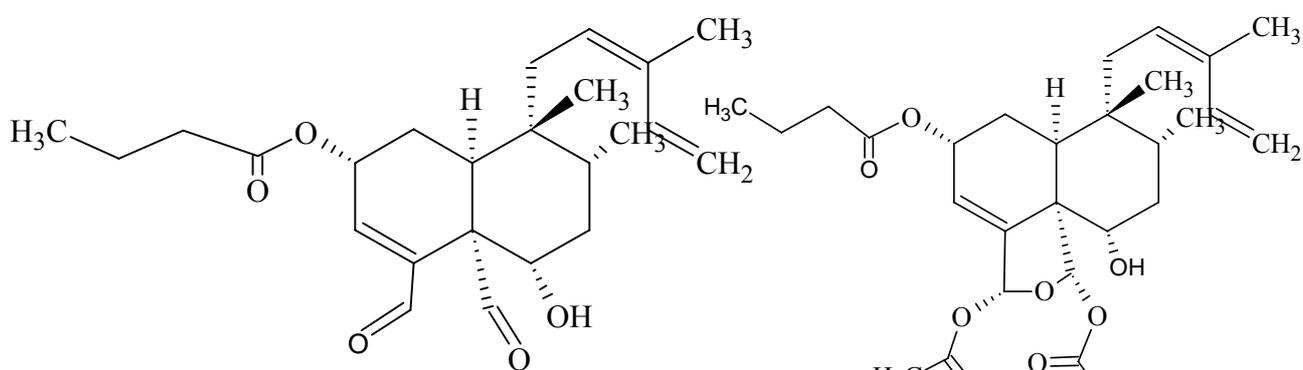
As estruturas dos compostos isolados das folhas de *C. sylvestris* estão demonstradas na **figura 12**. As casearinas L (**26**) e O (**29**), também isoladas e estudadas neste trabalho, podem ser vistas na **figura 9**.



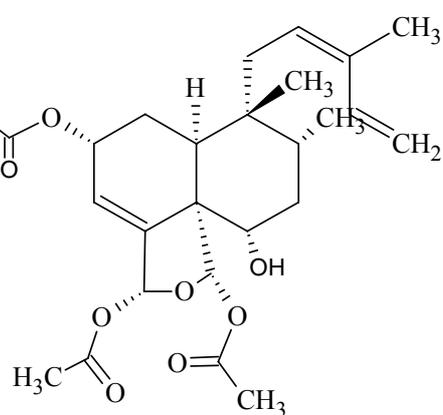
Ácido Hardiwickiico (40)



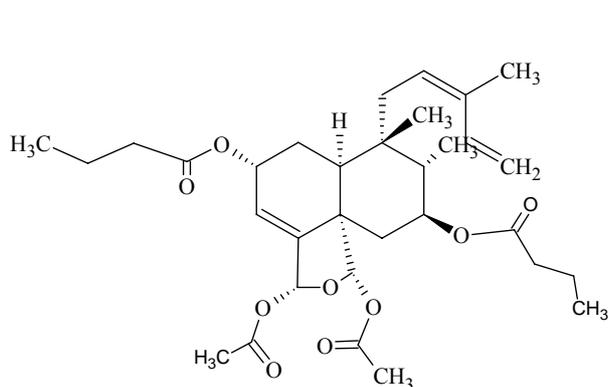
Casearina U (41)



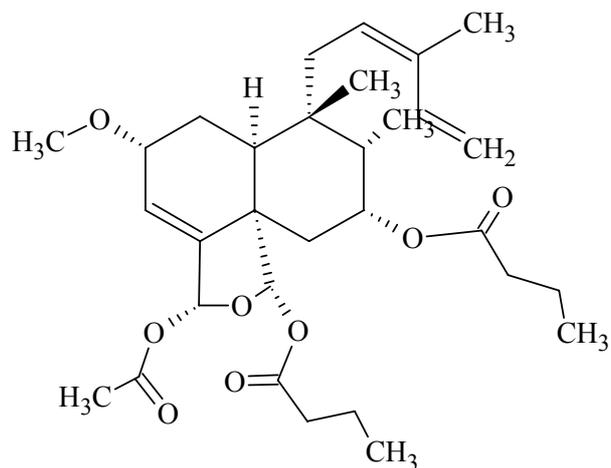
Casearina U degradada (42)



Casearina V (43)



Casearina X (44)



Casearina Y (45)

Figura 12 – Estrutura dos diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris*: Ácido Hardiwickiico (40), Casearina U (41), Casearina U degradada (42), Casearina V (43), Casearina X (44) e Casearina Y (45).

3.2.4. Determinação da Atividade Citotóxica *in vitro*

Sete clerodanos diterpenos – ácido hardiwickiico, casearinas L, O, U e sua forma degradada, X e Y – foram avaliados quanto a sua capacidade citotóxica frente a 9 linhagens de células tumorais (**Tabela 2**). Dentre os compostos inéditos (ácido hardiwickiico, V, X e Y), apenas a casearina V não foi estudada neste trabalho. A citotoxicidade foi avaliada através do método de MTT (MOSMANN, 1983), o qual vem sendo utilizado no programa de ‘screening’ do ‘National Cancer Institute - NCI’ dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ céls/mL.

As substâncias previamente diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 5 mg/mL foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,039-25 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço). O quimioterápico doxorubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 72 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspensionado em 150 µL de DMSO e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan.. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 2 – Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
K-562	Leucemia mielocítica crônica humana	$0,3 \times 10^6$
CEM	Leucemia linfocítica humana	$0,5 \times 10^6$
MDA-MB 435	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
MDA-MB 231	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$
PC-3	Carcinoma de próstata humano	$0,1 \times 10^6$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
B16	Melanoma murino	$0,6 \times 10^5$

Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em triplicata. Suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

3.2.5. Determinação da Atividade Hemolítica em Eritrócitos de Camundongos

Esta metodologia, segundo Costa-Lotufu *et al.* (2002), permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10 %. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL da substância teste. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1 % (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

3.3. Estudos de Mecanismo de Ação

3.3.1. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem HL-60, na concentração de 0,3 x 10⁶ céls/mL, foram incubadas por 24 h com a Cas U. As concentrações utilizadas de Cas U (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) foram estimadas a partir do valor da CI₅₀ encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular para o

período de 24 h de incubação. Foram retirados 90 µL da suspensão de células e adicionado a 10 µL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo.

Análise dos dados

Os dados foram expressos como da média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) com nível de significância de 5 % (p < 0,05).

3.3.2. Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com a Cas U (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular para o período de 24 h de incubação. Três horas após a adição do BrdU na cultura de células, lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido acético (7:1,5) por 5 min. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 min e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 min. Foi adicionado o cromógeno DAB por 1-5 min e, em seguida, removido com água destilada. Em seguida, são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se hematoxilina (0,1 %). Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

Análise dos dados

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 2$). A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.3.3. Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina

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

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com a Cas U (0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$) e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular para o período de 24 h de incubação. Para observar a morfologia, 50 μL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina a fixação foi feita com etanol 96 % por 5 min e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina de Hanks (0,1 %), seguida pela eosina (0,5 %).

Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.3.4. Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da

revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON *et al.*, 1995).

A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa membranas não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células que estão em apoptose tardia têm aparência alaranjada devido a algum dano de membrana que permite a entrada de pequena quantidade de BE. Já as células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso.

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com a Cas U. As concentrações utilizadas (0,4, 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação (10 x g/5 min. correspondente a 1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE/LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (GENG *et al.*, 2003).

Análise dos dados

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.3.5. Ensaio de Relaxamento do DNA

Para efeitos de estudo de relaxamento de DNA superhelicoidizado, foi avaliado a ação inibitória da Cas U sobre a enzima Topoisomerase I humana (Topoisomerase I Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA) de acordo com Bezerra *et al.* (2007). Um microlitro (250 ng) de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG, uma derivação do pUC 19) foi incubado com a Topo I (4 U) a 37 °C por 30 min no tampão de relaxamento (Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, BSA 0,1 %, espermidina, 0,1 mM e glicerol 5 %) na presença de 2 e 4 µg/mL da Cas U, para um volume final de 20 µL. A droga Camptotecina (0,1 mM) foi usada como controle positivo. A parada da reação foi feita adicionando 2 µL de SDS 10 % (para facilitar o bloqueio da enzima no complexo de clivagem) e 50 µg/mL de proteinase K (para digerir ligações protéicas). As amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo o corante azul de bromofenol (0,25 %). Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de agarose 1 % e a corrida eletroforética foi realizada a 80 V (volts) por 120 min à temperatura ambiente. A revelação do gel foi feita com brometo de etídio e, imediatamente fotografado sob luz ultravioleta.

3.3.6. Fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar às moléculas de DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Células que apresentem núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI e, por isso, emitirão menor fluorescência, sugerindo apoptose.

Baseado em Militão *et al.* (2005), células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas com a Cas U (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL). Ao final de 24 h de incubação, retirou-se uma alíquota de 40 µL da suspensão de células, a qual foi adicionada a 80 µL de uma solução de lise (1:3) contendo PI 50 µg/mL, 0,1 % de citrato de sódio e 0,1 % de Triton X-100. Após um período de 30 minutos de incubação protegido de luminosidade, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Análise dos dados

Os dados foram expressos, em porcentagem (%), como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.4. Avaliação Citotóxica e Genotóxica em Linfócitos Humanos *versus* HL-60

3.4.1. Aspectos Éticos, Coleta de Sangue e Isolamento dos Linfócitos

Esse protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará e conduzido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

A coleta do sangue periférico foi realizada por profissionais capacitados, utilizando-se seringas esterilizadas e descartáveis de 10 mL. Para tanto, foram escolhidos 3 voluntários adultos saudáveis, na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações, a medicamentos ou álcool (BURIM *et al.*, 2001).

Os linfócitos foram isolados a partir de uma amostra de 3 mL de sangue periférico acrescida de 5 mL de PBS. Essa mistura foi adicionada a um tubo Falcon com 2 mL de Ficoll e submetida a centrifugação por 30 min a 2000 x g. Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada de nuvem de linfócitos foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo. Posteriormente, completou-se com PBS até o volume de 11 mL e centrifugou-se o tubo a 108 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos foi ressuspendido em 2 mL de PBS.

3.4.2. Atividade Citotóxica em Linfócitos

A atividade citotóxica da Cas U frente a linfócitos periféricos humanos foi determinada através do método do MTT como descrito anteriormente. Para tanto, os linfócitos foram incubados em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ durante 48 h antes da adição da Cas U nas concentrações finais de 0,039-25 µg/mL.

Análise dos dados

A Cas U foi testada em diluição seriada, em triplicata. Sua CI_{50} e seu intervalo de confiança foi calculado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software). Para verificação da ocorrência de diferença significativa entre a citotoxicidade em células de HL-60 e em linfócitos periféricos, os dados foram comparados por teste *t* de Student não-pareado com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.4.3. Atividade Genotóxica em Linfócitos e em células de HL-60

A versão alcalina do Ensaio do Cometa, mais especificamente conhecido pela sigla inglesa ‘SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)’ tem sido usada para avaliar a genotoxicidade *in vitro* de muitos compostos em células normais e transformadas, humanas ou animais (DAUER *et al.*, 2003).

Reconhecendo a popularidade de aplicações dos extratos provenientes de *C. sylvestris*, o ensaio do cometa foi realizado objetivando analisar o potencial genotóxico da Cas U.

Os desenhos experimentais do estudo do cometa foram direcionados para avaliar a genotoxicidade frente a dois tipos celulares: linhagem tumoral HL-60 e linfócitos humanos, procurando-se comparar os danos entre linfócitos e células de HL-60 após a incubação com a Cas U por 24 h. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo e, como controle negativo, estas células foram expostas ao veículo de diluição da substância (DMSO 0,5 %). As células foram incubadas com a Cas U nas concentrações de 0,4, 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h a 37 °C, assim como os grupos controle positivo e negativo.

Ao término da incubação em cada cultura, foi retirada uma alíquota de 20 μL de células, a qual foi adicionada a 110 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % para preparo das lâminas. Para os testes com linfócitos, foram preparadas três lâminas para cada amostra e, nos testes com células HL-60, as lâminas foram preparadas em duplicata.

As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal 1,5 % a 60 °C e mantidas a temperatura ambiente por 24 h até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão, a qual foi preparada previamente. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm) para uniformizar a distribuição das células e mantidas a 4 °C para solidificação da agarose.

Após solidificação da agarose, a lâminula foi gentilmente removida e a lâmina mergulhada em solução de lise a 4 °C (mantida na geladeira), protegida da luz por no mínimo 1 h antes da corrida de eletroforese. Depois de removidas da solução de lise, as lâminas foram neutralizadas por 15 min em solução de neutralização e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. A cuba foi mantida em banho de gelo para a manutenção da temperatura em torno de 4 °C, tendo sido acrescentada a solução de eletroforese até completa imersão das lâminas.

Antes de iniciar a corrida de eletroforese, as lâminas ficaram em repouso por 20 min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcalilábeis. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade, usando 25 V e corrente de 300 mA por 20 min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 min, a fim de neutralizar a alcalinidade.

A fixação foi realizada com etanol 100 %. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 µl de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência.

Avaliação das Lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (**Figura 13**). Foram contados 100 cometas por lâmina (n = 4) e classificados dentre as cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de dano sofrido pela célula:

0 = sem danos ao DNA, portanto, sem cauda (< 5 %)

1 = baixo nível de danos, com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (5-20 %)

2 = médio nível de danos, com a cauda representando 1-2 vezes o diâmetro da cabeça (20-40 %)

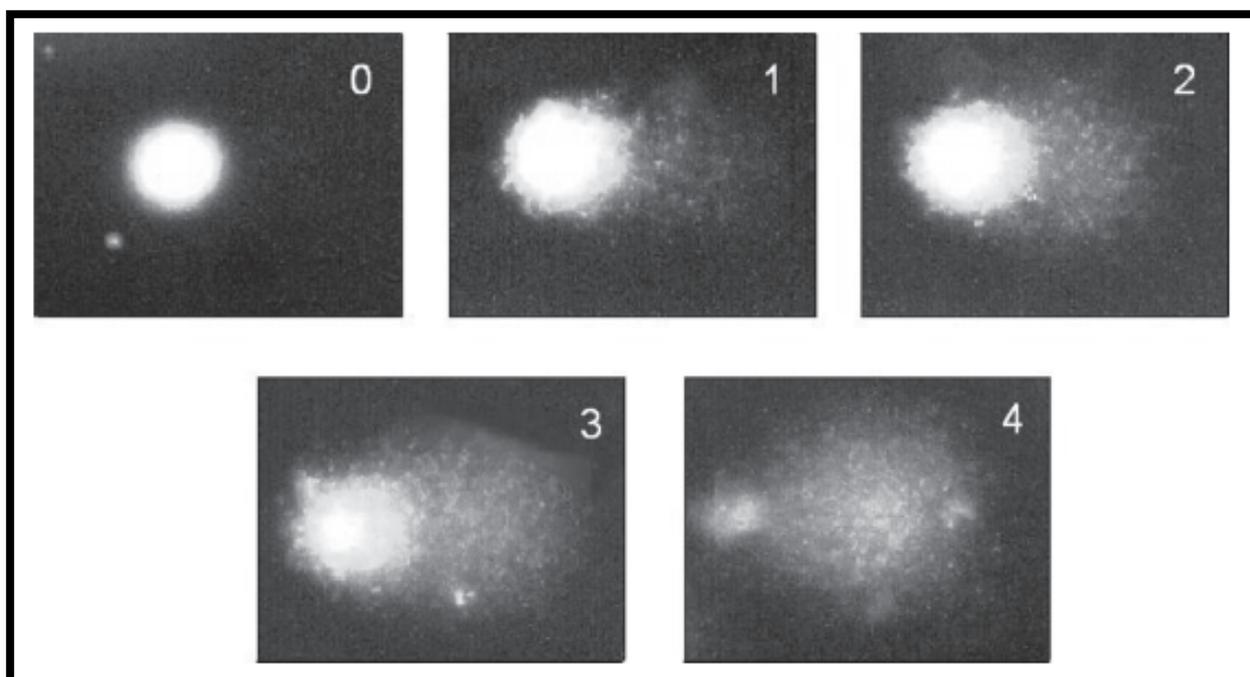
3 = alto nível de danos, com a cauda representando mais de 2 vezes o diâmetro da cabeça (40-95 %)

4 = dano total (> 95 %)

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a percentagem de células que sofreram danos no DNA.

Análise dos dados

Foram contados 100 cometas por lâmina ($n = 4$) para a quantificação do dano ao DNA (índice e frequência). Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 2$). Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). A genotoxicidade entre células de HL-60 e linfócitos periféricos foi analisada por teste t de Student não-pareado com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).



Fonte: Collins (2004)

Figura 13 – Representação dos tipos de cometa, sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA.

3.5. Estudo da capacidade antitumoral da Cas U em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados são fatores diretamente relacionados à atividade antitumoral. SCHABEL *et al.* (1977) demonstrou que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral. O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no 'Crocker Laboratory (Columbia University, New York)', sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Foi um tumor inicialmente classificado como carcinoma mamário. Porém, após vários transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa por volta de 1919 e, desde então, mantém-se inalterado até os dias de hoje.

Para a avaliação do efeito antitumoral da Cas U isolada das folhas de *C. sylvestris* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) Swiss machos adultos sadios provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g (p > 0,05).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparado uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 8 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de diluição (DMSO 4 %) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia). Para a Cas U, foram estabelecidas as doses de 10 e 25 mg/kg/dia, ambas administradas via intraperitoneal (i.p.) e a dose de 25 mg/kg/dia aplicada via oral (v.o.) por gavagem, com seu respectivo grupo controle negativo (DMSO 4 % v.o.).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

Os animais foram pesados a cada 2 dias e observados quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, letargia e convulsões. No final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado e estômago) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (**IT**) foi calculado pela fórmula:

$$\mathbf{IT\ (\%)\ =\ [(A-B)/A]\ x\ 100}$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos dados

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média \pm E.P.M. A diferença entre os grupos foi analisada por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) e considerada estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

3.5.1. Observações Histopatológicas

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Em seguida, os tecidos foram processados, embebidos em parafina e secções de 3-5 μm de espessura foram preparadas em lâminas. Depois de fixadas em formol 10 %, desparafinizadas em xilol por 15 min e desidratadas em álcool em crescentes concentrações, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com H/E e examinadas em microscópio óptico (x400).

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1. Atividade Citotóxica e Hemolítica

A avaliação da atividade citotóxica dos sete diterpenos foi realizada pelo método do MTT contra nove linhagens de células tumorais (humanas e murina). As CI_{50} , determinadas após 72 h de incubação com as substâncias, estão representados na **tabela 3**.

O diterpeno clerodano que apresentou maior potencial citotóxico foi a Casearina U (**41**), com valores de CI_{50} menores que 1 $\mu\text{g/mL}$ (1,87 μM) na grande maioria das linhagens tumorais testadas, sendo mais ativo contra células de HL-60 [0,15 $\mu\text{g/mL}$ (0,28 μM)] e menos citotóxico contra a linhagem leucêmica K-562 [4,76 $\mu\text{g/mL}$ (8,93 μM)]. A forma degradada da Cas U (**42**), ao contrário, revelou fraca citotoxicidade contra células tumorais, embora tenha causado inibição de crescimento nas linhagens CEM, HL-60, MDA/MB-435, HCT-8 e B-16, com CI_{50} variando entre 8,02 a 21,18 $\mu\text{g/mL}$ (19,92 - 52,61 μM). O ácido hardiwickiico (**40**) mostrou ser pouco ativo, com valores de CI_{50} maiores que 25 $\mu\text{g/mL}$ (78,01 μM) para a maioria das linhagens estudadas, apesar de ter causado inibição da proliferação celular nas linhagens de K-562, HCT-8 e B-16 [CI_{50} entre 10,50 - 20,62 $\mu\text{g/mL}$ (32,70 - 64,34 μM)]. As casearinas L (**26**) e O (**29**) foram mais ativas contra leucemias, com ação moderada contra células de mama (MDA/MB-435, MDA/MB-231), de próstata (PC-3) e de melanoma murino (B-16). Os Casearinas X (**44**) e Y (**45**) apresentaram atividade antiproliferativa relevante, com CI_{50} menores que 4 $\mu\text{g/mL}$, exceto para a linhagem de glioblastoma (SF-295).

Os estudos de atividade hemolítica foram feitos usando suspensão de eritrócitos de camundongos a 2 %. Nenhuma das sete substâncias foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (200 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular.

Tabela 3 – Atividade citotóxica *in vitro* de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* frente às linhagens tumorais humanas de leucemia (CEM, HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-435, MDA/MB-231), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e para melanoma murino (B-16).

Composto	CEM	HL-60	K-562	MDA/MB 435	MDA/MB 231	PC-3	HCT- 8	SF- 295	B-16
	CI ₅₀ [µg/ml (µM)]*								
Doxorrubicina	0,02 (0,04) 0,02 - 0,03	0,02 (0,04) 0,01 - 0,02	0,14 (0,24) 0,09 - 0,23	0,48 (0,83) 0,34 - 0,66	0,22 (0,38) 0,18 - 0,26	0,24 (0,41) 0,21 - 0,27	0,01 (0,02) 0,01 - 0,02	0,23 (0,40) 0,19 - 0,25	0,03 (0,06) 0,02 - 0,04
Ácido			10,50				19,53		20,62
Hardiwickiico	>25 (78,01)	>25 (78,01)	(32,70) 3,58 - 30,76	>25 (78,01)	>25 (78,01)	>25 (78,01)	(60,94) 15,71 - 24,28	> 25 (78,01)	(64,34) 10,58 - 40,20
Casearina L	2,69 (5,15) 2,12 - 3,41	5,76 (11,04) 4,64 - 7,14	2,51 (4,81) 1,14 - 5,49	4,10 (7,86) 3,00 - 5,61	4,91 (9,41) 3,46 - 6,98	5,90 (11,31) 4,63 - 7,51	9,05 (17,35) 8,08 - 10,14	13,63 (26,13) 7,31 - 25,04	8,42 (16,14) 7,17 - 9,89
Casearina O	2,57 (4,34) 2,23 - 2,97	3,32 (5,61) 2,64 - 4,18	3,02 (5,10) 2,20 - 4,15	4,01 (6,77) 3,16 - 5,09	6,39 (10,80) 4,66 - 8,76	3,15 (5,32) 2,27 - 4,39	7,01 (11,84) 5,32 - 9,23	10,46 (17,68) 8,61 - 12,69	4,72 (7,97) 3,93 - 5,68

Tabela 3 – Continuação

Composto	CEM	HL-60	K-562	MDA/MB	MDA/MB	PC-3	HCT-8	SF-295	B-16
				435	231				
CI ₅₀ [µg/ml (µM)]*									
Cas U	0,21(0,39)	0,15	4,76	0,19	0,50	0,46	0,52	0,23	0,56
	0,19 -	(0,28)	(8,93)	(0,35)	(0,93)	(0,86)	(0,97)	(0,43)	(1,05)
	0,23	0,14 -	2,65 -	0,19 -	0,46 -	0,41 -	0,48 -	0,19 -	0,48 -
		0,16	8,56	0,21	0,54	0,52	0,56	0,27	0,66
Cas U	8,02	12,96		21,18			13,88		13,63
degradada	(19,92)	(32,19)	>25	(52,61)	>25	>25	(34,48)	>25	(33,86)
	6,73 -	8,21 -	(62,10)	19,45 -	(62,10)	(62,10)	12,60 -	(62,10)	6,21 -
	9,57	20,47		23,07			15,29		29,94
Casearina	0,60	0,73	0,98	1,15	1,76	2,05	3,91	5,87	3,34
X	(1,09)	(1,33)	(1,79)	(2,09)	(3,21)	(3,74)	(7,13)	(10,71)	(6,09)
	0,55 -	0,63 -	0,87 -	0,91 -	1,38 -	1,78 -	3,68 -	2,53 -	2,77 -
	0,65	0,84	1,11	1,45	2,25	2,32	3,28	13,61	4,02
Casearina	0,78	0,57	1,29	3,06	4,63	1,10	3,04	6,32	2,51
Y	(1,38)	(1,01)	(2,29)	(5,43)	(8,22)	(1,95)	(5,40)	(11,23)	(4,46)
	0,70 -	0,46 -	1,04 -	2,55 -	3,83 -	0,98 -	2,83 -	5,93 -	1,78 -
	0,88	0,70	1,62	3,67	5,60	1,23	3,28	6,73	3,54

* Valores originados de experimentos independentes (n = 3) e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95 %.

4.2. Estudos do Mecanismo de Ação

4.2.1. Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán

A análise da viabilidade celular na linhagem leucêmica HL-60 por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de exposição (**Figura 14**) demonstrou que a Cas U causou uma significativa redução no número de células viáveis em todas as concentrações testadas, de forma crescente e dependente da concentração (34,82 %; 54,06 % e 83,70 %, para as concentrações 0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), mas apenas nas concentrações de 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento do número de células não-viáveis, cujos os percentuais foram de 19,26 % e 37,04 %, respectivamente ($p < 0,001$).

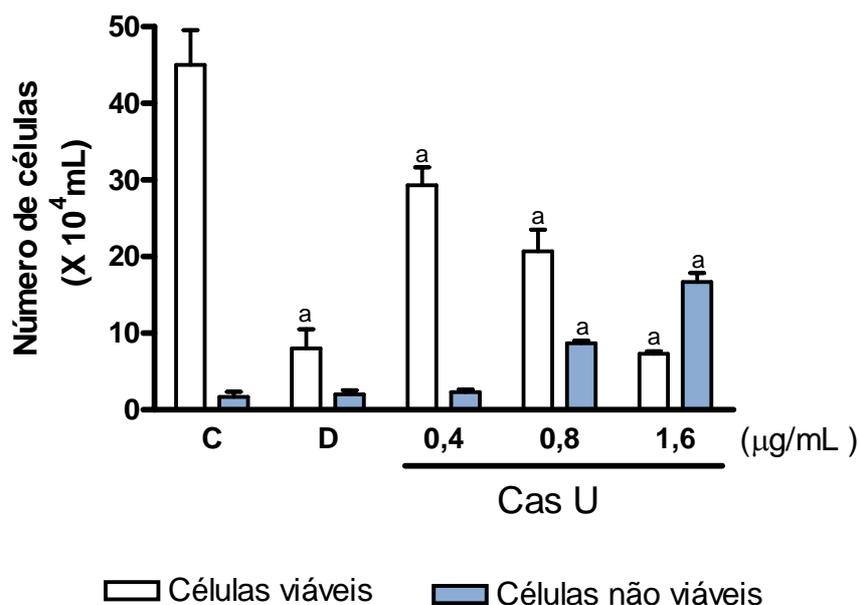


Figura 14 – Efeito da Casearina U (Cas U) na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). ^a $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.

4.2.2. Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU

Dando continuidade a avaliação da atividade antiproliferativa, examinou-se a capacidade de incorporação do nucleotídeo BrdU por células da linhagem leucêmica HL-60 tratadas com a Cas U durante 24 h de incubação. A **Figura 15** apresenta o efeito da Cas U sobre essa incorporação. Houve redução significativa na síntese de DNA já na menor concentração testada (0,4 µg/mL), a qual causou inibição da incorporação de BrdU de 47 % quando comparado com o controle negativo (DMSO 1,6 %). Na concentração de 0,8 µg/mL, a inibição foi de 64 % ($p < 0,01$). Na concentração de Cas U de 1,6 µg/mL foi observada destruição celular tão intensa ao ponto de impossibilitar a contagem de células. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo e causou inibição da incorporação de BrdU de 61 % ($p < 0,01$).

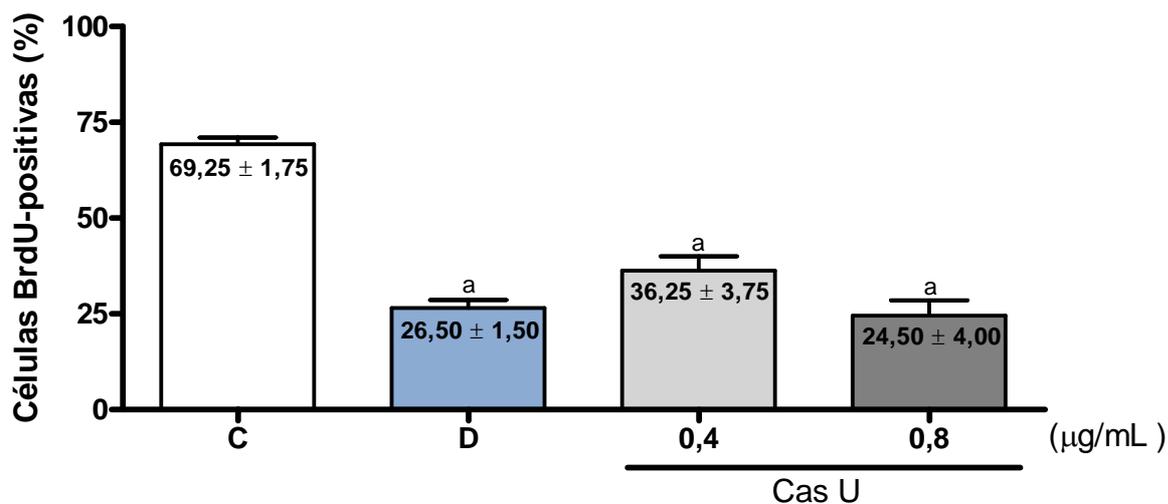


Figura 15 – Inibição da síntese de DNA pela Casearina U (Cas U), expresso em percentual (%), avaliada através da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 2). ^a $p < 0,01$ comparado com o controle pelo teste χ^2 .

4.2.3. Análise morfológica – Coloração por Hematoxilina/Eosina

A análise morfológica das células da linhagem leucêmica promielocítica humana HL-60 tratadas com crescentes concentrações da Cas U e não tratadas pode ser visualizada na **Figura 16**.

O controle negativo (**Figura 16A**) apresentou características de células íntegras, com citoplasma homogêneo, presença de figuras mitóticas e nítida visualização da membrana plasmática e nuclear. As células tratadas com a concentração de 0,4 µg/mL de Cas U mostraram eosinofilia, presença de vacúolos plasmáticos e nucleares e áreas de contração celular (**Figura 16C**). A Cas U 0,8 µg/mL causou rarefação de células e diminuição de volume, vacuolização, eosinofilia mais acentuada que na concentração anterior além de condensação e marginalização da cromatina (**Figura 16D**). Na maior concentração (1,6 µg/mL), ocorreu intensa diminuição do volume e do número de células, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e picnose (**Figura 16E**). Rarefação celular, fragmentação nuclear e presença de núcleos picnóticos também foram encontrados após o tratamento com doxorrubicina 0,3 µg/mL (controle positivo), além da basofilia e restos nucleares hiper cromáticos consistentes com necrose (**Figura 16B**).

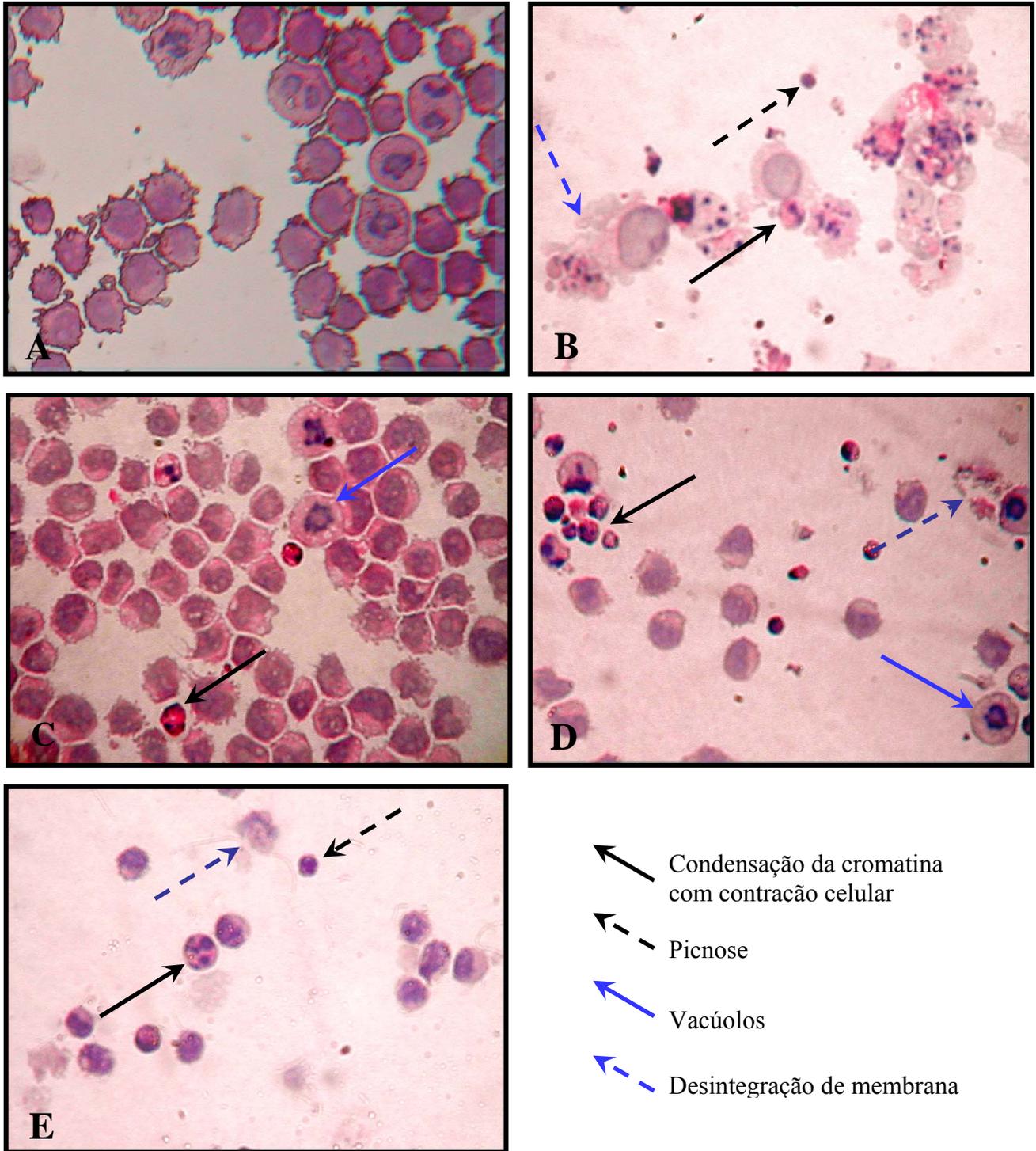


Figura 16 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Hematoxilina/Eosina e visualizadas por microscopia óptica. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (B). C, D e E correspondem, respectivamente, ao tratamento com a Casearina U (Cas U) nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL. Aumento = x 400.

4.2.4. Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Um dos métodos aplicados para avaliar o padrão de morte celular induzida pela Cas U foi realizado através da coloração diferencial com BE/LA e posterior análise por microscopia de fluorescência. A **figura 17** ilustra essas alterações morfológicas no processo de morte celular causadas pela Cas U. As concentrações de 0,4 (**Figura 17C**) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 17D**) causaram mudanças morfológicas semelhantes, como diminuição do volume celular, condensação e fragmentação da cromatina, evidenciados por um intenso verde brilhante, embora esses achados tenham sido bem mais freqüentes na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Células com coloração típica de necrose (muito alaranjadas ou vermelhas), foram mais encontradas na concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 17E**), onde também foram observadas retração e fragmentação nucleares.

Após 24 h de incubação das células HL-60 na presença da Cas U, ocorreu redução do número de células viáveis de forma concentração-dependente, havendo total ausência das mesmas na concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) (**Figura 18**). Essa redução foi acompanhada pelo aumento de células apoptóticas (82 %; 88,1% e 22,23 %) e de células necróticas (4,33 %; 6,67 % e 77,67 %) para as concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente ($p < 0,001$).

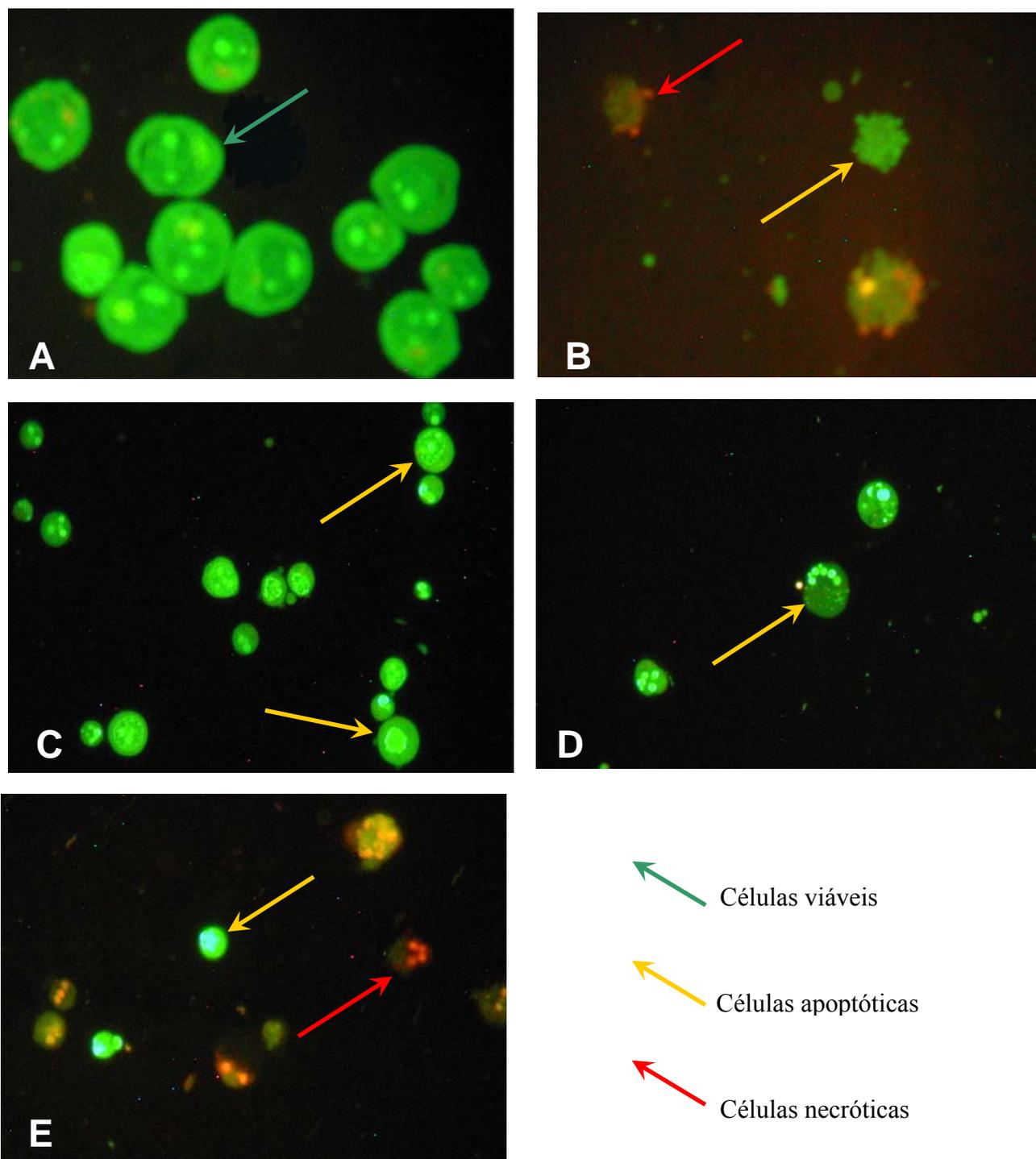


Figura 17 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (B). C, D e E correspondem ao tratamento com a Casearina U (Cas U) nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL, respectivamente. Aumento = x400.

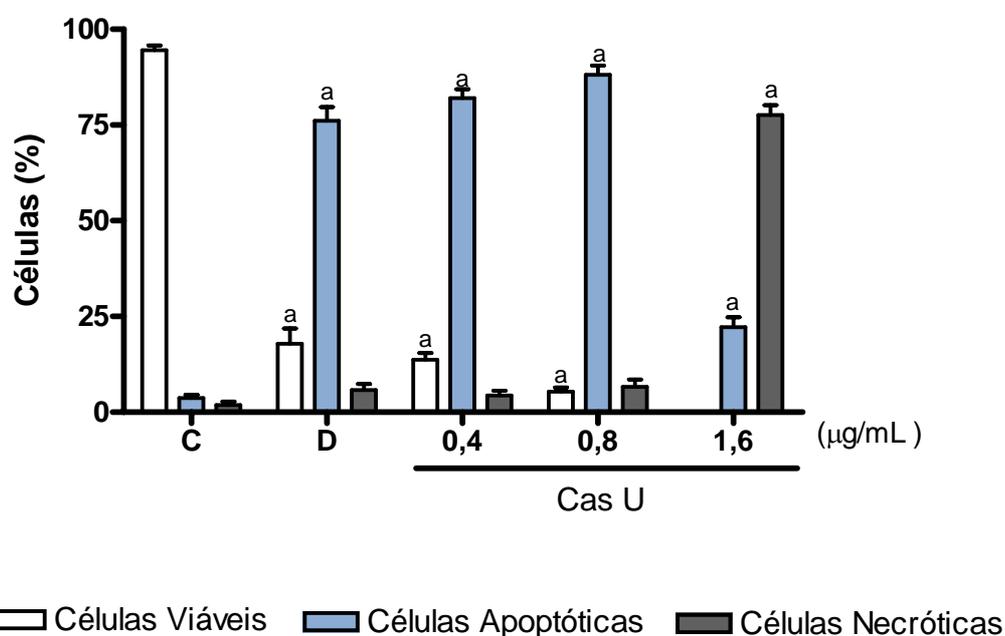


Figura 18 – Atividade da Casearina U (Cas U) nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL, expresso em percentual (%), sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após de 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). ^a p < 0,001 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

4.2.5. Ensaio de Relaxamento do DNA

A análise da Cas U sobre a topoisomerase I foi avaliada através do ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado. Como visto na **figura 19**, nenhuma das concentrações testadas [2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ (3,75 e 7,50 μM), linhas 3 e 4, respectivamente] de Cas U foi capaz de alterar a topologia do DNA. Camptotecina 0,1 mM, usada como controle positivo (linha 5), inibiu a atividade da topoisomerase I, causando a formação de complexos cliváveis que resultaram na inibição da conversão do substrato superhelicoidizado para a forma relaxada. Fatos esses não observados pelas outras amostras (linhas 2, 3 e 4), uma vez que as bandas notadamente revelaram o relaxamento de DNA, ao contrário do que acontece na linha 1 (branco), dessa vez explicado pela ausência da própria topoisomerase I.

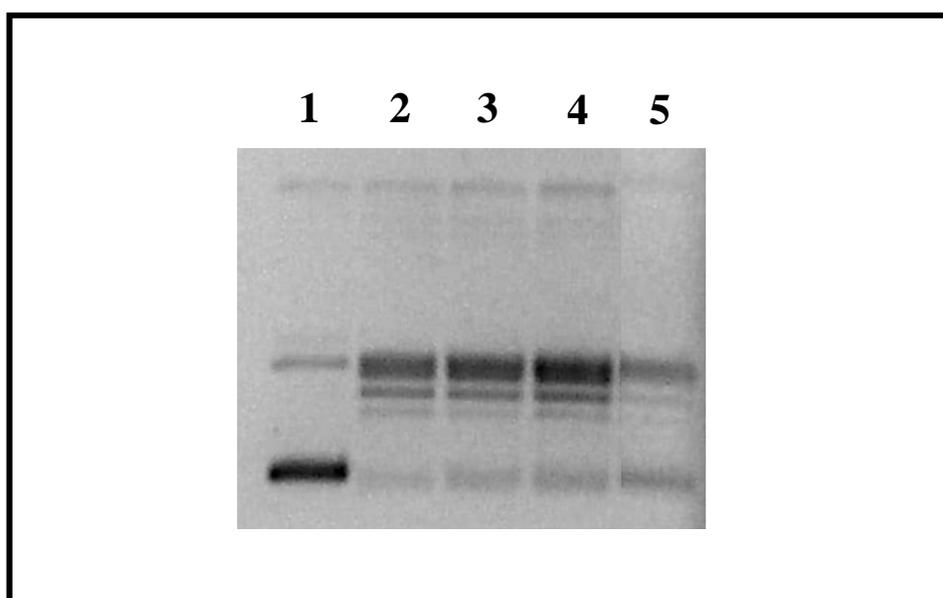


Figura 19 – Avaliação da atividade da Casearina U (Cas U) no relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 % . Linha 1, 250 ng de pRYG incubados somente na presença do solvente (DMSO 10 %) (branco); Linha 2, 250 ng de pRYG na presença do solvente (DMSO 10 %) e 4 U de Topoisomerase I (controle negativo); Linha 3 e 4, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ de Cas U, respectivamente; Linha 5, Camptotecina 0,1 mM (controle positivo). Revelação por brometo de etídio.

4.2.6. Fragmentação do DNA por Citometria de Fluxo

Nesse ensaio, as células controle e tratadas foram incubadas com uma solução contendo triton X-100 e iodeto de propídeo. O triton lisa a membrana celular e o iodeto de propídeo se liga no DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células com condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. Como demonstrado na **figura 20** obtida por citometria de fluxo, todas as concentrações de Cas U testadas (0,4; 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$) induziram a fragmentação do DNA. A concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$, com índice da fragmentação de $80,52 \pm 3,59 \%$, foi 5,7 e 1,3 vezes mais ativa que as concentrações de 0,4 ($14,51 \pm 0,35 \%$) e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ ($61,92 \pm 7,10 \%$), respectivamente. Quando comparada ao controle negativo ($1,41 \pm 0,16\%$), a maior concentração testada de Cas U foi capaz de aumentar em 57 vezes a fragmentação do DNA (**Figura 21**) ($p < 0,001$). A doxorrubicina causou fragmentação de $35,69 \pm 4,21 \%$.

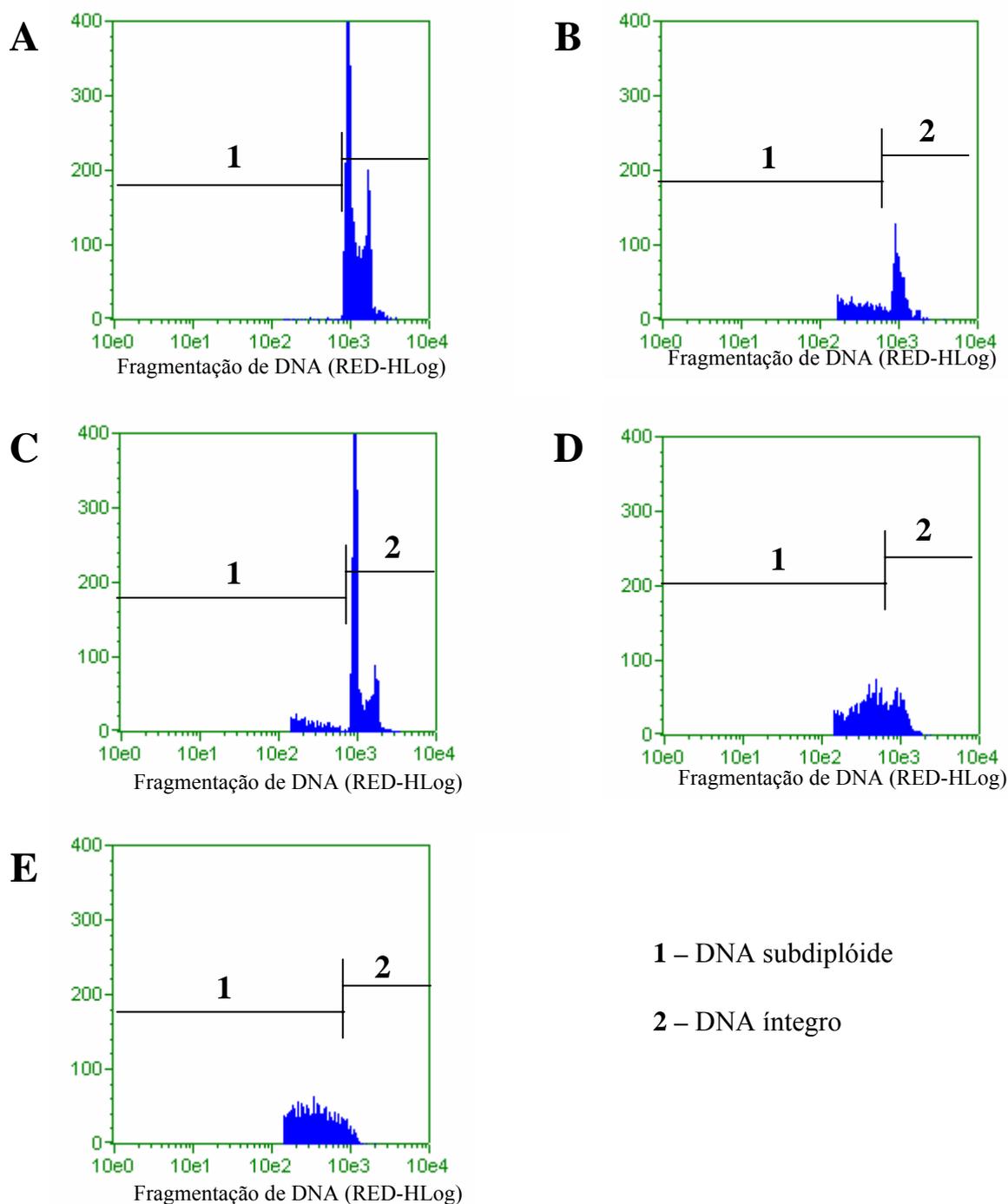


Figura 20 – Ensaio de fragmentação de DNA por citometria de fluxo em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação. O controle negativo (A) foi tratado com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (B). C, D e E correspondem ao tratamento com a Casearina U nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL, respectivamente. Coloração com tampão composto por citrato, triton X-100 e iodeto de propídeo. Histogramas representam a fluorescência de DNA de 5 mil eventos (escala logarítmica). As unidades são arbitrárias.

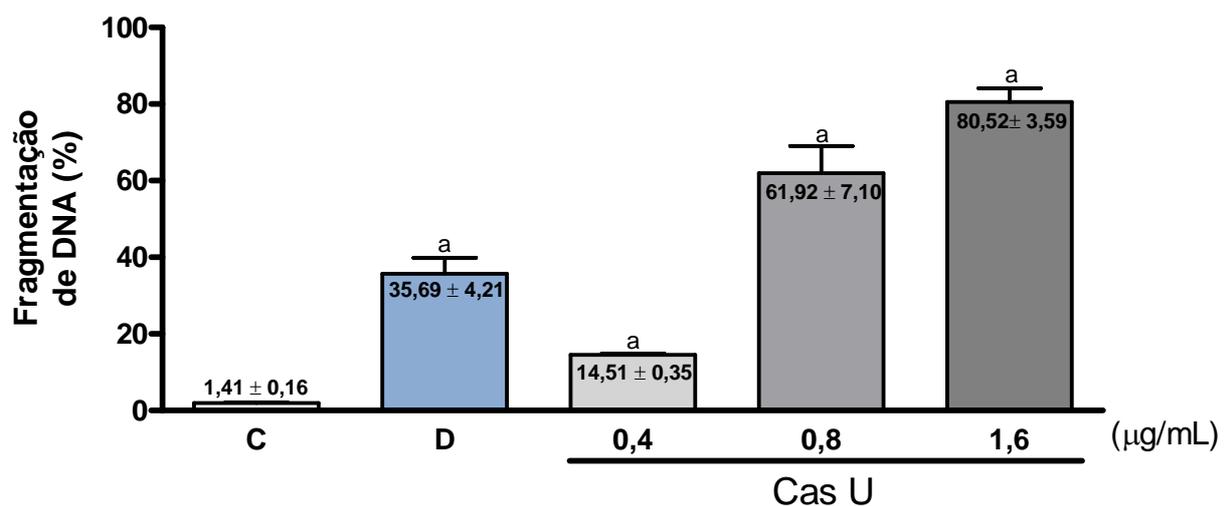


Figura 21 – Percentual de fragmentação de DNA na presença de Casuarina U (Cas U) determinado por citometria de fluxo em células HL-60 após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). ^a p < 0,001 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.

4.3. Atividade Citotóxica e Genotóxica em Linfócitos *versus* HL-60

Para efeitos de comparação da atividade da Cas U frente a células normais, avaliou-se também sua citotoxicidade pelo método do MTT em linfócitos periféricos humanos isolados de voluntários sadios. A CI_{50} encontrada, de 0,14 $\mu\text{g/mL}$ (0,26 μM), com intervalo de confiança (95%) de 0,11 - 0,17 $\mu\text{g/mL}$, revelou ser, praticamente, igual àquela verificada para a linhagem HL-60 [0,15 $\mu\text{g/mL}$ (0,28 μM)] ($p > 0,05$).

Os resultados dos estudos de genotoxicidade, realizados através da versão alcalina do ensaio do cometa, estão demonstrados na **tabela 4**. Comparada ao controle negativo (DMSO 0,5 %), a Cas U aumentou significativamente a migração do DNA ($p < 0,001$) a partir da menor concentração testada (0,4 $\mu\text{g/mL}$) em ambos os tipos de células (linfócitos e HL-60). Em linfócitos, a Cas U alcançou seu pico de FD na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ ($89,50 \pm 1,84$ %), não ocorrendo elevação da FD na concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ ($87,75 \pm 2,65$ %), embora células HL-60 tenham mostrado uma FD mais relevante na maior concentração ($79,00 \pm 1,73$ %) do que na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ ($61,33 \pm 3,28$ %). Já o ID mostrou elevação significativa e proporcional à dose em ambos os tipos de células. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$), usada como controle positivo, mostrou FD praticamente igual para ambas as células, embora o ID tenha sido menor para linfócitos ($221,66 \pm 3,66$) do que para HL-60 ($240,70 \pm 2,72$) ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Atividade genotóxica avaliada em crescentes concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) da Casearina U (Cas U) e determinada em linfócitos humanos e em células HL-60 através do ensaio do cometa após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 0,5 %). A doxorubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo (D). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 2).

Tipo de Célula		Tratamento				
		C	D	0,4 µg/mL	0,8 µg/mL	1,6 µg/mL
Frequência de Dano (FD) ^c	Linfócitos	7,66 ±	88,33 ±	43,50 ±	89,50 ±	87,75 ±
		1,45	2,40 ^b	3,77 ^{a,b}	1,84 ^{a,b}	2,65 ^b
	HL-60	12,33 ±	89,00 ±	29,33 ±	61,33 ±	79,00 ±
		1,85	2,08 ^b	2,33 ^b	3,28 ^b	1,73 ^b
Índice de Dano (ID) ^d	Linfócitos	10,0 ±	221,66 ±	44,25 ±	112,75 ±	137,50 ±
		1,00	3,66 ^{a,b}	3,94 ^{a,b}	6,32 ^{a,b}	9,52 ^{a,b}
	HL-60	13,33 ±	240,70 ±	27,00 ±	85,33 ±	120,70 ±
		2,84	2,72 ^b	1,73 ^b	5,36 ^b	2,33 ^b

^a (p < 0,05) comparado entre linfócitos e HL-60, analisado por teste *t* de Student não-pareado.

^b (p < 0,001) comparado ao controle, analisado por ANOVA seguido por Student-Newman Keuls.

^c Valores calculados como percentual de dano (%).

^d Escores obtidos pela multiplicação do número de células de cada classe (0, 1, 2, 3 e 4) pelo classe de dano, variando de 0 (sem danos) a 400 (dano máximo).

4.4. Atividade antitumoral da Cas U em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A avaliação da atividade antitumoral da Cas U realizada em camundongos transplantados experimentalmente com o tumor Sarcoma 180 pode ser vista na **figura 22**.

O tratamento consistiu na administração de Cas U i.p. (10 e 25 mg/kg/dia) ou v.o. por gavagem (25 mg/kg/dia) durante 8 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço, rins e estômago. Dentre as doses testadas, apenas a de 25mg/kg da Cas U aplicada i.p. foi capaz de diminuir o crescimento da massa tumoral ($0,21 \pm 0,6$ g) de forma significativa quando comparado ao controle negativo (DMSO 4 %) ($2,30 \pm 0,17$ g), o mesmo acontecendo com o grupo controle positivo tratado por 5-FU ($1,01 \pm 0,12$ g). Assim, 5-FU e Cas U 25 mg/kg i.p. revelaram, respectivamente, um percentual de inibição de crescimento do tumor de $52,72 \pm 5,67$ % e $90,01 \pm 2,90$ % ($p < 0,001$). A Cas U nas doses de 10 mg/kg intraperitoneal e 25 mg/kg oral não foram eficazes em reduzir a massa tumoral ($2,65 \pm 0,31$ e $2,13 \pm 0,25$ g, respectivamente) ($p > 0,05$).

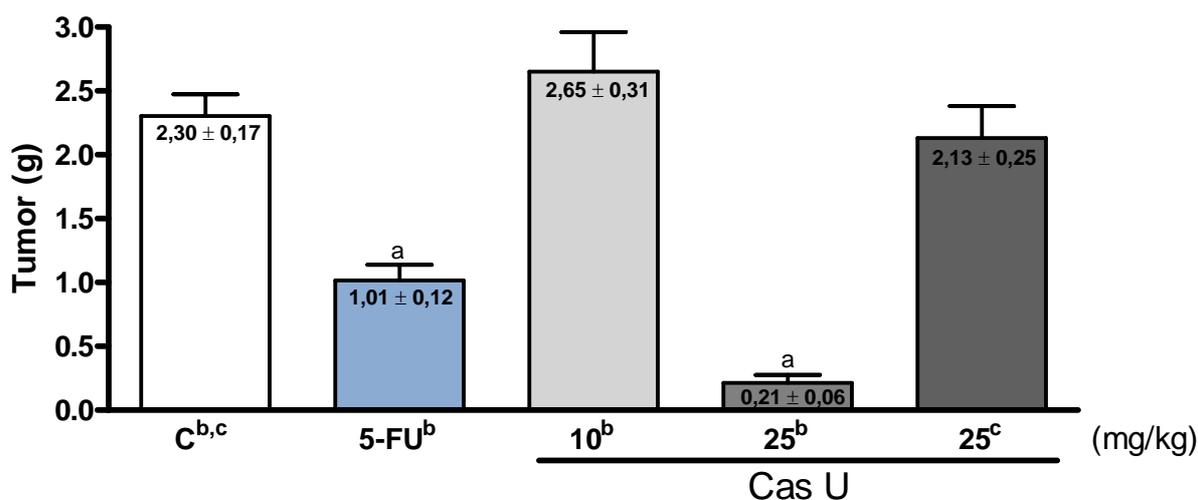


Figura 22 – Massa tumoral úmida de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Casearina U (Cas U) foi administrada nas doses de 10 ou 25 mg/kg/dia. ^a $p < 0,001$ comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test; ^b Tratamento intraperitoneal; ^c Tratamento oral por gavagem.

4.4.1. Análise Histopatológica dos Órgãos

O peso relativo úmido dos órgãos mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) apenas em relação ao baço dos grupos tratados com 5-FU e Cas U 25 mg/kg/dia i.p., demonstrando uma nítida involução do órgão quando comparado ao grupo controle (**Tabela 5**).

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (DMSO 4%) não apresentaram sinais de toxicidade, com fígado sem alterações, rins com leve hemorragia glomerular e tubular, baço com folículos evidentes e muitos megacariócitos. O estômago demonstrou ausência de estrias hemorrágicas, região da cárdia com revestimento escamoso queratinizado, sem alterações no córion e visualização de células parietais e principais, com mucosa e submucosa normais.

As análises mostraram que apenas a dose de Cas U 25 mg/kg/dia i.p. foi capaz de induzir alterações histopatológicas importantes. No fígado, uma discreta toxicidade foi diagnosticada por alguns pontos de foco inflamatório, congestão portal e da veia centrolobular com cordões de hepatócitos bem evidentes (**Figura 23**). Por outro lado, os rins tratados na dose 25 mg/kg/dia i.p., quando comparados com o controle negativo, revelaram-se, macroscopicamente, mais esbranquiçados. Microscopicamente, houve hemorragia glomerular e tubular com intensa tumefação do epitélio tubular e presença de cilindros hialinos. Hemorragias e cilindros hialinos também foram vistos no grupo controle negativo e nos animais tratados com 5-FU, com Cas U 10 mg/kg/dia i.p. e com Cas U 25 mg/kg/dia v.o. (**Figura 24**). O baço mostrou diminuição no tamanho com circunscrição evidenciável dos folículos (**Figura 25**). O estômago, semelhantemente ao observado para o controle negativo, não sofreu alterações histológicas após a administração de Cas U 25 mg/kg/dia v.o.

As alterações microscópicas, embora todas de caráter reversível, ficaram sedimentadas também quando se compara a média do peso corporal (**Tabela 5**) dos animais do grupo tratado com Cas U 25 mg/kg/dia i.p., a qual se mostrou menor ($22,50 \pm 0,83$ g) que a do grupo controle negativo ($30,60 \pm 0,84$ g) ($p < 0,01$), mas praticamente igual àquela dos animais tratados com 5-FU ($22,20 \pm 1,02$ g).

Os animais tratados com 5-FU (25 mg/kg/dia) revelaram fígados com tumefação celular, trechos focais de esteatose em microgotas, hemorragia sinusoidal e hiperplasia das células de Kupffer. Enquanto nos rins foi observado hemorragia glomerular e tubular, presença de cilindros hialinos e tumefação do epitélio tubular, o baço, significativamente menor, apresentou folículos evidentes e circunscritos.

Os tumores dos animais do grupo controle negativo e dos grupos tratados com Cas U 10 mg/kg/dia i.p. e 25 mg/kg/dia v.o. mostraram características de neoplasia maligna constituída por células redondas e poliédricas com anisocariose, binucleação, freqüentes mitoses e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear (**Figura 26**). Foram encontradas invasão muscular e áreas de necrose de coagulação. Os tumores dos animais tratados com 5-FU e Cas U 25 mg/kg/dia i.p. revelaram, como descrito acima, morfologia típica de células neoplásicas, embora tenham sido observadas raras mitoses e áreas de necrose de coagulação muito mais extensas do que nos outros grupos.

Tabela 5 – Efeito sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento com Casearina U (Cas U) nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia.. O controle negativo foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Os valores correspondem à média (n = 10) ± E.P.M.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Peso Final dos Animais (g)	Fígado	Rins	Baço	Estômago	
			(g/100g de massa corpórea)				
Intraperitoneal	Controle	-	30,60 ± 0,84	5,62 ± 0,16	1,47 ± 0,07	0,65 ± 0,05	^b
	5-FU	25	22,20 ± 1,02 ^a	5,06 ± 0,15	1,51 ± 0,05	0,38 ± 0,03 ^a	^b
	Cas U	10	30,88 ± 0,95	5,58 ± 0,27	1,58 ± 0,04	0,71 ± 0,03	^b
		25	22,50 ± 0,83 ^a	4,87 ± 0,31	1,61 ± 0,08	0,44 ± 0,03 ^a	^b
Oral	Controle	-	28,90 ± 0,69	4,86 ± 0,07	1,04 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,19 ± 0,01
	5-FU ^c	25	21,50 ± 0,95 ^a	4,89 ± 0,08	1,19 ± 0,09	0,34 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,02
	Cas U	25	29,50 ± 1,22	4,97 ± 0,18	1,18 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,19 ± 0,01

^a (p < 0,01) comparado ao controle, analisado por ANOVA seguido por Student-Newman Keuls.

^b Não determinado.

^c Tratamento intraperitoneal.

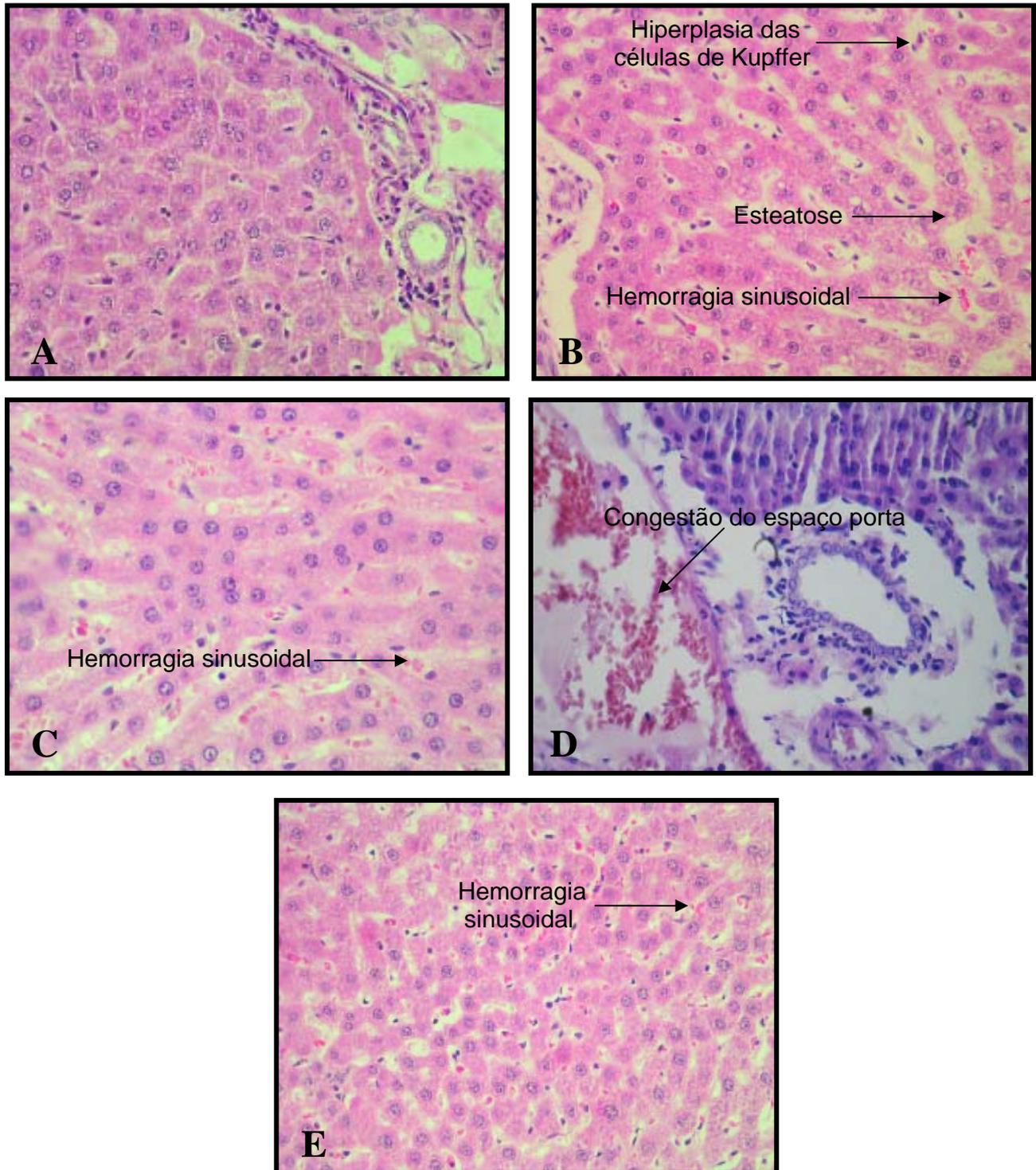


Figura 23 – Análise histológica do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A Casearina U (Cas U) foi administrada via intraperitoneal (10 ou 25 mg/kg/dia, C ou D) ou via oral (25 mg/kg/dia, E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = x400.

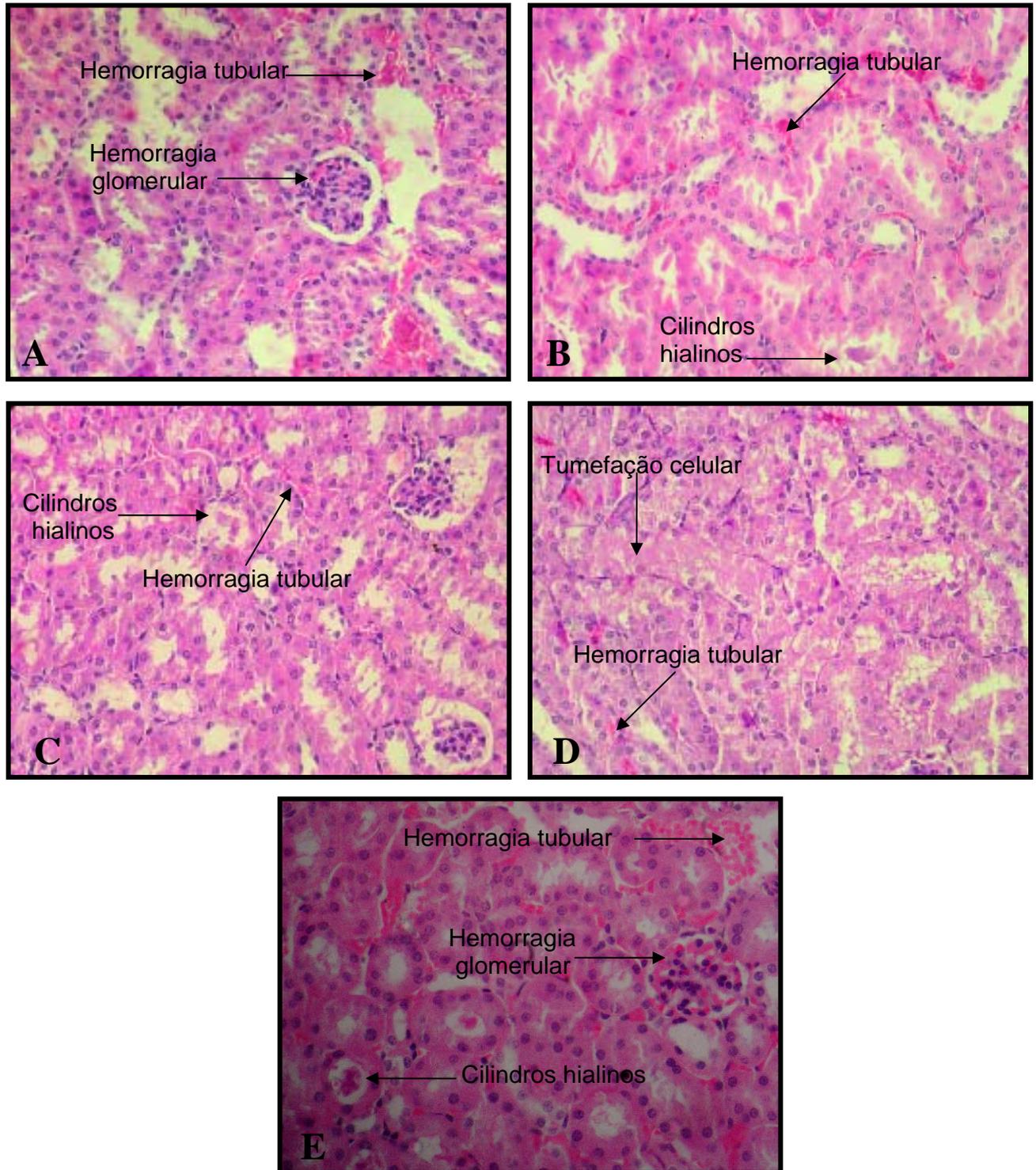


Figura 24 – Análise histológica dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A Casearina U (Cas U) foi administrada via intraperitoneal (10 ou 25 mg/kg/dia, C ou D) ou via oral (25 mg/kg/dia, E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = x400.

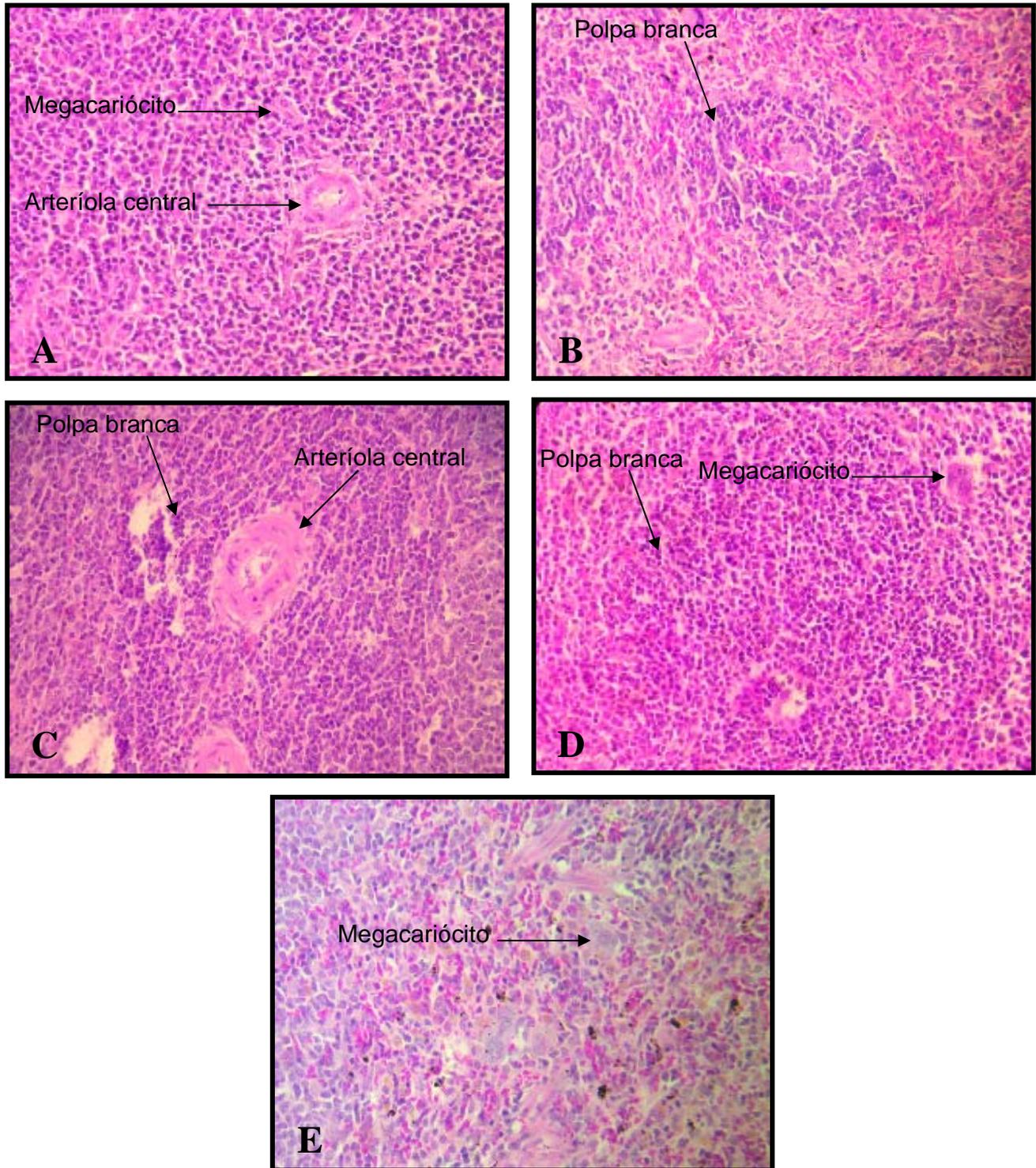


Figura 25 – Análise histológica do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). A Casearina U (Cas U) foi administrada via intraperitoneal (10 ou 25 mg/kg/dia, C ou D) ou via oral (25 mg/kg/dia, E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = x400.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A mortalidade proveniente das várias formas de câncer é inaceitavelmente alta. Em países desenvolvidos, uma em cada três pessoas que desenvolvem câncer morre desta doença e, mesmo nos casos de diagnóstico precoce, a expectativa de vida pode ser muito curta (KAMB, 2005).

Há um grande número de agentes antineoplásicos derivados de vegetais sob avaliação pré-clínica e clínica (ROCHA *et al.*, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004; SRIVASTAVA *et al.*, 2005) e apesar do desenvolvimento da química combinatória e da modelagem molecular, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas, o que torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento (KAMB, 2005). Por isso, é importante identificar moléculas naturais com potencial atividade terapêutica para a realização de futuros estudos clínicos e que sirvam de fonte de conhecimento para a síntese de novos compostos com atividade antitumoral mais efetiva e menos tóxica e/ou com novos mecanismos de ação.

A família Flacourtiaceae e o seu principal gênero - *Casearia* - são ricos em diterpenos e glicosídeos fenólicos, alguns dos quais mostrando atividade citotóxica (GIBBONS *et al.*, 1996; SHEN *et al.*, 2004; ASHIK *et al.*, 2006), de repelência a insetos (MERRIT & LEY, 1992), antiinflamatória (BORGES *et al.*, 2000; ESTEVES *et al.*, 2005), antimicrobiana, antioxidante (OBERLIES *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2004; MOSADDIK *et al.*, 2004) e contra protozoários tripanossomatídeos (MESQUITA *et al.*, 2004).

Sabendo da importância da *Casearia* e de que células de mamíferos em cultura são ferramentas utilizadas para avaliar a citotoxicidade de novos compostos com atividade antitumoral (PAILARD *et al.*, 1999), o presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade citotóxica por MTT e hemolítica de sete diterpenos isolados a partir das folhas da *C. sylvestris* frente a um painel de nove linhagens de células tumorais e a eritrócitos obtidos de camundongos.

Entre os diterpenos testados (ácido hardiwickiico, casearinas L, O, Cas U e sua forma degradada, X e Y), destacou-se a Cas U, cuja CI_{50} foi menor que 1 $\mu\text{g/mL}$ (1,87 μM) em todas as linhagens testadas, com exceção da linhagem leucêmica K-562, a qual mostrou ser a mais resistente para esse composto dentre todas as linhagens estudadas [CI_{50} de 4,76 $\mu\text{g/mL}$ (8,93 μM)]. Muitas pesquisas corroboram os resultados do presente trabalho, uma vez que inúmeros clerodanos diterpenos anteriormente isolados de *C. sylvestris* possuem atividade citotóxica e antitumoral

(ITOKAWA *et al.*, 1988; ITOKAWA *et al.*, 1990; MORITA *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 1998; OBERLIES *et al.*, 2002).

Comparando as 25 casearinas conhecidas, as principais diferenças estruturais estão no grupo éster ligado às posições 2, 6 e 7, 18 e 19, e na hidroxilação ou O-metilação na posição 2, sendo que a produção de derivados mostrou que a atividade citotóxica mais significativa foi relacionada à oxigenação na posição 6 (MORITA, *et al.*, 1991). Analisando as relações de estrutura-atividade, observamos que as casearinas que possuem em comum o anel diacetálico formado pelos carbonos C-18 e C-19 mostraram maior citotoxicidade contra as células tumorais, como pode ser visto para as casearinas L, O, U, X e Y, anel esse não encontrado nas estruturas dos compostos ácido hardiwickiico e Cas U degradada, as quais não apresentaram potencial citotóxico.

Neste enfoque, com o intuito de avaliar a importância do pH na degradação da molécula de Cas U e monitorar a sua capacidade citotóxica, a Cas U foi submetida a tratamento com ácido durante 24 h à temperatura de 40 °C. As constatações sugerem um possível mecanismo de degradação, onde pode ser observada a hidrólise ácida da Cas U, promovendo a abertura do anel que inclui os carbonos C-18 e C-19 (TININIS, 2006). É possível que após a hidrólise e abertura do anel diacetálico, que contém os carbonos C-18 e C-19, o dialdeído resultante tenha perdido sua atividade biológica, diminuindo sua capacidade antiproliferativa em valores superiores a 80 vezes para as linhagens HL-60 e MDA/MB-435 ou até mesmo levando à perda total desta atividade biológica, como demonstrado para as células de K-562, MDA/MB-231, PC-3 e SF-295.

Uma vez que se propõe a hidrólise ácida do anel composto pelos carbonos C-18 e C-19 da Cas U, tal reação também poderia estar ocorrendo durante os fracionamentos. Resíduos ácidos na acetonitrila (como ácido acético), no metanol (como ácido fórmico) ou na água poderiam levar a formação de artefatos na purificação de casearinas. A catálise ácida provocada pela sílica ou mesmo nas paredes de vidro dos frascos de coleta e armazenagem das amostras também pode causar estas alterações nesse grupo de substâncias (TININIS, 2006).

As casearinas são moléculas de média polaridade. Com a degradação, essa polaridade aumenta, o que pode ser notado pela presença de duas carbonilas aldeídicas na Cas U degradada, supondo-se que o mecanismo de ação na célula-alvo dependa da capacidade de transpor a membrana celular (TININIS, 2006). Analisando, portanto, os dados químicos e biológicos obtidos para as casearinas, e para a casearina U degradada, é possível inferir que o anel diacetálico das casearinas tem relação direta com a atividade citotóxica. Merece destaque também a fraca atividade

citotóxica observada para o ácido hardiwickiico, indicando a grande importância dos substituintes no esqueleto clerodânico para este tipo de ação biológica.

As casearinas L, O e U, por não serem inéditas, tiveram sua identificação estrutural determinada fundamentalmente a partir da comparação com os dados espectrométricos de casearinas já descritas na literatura (CARVALHO *et al.*, 1998; ITOKAWA *et al.*, 1990; MORITA, *et al.*, 1991; SANTOS, 2001), embora poucos estudos tenham sido realizados a fim de avaliar suas atividades biológicas. Os resultados das análises espectrométricas (RMN e UV) e comparações destes dados com outros existentes permitiram identificar três novos diterpenos clerodânicos, denominados de ácido hardiwickiico, casearinas X e Y e a forma degradada da Cas U.

A elevada capacidade citotóxica mostrada pela maioria dos compostos não se deve a danos na membrana celular, uma vez que nenhum deles lisou eritrócitos de camundongos até a concentração de 200 µg/mL. A estabilidade mecânica da membrana eritrocítica é um bom indicador de insultos *in vitro* em programas de ‘screening’ de citotoxicidade, já que sua dinâmica estrutural favorece interações com drogas e alterações diversas que podem ser avaliadas através do padrão eletroforético de suas proteínas (SHARMA & SHARMA, 2001).

Embora haja uma razoável quantidade de publicações, pouco se sabe a cerca da diversidade dos compostos bioativos presentes nas espécies de Flacourtiaceae (WATERMAN, 1996) e menos ainda quanto ao (s) mecanismo (s) de ação dos inúmeros diterpenos com capacidade citotóxica e antitumoral isolados das folhas da *C. sylvestris*. Apesar dos estudos de citotoxicidade *in vitro* pelo método do MTT serem eficazes na procura de novos agentes antitumorais, este método não permite definir o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996). Assim, posteriormente à análise citotóxica, avaliou-se o possível mecanismo de ação da Cas U utilizando como modelo células leucêmicas promielocíticas humanas (HL-60).

Modelos celulares são ferramentas úteis e necessárias para observar a toxicidade de um composto, traduzida, inicialmente, pela sua capacidade de induzir morte celular, sendo que a linhagem HL-60 está entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados (COLLINS, 1987; MILITÃO *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2007). Os experimentos realizados com as células HL-60 foram: análise da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, síntese de DNA por incorporação da 5-BrDU, análise morfológica por coloração em hematoxilina/eosina e em brometo de etídio/laranja de acridina, fragmentação de DNA por citometria de fluxo e ensaio do cometa. Verificou-se também a capacidade de inibição da Cas U sobre a topoisomerase I e, por

último, foi avaliada a atividade antitumoral da Cas U em camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180.

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan, o qual distingue as células, basicamente, pela integridade da membrana. A Cas U reduziu o número de células viáveis de maneira concentração-dependente. Porém, somente as concentrações de 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$ causaram aumento significativo do número de células não-viáveis, o que confirma os estudos prévios de citotoxicidade por MTT após 24h de incubação, cuja CI_{50} foi de 0,8 $\mu\text{g/mL}$.

A fim de avaliar o mecanismo responsável pelo efeito antiproliferativo determinado por MTT, avaliou-se a habilidade da Cas U em inibir a síntese de DNA usando as concentrações correspondentes a CI_{50} , $\text{CI}_{50}/2$ e $2 \times \text{CI}_{50}$ de 24 h de incubação. A incorporação de 5-BrdU foi inversamente proporcional a concentração, sendo que a de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (valor da CI_{50}) inibiu a proliferação celular em valores percentuais semelhantes ao da doxorrubicina. A concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ promoveu destruição celular tão intensa ao ponto de impossibilitar a quantificação de incorporação. Assim, os resultados obtidos corroboraram os ensaios de citotoxicidade realizados por MTT e os testes de viabilidade por azul de tripan, confirmando a atividade inibitória da Cas U sobre a divisão celular.

A maioria das células do corpo está em estado de quiescência (fase G0). Porém, células em divisão (como epitélios e medula óssea), devem replicar seu genoma de forma fiel e precisa, a fim de evitar mutações somáticas nos genes de regulação do ciclo que podem culminar com a transformação celular. Em média, a fase S dura 6-8 h em cultura primária de fibroblastos, embora a duração exata dependa do tipo celular e não difira entre células normais, imortalizadas ou transformadas (DIMITROVA & BEREZNEY, 2002). A síntese de DNA pode ser alterada por diversas vias tais como as alterações topológicas na molécula do DNA induzidas por drogas. O interesse nas topoisomerases tem aumentado muito nos últimos anos, uma vez que essas enzimas são alvos para drogas com bons resultados no tratamento contra o câncer. Uma delas é a camptotecina, a qual, depois de descoberta, tornou-se uma das substâncias anti-câncer mais estudadas, sendo uma ferramenta biológica importante para entender as funções da topoisomerase I na transcrição e replicação e como estrutura modelo para o desenvolvimento de novas moléculas com ação inibitória específica sobre as topoisomerases (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). O ensaio de relaxamento do DNA revelou que, certamente, o mecanismo de ação antiproliferativo da Cas U não é dependente de uma ação inibitória sobre a topoisomerase I, uma vez que não houve alterações no estado topológico do DNA quando comparado com o controle positivo (camptotecina).

Subseqüentemente ao estudo de inibição de síntese de DNA, alterações morfológicas por coloração em H/E e BE/LA foram investigadas com o intuito de determinar qual mecanismo de morte celular, apoptose ou necrose, estaria relacionado com a citotoxicidade da Cas U.

O termo apoptose, conhecido pelo jargão de morte celular programada ou suicídio celular, foi lançado na comunidade científica em 1972 (KERR, 1972). Ela ocorre normalmente em várias situações fisiológicas (embriogênese e eliminação de anticorpos auto-reativos) e patológicas (agressão aos ácidos nucléicos por radiação e drogas citotóxicas), eliminando células indesejáveis e danificadas, especialmente quando a lesão afeta o DNA (KUMAR *et al.*, 2005). Há duas vias principais de ativação da apoptose: a intrínseca (1), que resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial, da liberação de moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bad e Mcl-1S) no citoplasma e do citocromo *c*, o qual ativa a caspase-9, que é a predominante na iniciação desta via; e a extrínseca (2), que é mediada por receptores de morte, como o Fas (CD95) e TNFr-1 (receptor de fator de necrose tumoral do tipo 1), sendo a caspase-8 a principal iniciadora. A essência da via intrínseca é o equilíbrio entre moléculas pró e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1L) que regulam a permeabilidade mitocondrial (STRASSER *et al.*, 2000).

As caspases são cisteíno-proteases que, quando ativadas, clivam muitas proteínas essenciais, como as lamininas, e o próprio DNA por ação de DNases, destruindo a estrutura nuclear e o citoesqueleto. Essas células exibem decomposição típica do DNA em pedaços de 50 a 300 quilobases, que posteriormente são clivados em oligonucleossomos de 180 a 200 pares de base, por endonucleases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Mudanças morfológicas, como a condensação e fragmentação nucleares e o empacotamento de restos citoplasmáticos em corpos apoptóticos sem danos à membrana e fagocitose destes por macrófagos na ausência de inflamação são observações associadas à apoptose (STRASSER *et al.*, 2000).

Em contraposição à apoptose, a necrose é, morfológicamente, caracterizada por desintegração da membrana plasmática e indução de inflamação ao redor das células mortas atribuível à liberação do conteúdo celular e de moléculas pró-inflamatórias. A aparência morfológica resulta da desnaturação das proteínas intracelulares, da digestão enzimática e da catástrofe bioenergética por depleção de ATP a níveis incompatíveis com a sobrevivência das células devido a insultos tóxicos ou danos físicos (EDINGER & THOMPSON, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

As análises morfológicas das células tratadas com Cas U e coradas por H/E revelaram, na menor concentração (0,4 $\mu\text{g/mL}$), ainda que escassas, algumas células com diminuição de volume,

eosinofilia citoplasmática, provavelmente devido à precipitação de proteínas e densos fragmentos de cromatina nuclear, sinais esses condizentes com processos apoptóticos (KERR *et al.*, 1972; KUMAR *et al.*, 2005). A Cas U 0,8 µg/mL causou as alterações típicas de apoptose supracitadas em uma intensidade muito maior, realçadas ainda mais pelo efeito antiproliferativo evidenciado na rarefação e vacuolização celulares. Além disso, algumas células desintegradas também foram visualizadas, com picnose nuclear e desintegração membranar mais visíveis na maior concentração (1,6 µg/mL), e raras cariólises (basofilia diminuída), essas muito mais evidentes nas células tratadas por doxorubicina.

As avaliações morfológicas feitas por BE/LA mostraram sinais de necrose mais evidentes na maior concentração, informações essas consistentes com os efeitos da Cas U encontrados nos testes de exclusão por azul de tripan, que mostrou maior porcentagem de células mortas, e também com a coloração por H/E. As células em necrose, ou seja, com lesão de membrana, apresentaram um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e sem formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, isso se deve ao fato de que as membranas plasmáticas permanecem intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMAR *et al.*, 2005). Nas concentrações de 0,4 e 0,8 µg/mL, houve aumento de células apoptóticas sem aumento de células necróticas, embora tenha ocorrido redução das viáveis, semelhantemente ao observado por azul de tripan e H/E. Nessas duas menores concentrações, foi notável a abundância de células com aparência sugestiva de apoptose, com cromatina condensada, fragmentada e de um verde brilhante intenso quando excitadas por luz azul (BRIGGS & JONES, 2005).

Apesar do reconhecimento das dificuldades de distinção entre apoptose e necrose, a definição morfológica é, ainda, muito baseada na integridade da membrana (MASQUELIER *et al.*, 2004). Percebeu-se, então, alteração no padrão de morte em favorecimento da necrose diretamente proporcional à concentração da Cas U. O achado de formas de morte celular com características de necrose e apoptose, como foi visto, principalmente, na maior concentração, não são incomuns após estímulos nocivos. Sob tais condições, a severidade, e não a especificidade do estímulo determina a forma seletiva pela qual a morte se expressa. Se as características necróticas predominam, ocorre lesão inicial da membrana plasmática ao invés de redução no tamanho da célula (STRASSER *et al.*, 2000; KUMAR *et al.*, 2005). A regulação concentração-dependente dos processos celulares é uma das mais importantes características de moléculas sinalizadoras normalmente encontradas nas células (CZYZ *et al.*, 2005).

Huang *et al.* (2004), ao avaliar a citotoxicidade das caseamembrinas (A a F) em células PC-3 por MTT, revelaram que a caseamembrina C é a mais ativa entre os seis clerodanos diterpenos, com uma CI_{50} de 0,5 μ M. Ao estudar o mecanismo de ação, eles descobriram que esse composto foi capaz de aumentar a expressão da proteína Mcl-1S e de diminuir a das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL de forma dose-dependente, sugerindo que estas três proteínas tenham um papel central na via de sinalização apoptótica induzida pelo caseamembrina C. Além disso, esse composto causou ativação das caspases-8 e 9, indicando o envolvimento das vias intrínseca e extrínseca no processo de morte celular. Em termos de citotoxicidade da Cas U, resultado semelhante foi encontrado para a linhagem PC-3, demonstrando CI_{50} de 0,86 μ M.

A ativação de cascatas apoptóticas talvez seja uma das razões que explique a maior resistência da linhagem K-562 à Cas U, uma vez que essa linhagem é relativamente resistente a indução de apoptose por uma grande variedade de agentes anti-câncer, como etoposídeo e cisplatina (McGAHON *et al.*, 1995).

Nesse contexto, mudanças morfológicas nas células, como a condensação e fragmentação nucleares, conseqüentemente, do próprio DNA, sugerem mecanismos de indução de morte por apoptose. Com a finalidade de verificar o potencial apoptótico da Cas U, determinou-se por citometria de fluxo, sua capacidade de fragmentação do DNA.

A citometria de fluxo é um método rápido e preciso para acessar a potência e a especificidade de drogas anti-câncer. Um grande número de métodos utilizando a citometria de fluxo identifica as células apoptóticas ao analisar mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a apoptose. A viabilidade de milhares de células e a fragmentação de DNA podem ser analisadas, usando agentes que emitem fluorescência ao intercalar com o DNA, como o iodeto de propídeo. Mudanças na morfologia das células apoptóticas como a redução do volume celular e condensação da cromatina são detectadas pelo desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado (RAMANATHAN, 1997). A Cas U induziu a fragmentação do DNA de células HL-60 em todas as concentrações estudadas quando comparadas ao controle negativo, mostrando resultados concentração-dependentes, sendo que as concentrações de 0,8 e 1,6 μ g/mL causaram quase o dobro e o triplo de fragmentação, que aquele verificado nas células tratadas com doxorubicina, respectivamente. A citometria de fluxo demonstrou aumento de DNA subdiploide e redução de DNA íntegro de acordo com a concentração.

Embora a degradação do DNA seja um dos critérios mais usados para a detecção da apoptose, não há evidências muito seguras que tornem essa degradação a causa primordial e

primária na ativação deste processo, havendo outras características morfológicas de apoptose na completa ausência de fragmentação dos ácidos desoxirribonucléicos (MARIA *et al.*, 2000). Porém, também é fato que o núcleo apoptótico pode ser distinguido pelo conteúdo de DNA hipodiplóide, comparado com o conteúdo diplóide do DNA íntegro (CURI-BOAVENTURA *et al.*, 2003).

É importante lembrar que compostos citotóxicos, supostamente, são capazes de matar células tumorais diretamente, as quais são fagocitadas devido à presença de antígenos que levam à reação imune (OTTER *et al.*, 2002). A necrose, embora inespecífica, possui grande valor quimioterápico já que a inflamação favorece a ativação do sistema imune contra o tumor. Logo, apesar da importância da apoptose na terapia do câncer, ela não é o único meio eficientemente capaz de matar células cancerosas. (MASQUELIER *et al.*, 2004).

Uma vez que a maioria dos compostos vegetais com atividade farmacológica é relativamente pouco estudada em relação ao potencial mutagênico (MAISTRO *et al.*, 2004) e a planta *C. sylvestris* e extratos oriundos de suas diferentes partes são cada vez mais usados popularmente, considerou-se importante avaliar o potencial genotóxico da Cas U através do ensaio do cometa. O ensaio do cometa é um método atraente por sua simplicidade, versatilidade, rapidez e economia na determinação do grau de dano às moléculas de ácido desoxirribonucléico de células eucarióticas, como quebras de fita dupla e simples e alquilações (COLLINS, 2004). Esse ensaio tem alcançado o *status* de teste padrão para avaliar a segurança de novos fármacos (HARTMANN *et al.*, 2003), no biomonitoramento ambiental (DIXON *et al.*, 2002), como ferramenta básica em estudos de reparo de DNA, na avaliação de danos ocupacionais a compostos químicos, radiação, substâncias oxidantes presentes nos alimentos e na associação de estresse oxidativo com várias doenças (COLLINS, 2004).

De acordo com o observado nos experimentos de fragmentação por citometria, as células tratadas com a Cas U e analisadas no ensaio do cometa sofreram fragmentação de maneira concentração-dependente e, independentemente, do tipo celular (HL-60 ou linfócitos). Assim, quanto maior foi a concentração de Cas U, maior a migração do DNA durante a eletroforese devido a sua intensa fragmentação. Percebeu-se, no entanto, que em linfócitos, a Cas U obteve sua FD máxima na concentração de 0,8 µg/mL em valores próximos aos obtidos com doxorrubicina, enquanto que o genoma das células de HL-60 sofreu dano adicional na concentração de 1,6 µg/mL. O ID mostrou elevação significativa e proporcional à concentração em ambos os tipos de células, sendo que o tipo de dano sofrido pelo DNA passou das classes 0 ou 1, as quais são mais encontradas no controle e na menor concentração de Cas U, para as classes 2 ou 3, esta última presente somente na maior concentração da substância (1,6 µg/mL) e da doxorrubicina, a qual

também causou dano de nível 4. Carvalho *et al.* (1998) mostraram que clerodanos diterpenos (casearinas G, S e T) isolados das folhas de *C. sylvestris* foram genotóxicos em ensaios realizados com cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, o que enfatiza a genotoxicidade apresentada por esse grupo de compostos.

A citotoxicidade da Cas U mostrou ser, praticamente, igual contra linfócitos humanos (CI₅₀ de 0,14 µg/mL) e contra células de HL-60 (CI₅₀ de 0,15 µg/mL). No entanto, é importante evidenciar o fato de que, no ensaio do cometa com linfócitos, as concentrações usadas foram baseadas na CI₅₀ da Cas U de 24 h de incubação com células HL-60. Isso poderia explicar o dano mais intenso sobre as células normais, uma vez que os valores de concentração pré-determinados podem ter sido superestimados e, por isso, não estarem correspondendo, exatamente, à CI₅₀ da Cas U após 24 h em linfócitos.

Apesar do grande número de metodologias *in vitro* que podem ser aplicadas na determinação da toxicidade genética, o uso de linfócitos periféricos como células-modelo para comparar a genotoxicidade com a linhagem leucêmica HL-60 deve-se à revelação dos primeiros como indicadores sensíveis aos agentes genotóxicos, pois há correlação entre os danos induzidos nas células do sangue e outras células somáticas, além de apresentarem uma vida relativamente longa, circularem por todos os tecidos e serem de fácil obtenção (ALBERTINI *et al.*, 2000).

A importância da avaliação genotóxica resulta da possibilidade de ultrapassagem da capacidade de reparo do DNA, elevando o risco de mutações e a probabilidade de transformação maligna. Se as células que sofreram danos genômicos sobreviverem, elas transmitirão as alterações às células filhas, as quais poderão desenvolver tumores (ALBERTINI *et al.*, 2000). Porém, o dano ao DNA é somente a primeira etapa do processo carcinogênico, não fornecendo nenhuma informação sobre a potência da Cas U como carcinógeno (MATTIOLI *et al.*, 2006). Além disso, ainda não está claro se os danos encontrados em células sangüíneas brancas refletem aqueles ocorridos em órgãos-alvo (ALBERTINI *et al.*, 2000).

O uso racional de agentes citotóxicos se baseia no fato que eles têm como alvo a transcrição e a replicação de células de tumores em proliferação. No entanto, a inevitável consequência da ausência de seletividade, como a apresentada pela Cas U, leva a efeitos indesejáveis sobre células e tecidos normais (NEIDLE & THURSTON, 2005). Apesar de muitos dos quimioterápicos tradicionais em uso serem considerados ciclo-específicos, agentes alquillantes do DNA, antimetabólitos, inibidores de topoisomerase e aqueles que agem sobre os microtúbulos são pouco seletivos, interferindo diretamente no ciclo celular de todas as células em divisão (FISCHER *et al.*,

2004; DONNICI *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2006). A elucidação da seqüência do genoma humano e a identificação de muitos genes relacionados à proliferação celular podem direcionar as pesquisas para o desenvolvimento de moléculas que regulem a expressão de genes anormalmente expressos ou mutantes (NEIDLE & THURSTON, 2005).

Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005). Fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* da Casearina U foi avaliada usando camundongos transplantados com Sarcoma 180.

O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais freqüentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006). Dentre as doses e formas de administração estudadas, apenas a dose de Cas U 25 mg/kg/dia aplicada via intraperitoneal mostrou atividade neste modelo, causando redução de, aproximadamente, 90 % do crescimento tumoral quando comparado ao controle negativo. Em estudos prévios, o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, na dose de 100 mg/kg/dia, mostrou forte atividade antitumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180, com inibição de 87 % ou até de 98 % do crescimento tumoral quando a atividade biológica responsável foi concentrada no extrato (ITOKAWA *et al.*, 1988). O estudo bioguiado culminou na purificação cromatográfica de seis novos clerodanos diterpenos, as casearinas A, B, C, D, E e F. Posteriormente, os ensaios realizados com a dose de 15 mg/kg/dia, agora com os compostos puros, revelaram e confirmaram a excelente atividade antiproliferativa *in vivo* dos diterpenos, sendo a casearina C a de maior capacidade antitumoral. A principal diferença estrutural entre essas casearinas é a presença de um decanoato como substituinte no C-7 da casearina C (**17**), o que explicaria sua maior citotoxicidade frente a células V-79, devido a maior hidrofobicidade, portanto, maior poder de penetração através da membrana plasmática (ITOKAWA *et al.*, 1990).

O procedimento de isolamento das substâncias testadas neste trabalho sugerem que a menor citotoxicidade revelada pela Cas U degradada deve-se a sua inativação em meio ácido. Com base neste achado, decidiu-se avaliar a atividade antitumoral da Cas U na mesma dose de 25 mg/kg/dia, mas administrada via oral por gavagem. Esse tratamento oral não se mostrou eficaz em reduzir a massa tumoral, sugerindo que o composto tenha sofrido algum tipo de degradação no pH altamente ácido do estômago e, portanto, perdido sua ação antitumoral.

Almeida (2000) mostrou que o extrato alcoólico das folhas foi capaz de inibir o crescimento do tumor experimental Erlich, sugerindo que ele possua potencial antitumoral quando administrado na dose de 300 mg/kg/dia, a mesma dose necessariamente eficaz como antiinflamatória. Esteves *et al.* (2005), ao avaliar a ação antiulcerativa e antiinflamatória do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, mostrou que o mesmo foi capaz de inibir a formação de ulcerações de forma muito eficaz. Portanto, acredita-se que os mesmos compostos - compostos terpênicos - que parecem ser os responsáveis por essa propriedade de proteção da mucosa gástrica, estejam diretamente envolvidos com a ação antiinflamatória e, de maneira indireta, com a capacidade antiproliferativa. De fato, a atividade antiinflamatória dos extratos das partes aéreas de *C. sylvestris* é sua propriedade medicinal mais pesquisada (RUPPELT *et al.*, 1991; SASSIOTO *et al.*, 2004; ESTEVES *et al.*, 2005). A verdade mais aceita é que o extrato inibe a atividade de fosfolipase A₂ (BORGES *et al.*, 2000).

Frequentemente, o câncer é precedido por um longo período de inflamação e micronecroses, que providenciam um cenário adequado no qual ocorrem a regulação epigenética de genes, morte e proliferação celulares e a mutagênese, graças a acumulação de ciclooxigenase e a produção local de óxido nítrico, os quais estão associados com hipermetilação de regiões promotoras de genes pró-apoptóticos ou supressores de tumor. Embora atribuído à resposta imunológica ao tumor, o acúmulo de leucócitos poderia resultar das origens inflamatórias do câncer. Alternativamente, o próprio tumor poderia promover o recrutamento leucocitário subsequente para a liberação de quimiocinas e outras citocinas, que favoreceriam o crescimento tumoral por aumento na produção de fatores de crescimento e angiogênicos (VAKKILA & LOTZE, 2004).

Um dos aspectos mais fáceis e lógicos de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o ganho de peso corpóreo. O peso dos camundongos submetidos à administração de Cas U (intraperitoneal e oral) mostra que apenas a dose de 25 mg/kg i.p. interferiu no crescimento dos animais, indicando a presença de efeitos deletérios. Outra evidência *in vivo* que aponta toxicidade de substâncias são as alterações pós-tratamento (aumento ou diminuição) no peso relativo dos órgãos (BARDOCZ *et al.*, 1996). Dos órgãos dissecados, apenas o baço do grupo Cas U 25 mg/kg i.p. apresentou alteração de importância estatística ($p < 0,01$), manifestada por involução. Ao se observar a associação entre a toxicidade da Cas U i.p. com sua ação antitumoral, acredita-se que o composto que possui atividade antitumoral seja também o responsável pela interferência no peso dos animais e pelo efeito de imunomodulação para baixo evidenciado pelo baço, sugerindo-se uma relação direta entre atividade tóxica e antitumoral o que pode ser corroborado pela ausência de atividade tóxica e antitumoral quando da administração da Cas U v.o. por gavagem.

Ensaio toxicológico realizado com o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* revelou uma DL_{50} de 57,5 mg/kg de peso corpóreo, sendo considerado moderadamente tóxico, de acordo com as categorias de toxicidade estabelecidas por Hodge & Sterner (1944), baseadas para prováveis DL_{50} para o homem, as quais permanecem até os dias atuais. A administração oral subcrônica (30 dias) de doses diárias de 143,9 mg/kg não alterou o consumo de água, ração, não interferiu no ganho de peso nem induziu mudanças patológicas no fígado, rins e baço de ratos (BASILE *et al.*, 1990). Apesar da dose testada via oral ser três vezes superior à DL_{50} , o extrato se mostrou atóxico quando administrado, evidenciando que o fator comumente responsável pela sua toxicidade pode estar sendo degradado pelo trato gastrointestinal, fato que explicaria sua menor toxicidade via oral que àquela apresentada por via intraperitoneal.

Muitas drogas anti-câncer são administradas v.o. ou i.p. A intraperitoneal é a mais rápida e direta, uma vez que garante uma completa biodisponibilidade. A biodisponibilidade oral de drogas está sujeita a barreiras de absorção e aos efeitos de primeira passagem. Como resultado, agentes orais têm, caracteristicamente, variações farmacocinéticas maiores que aqueles administrados no peritônio. Em um estudo com o etoposídeo, o coeficiente de variação foi quase dobrado quando esse antitumoral foi usado v.o. No TGI, a absorção de drogas é governada por diversos fatores como a área de superfície absorptiva, tempo de trânsito, fluxo sanguíneo e pelo pH gástrico e intestinal, além da possibilidade de metabolização e transporte (UNDEVIA *et al.*, 2005). Assim, essas alterações farmacocinéticas podem estar envolvidas na perda de atividade da Cas U quando administrada v.o.

Os estudos histopatológicos dos animais tratados com Cas U 25 mg/kg/dia i.p. mostraram discreta hepatotoxicidade representada por focos inflamatórios e congestão venosa portal, embora esses achados não sugiram evidências importantes de toxicidade na dose utilizada. A degeneração gordurosa em microgotas encontrada no fígado dos animais tratados com 5-FU certamente resulta de defeitos no metabolismo dos ácidos graxos. A hiperplasia das células de Kupffer vista nesses animais pode ser explicada pela ativação de células mononucleadas envolvidas na degradação eritrocitária, na fagocitose de detritos celulares, absorção de ferro ou por focos hemorrágicos devido à congestão vascular. Além disso, esses macrófagos teciduais, quando ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas à toxicidade tecidual local ou sistêmica (KUMAR *et al.*, 2005).

Como o principal órgão detoxificador e metabolizador do corpo, o fígado está sujeito a danos por uma enorme variedade de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais. Embora a maior parte da conversão metabólica das toxinas ocorra no fígado, células renais, células da mucosa

intestinal e dos pulmões e até mesmo da pele também podem estar envolvidas (LIEBLER & GUENGERICH, 2005). De qualquer modo, mesmo lesões hepáticas substanciais ocorridas na presença de xenobióticos (como o 5-FU) são potencialmente reversíveis desde que a arquitetura do tecido conjuntivo se mantenha íntegra e capaz de favorecer a regeneração hepatocelular, ao ponto que mesmo após a morte de 50 % dos hepatócitos por lesão aguda, caso a matriz extracelular e seus componentes estejam intactos, ainda sim pode haver regeneração de lóbulos hepáticos inteiros (KUMAR *et al.*, 2005).

A nefrotoxicidade causada pela Cas U intraperitoneal se deve à hemorragia glomerular e tubular com intensa tumefação do epitélio tubular e ao acúmulo de cilindros hialinos no lúmen tubular. Hemorragias e cilindros hialinos também foram vistos no grupo controle negativo e nos animais tratados com 5-FU, com Cas U 10 mg/kg/dia i.p. e com Cas U 25 mg/kg/dia v.o. A intensa tumefação do epitélio tubular indica leve toxicidade caracterizada por alterações incipientes e reversíveis.

Em relação ao estômago dos animais tratados v.o., não foram encontradas alterações histológicas resultantes de insultos tóxicos, sem focos hemorrágicos e mucosa e submucosa normais. Na verdade, estudos pré-clínicos demonstram que o extrato etanólico das folhas secas e frescas de *C. sylvestris* protegem a mucosa gástrica ao diminuir o volume de ácido clorídrico sem interferir nos processos digestivos e absorptivos, já que o pH estomacal é mantido no intervalo normal que permite a atividade fisiológica da pepsina. A análise qualitativa desse extrato revela a presença de terpenos, cumarinas, taninos e alguns óleos voláteis, compostos que seriam os responsáveis pela atividade gastroprotetora (BASILE *et al.*, 1990; SERTIÉ *et al.*, 2000; ESTEVES *et al.*, 2005).

No geral, a ausência de eosinofilia acentuada, núcleos picnóticos, neutrófilos e membranas celulares desintegradas confirmam a inobservância de áreas necróticas isquêmicas ou apoptóticas na presença de insulto tóxico (Cas U) ou imunológico de caráter irreversível em todos os órgãos corados por H/E e analisados por microscopia óptica (KUMAR *et al.*, 2005), achados que comprovam a discreta toxicidade da Cas U.

CONCLUSÃO

6 – CONCLUSÃO

Dentre os sete diterpenos estudados (ácido hardiwickiico, casearinas L, O, U e sua forma degradada, X e Y), a Cas U foi o que mostrou maior potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Com valores de CI_{50} menores que 1 $\mu\text{g/mL}$, a Cas U apresentou elevado efeito antiproliferativo por inibição de síntese de DNA, indução de morte celular indicativa de apoptose, intensa fragmentação do DNA e ausência de seletividade de ação genotóxica entre células normais (linfócitos periféricos humanos) e cancerosas (HL-60). Além disso, a redução de 90 % do crescimento tumoral e alterações histológicas renais apenas incipientes e reversíveis enfatizam a potencialidade da Cas U como molécula modelo para a síntese de novos compostos com propriedades anti-câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHIK, M., FLOWERS, M. A., KARAGIANIS, G., WATERMAN, P. G. New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. **Nat. Prod. Res.**, 20(6):641-647, 2006.

ABSY, M. L. & SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swarts. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**. 30: 641-676, 1973.

ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E., TICE, R., WATERS, M. D., AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat. Res.**, 463: 111-172, 2000.

ALMEIDA, A. Atividades antiinflamatória e antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Casearia sylvestris*: estudo comparativo com os antiinflamatórios piroxicam e meloxicam [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo - USP, 2000.

BARDOCZ, S., GRANT, G., PUSZTAI, A., FRANKLIN, M. F., CARVALHO, A. F. F. U. The effect of phytohaemagglutinin on the growth, body composition, and plasma insulin of the rat at different dietary concentrations. **British J. Nutr.**, 76: 613-626, 1996.

BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A. A., PANIZZA, S., OSHIRO, T. T., AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol.**, 30: 185-197, 1990.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.

BEZERRA, P. D., MILITÃO, G. C. G., CASTRO, F. O., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., ELMIRO, F. J. M., COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol. in Vitro**, 21:1-8, 2007.

BISSERY, M. A., GUENARD, D., GUERITTE-VOEGELEIN, F., LAVELLE, F. (1991). Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. **Cancer Res.**, 51: 4845-4852.

BLANCO, R. A. Guaçatonga (*Casearia sylvestris*). Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A34guacatonga.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2006.

BORGES, M. H., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIÉRREZ, J. M., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp. Biochem. Physiol.**, 127B: 21–30, 2000.

BRIGGS, C. & JONES, M. SYBR Green I-induced fluorescence in cultured immune cells: A comparison with Acridine Orange. **Acta Histochem.**, 107(4): 301-312, 2005

BURIM, R. V., LOPES, J. L., VICHNEWSKI, W. Genotoxic action of the sesquiterpene lactone centratherin on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 21(6): 383-393, 2001.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Prod.**, 67(12): 2141-2153, 2004.

CAMARGO, F. G., GOMES, E., PANNUNZIO, E., BUENO, V. S. Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swarts) topicamente em lesões de estomatite herpética. **LECTA-USF. Brag Pta.**, 1:121-7, 1993.

CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM (CRUK). CancerStats. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>>. Acesso em: 29 out. 2006.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol. Biotechnol.**, 26: 249-61, 2004.

COLLINS, S. J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, 70: 1233-1244, 1987.

COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A, FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B, CUNHA, K. M. A., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., GRAMOSA, N. V., RAO, V. S. N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, 40: 1231-1234, 2002.

CURY-BOAVENTURA, M. F., POMPÉIA, C., CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clin. Nutr.**, 23(4): 721-732, 2003.

CZYZ, M., SZULAWSKA, A., BEDNAREK, A. K., DUCHLER, M. Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation. **Biochem. Pharmacol.**, 70: 1431-1442, 2005.

DAUER, A., HENSEL, A., LHOSTE, E., KNASMULLER, S., MERSCH-SUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HeG2) using single-cell gel electrophoresis. **Phytochem.**, 63: 199-207, 2003.

DEUTSCHLE, T., PORKERT, U., REITER, R., KECK, T., RIECHELMANN, H. *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. **Toxicol. In Vitro**, 20: 1472–1477, 2006.

DIMITROVA, D. S. & BEREZNEY, R. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells. **J. Cell Sci.**, 115: 4037-4051, 2002.

DIXON, D. R., PRUSKI, A. M., DIXON, L. R. J., JHA, A. N. Marine invertebrate ecogenotoxicology : a methodological overview. **Mutagenesis**, 17: 495-507, 2002.

DOLL, R. & PETO, R. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, 66: 1192-1308, 1981.

DONNICI, C. L., ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L, C, B., MONTANARI, C. A., PAZ M. T. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, 28(1): 118-129, 2005.

EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 16: 663-669, 2004.

EISENHAUER, E. A. & VERMORKEN, J. B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, 55: 5-30, 1998.

EL-ZAYAT, A. A. E., DEGEN, D., DRABEK, S., CLARK, G. M., PETTIT, G. R., VON HO., D. D. *In vitro* evaluation of the antineoplastic activity of combretastatin A-4, a natural product from *Combretum cafferum* (arid shrub). **Anticancer Drugs**, 4(1): 19-25, 1993.

FISCHER, P. M., GLOVER, D. M., LANE, D. P. Targeting the cell cycle. *Drug Disc. Today*, 1(4): 417-423, 2004.

GEBHARDT, R. (2000). *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel. **Planta Med.**, 66: 99-105.

GENG, C. X., ZENG, Z. C., WANG, J. Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World J. Gastroenterol.**, 9: 696 - 700, 2003.

GIBBONS, S., GRAY, A. I., WATERMAN, P. G. Clerodane Diterpenes from the Leaves of *Laetia procera*. **Phytochem.**, 43(3): 635-638, 1996.

GORDALIZA, M., GARCIA, P. A., DEL CORRAL, J. M., CASTRO, M. A., GOMEZ-ZURITA, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**. 44(4): 441-459, 2004.

HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE R, R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline cometa assay. **Mutagenesis**, 18: 45-51, 2003.

HAYASHI, Y., SKWARCZYNSKI, M., HAMADA, Y., SOHMA, Y., KIMURA, T., KISO, Y. A. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. **J. Med. Chem.**, 46(18): 3782-3784, 2003.

HODGE, H. C. & STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **Am. Ind. Hyg. Assoc.**, 10: 94-97, 1944.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. Ed. Graphicars, São Paulo, 196-199, 1939.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Birkhauser, Band 4, Birkhauser Verlag, Basel and Stuttgart, Germany, 1966. 155p.

HORTWIZ, S. B. Personal recollections on the early development of taxol. **J. Nat. Prod.**, 62(7): 136-138, 2004.

HUANG, D. M., SHEN, Y. C., WU, C., HUANG, Y. T., KUNG, F. L., TENG, C. M., GUH, J. H. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. **European J. Pharmacol.**, 503: 17-24, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2006 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2005. 94p.

ITOKAWA, H., TOTSUKA N., MORITA, H., N., TAKEYA, K., IITAKA, Y., SCHENKEL, E. P., MONTIDOME, M. New antitumor Principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, 38(12): 3384-3388, 1990.

ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., TAKEYA, K., WATANABE, K., OBATA, E. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2D NMR spectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**, 36: 1585–1588, 1988.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Rev. Drug Discov.**, 4: 161-165, 2005.

KERR, J. F. R. Apoptosis: a basic morphological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, 26: 239-257, 1972.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. 7. Ed. China: WB Saunders, 2004. 1552p.

LEE, Y. L., KIM, H. J., LEE, M. S., KIM, J. M., HAN, J. S., HONG, E. K., KWON, M. S., LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, 52: 371 - 375, 2003.

LIEBLER, D. C., GUENGERICH, F. P. Elucidating Mechanisms of Drug-induced Toxicity. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 4: 410-420, 2005.

MAGALHÃES, H. I. F., VERAS, M. L., TORRES, M. R., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Pharm. Pharmacol.**, 58: 235-241, 2006.

MAISTRO, E. L., CARVALHO, J. C. T., MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by cometa assay. **Toxicol. In Vitro**, 18: 337-342, 2004.

MARIA, S. S., VIDAL, B. C., MELLO, M. L. S. Image analysis of DNA fragmentation and loss in V-79 cells under apoptosis. **Genet. Mol. Biol.**, 23(1): 109-112, 2000.

MASQUELIER, M., ZHOU, Q. F., GRUBER, A., VITOLS, S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. **Biochem. Pharmac.**, 67: 1047-1056, 2004.

MATTIOLI, F., MARTELLI, A., GOSMARA, M., GARBERO, C., MANFREDI, V., VARALDO, E., TORRE, G. C., BRAMBILLA, G. DNA fragmentation and DNA repair synthesis induced in rat and human thyroid cells by chemicals carcinogenic to the rat thyroid. **Mutation Res.**, 609: 146-153, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1998. 126p.

McGAHON, A. J., MARTIN, S. M., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K. & GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Meth. Cell Biol.**, 46: 153-185, 1995.

McGOWN, A. T. & FOX, B. W. Differential cytotoxicity of combretastatins A1 and A4 in two daunorubicin-resistant P388 cell lines. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 26(1): 79-81, 1990.

MENEZES, P. R., SCHWARZ, E. A., SANTOS, C. A. M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, 75: 398-400, 2004.

MERRIT, A. T. & LEY, S. T. Clerodane diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, 9: 243-287, 1992.

MESQUITA, M. L., GRELLIER, P., MAMBU, L., PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, *Article in Press*, 2006.

MILITÃO, G. C. G., DANTAS, I. N. F., PESSOA, C., FALCÃO, M. J. C., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., CURI, R., LIMA, T., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Plastymiscium foribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, 78(20):2409-2417, 2006.

MOREIRA, D. R. M., LEITE, A. C. L., FERREIRA, P. M. P., COSTA, P. M., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BRONDANI, D. J., PESSOA, C. O. Synthesis and antitumour evaluation of peptidyl-like derivatives containing the 1,3-benzodioxole system. **Eur. J. Med. Chem.**, *Article in Press*, 2006.

MORITA, H., NAKAYAMA, M., KOJIMA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., SCHENKEL, E.P., MOTIDOME, M. Structure and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chem. Pharm. Bull.**, 39: 693-697, 1991.

MOSADDIK, M. A, BANBURY, L., FORSTER, P., BOOTH, R., MARKHAM, J., LEACH, D., WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomed.**, 11: 461-466, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.

NEIDLE, S. & THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nat. Rev. Cancer**, 5: 285-296, 2005.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1002-1037, 2003.

NICOLAOU, K.C., DAI, W. M., GUY, R. K. Chemistry and Biology of Taxol. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 33(1): 15-44, 1994.

OBERLIES, N. H., BURGESS, J. P., NAVARRO, H. A., PINOS, R. E., FAIRCHILD, C. R., PETERSON, R. W., SOEJARTO, D. D., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, A. D., WANI, M. C., WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **J. Nat. Prod.**, 65: 95-99, 2002.

OHSUMI, K., NAKAGAWA, R., FUKUDA, Y., HATANAKA, T., MORINAGA, Y., NIHEI, Y., OHISHI, K., SUGA, Y., AKIYAMA, Y., TSUJI, T. Novel combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationships. **J. Med. Chem.**, 41(16): 3022-3032, 1998.

ORMROD, D. & SPENCER, C. M. Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung cancer. **Drugs**, 58(3): 533-551, 1999.

OTTER, W. D., STEERENBERG, P. A., LAAN, J. W. V. Testing therapeutic Potency of Anticancer Drugs in Animal Studies: A Comentary. **Regulatory Toxicol. Pharmacol.**, 35: 266-272, 2002.

PAILARD, F., FINOT, F., MOUCHE, I., PRENEZ, A., VERICAT, J. A. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol. in vitro** 13: 693-700, 1999.

PAZDUR, R., KUDELKA, A. P., KAVENAGH, J. J., COHEN, P. R., RABER, M. N. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). **Cancer Treat. Rev.**, 19(4): 351-86, 1993.

RAMANATHAN, M. Flow cytometry application in pharmacodynamics and drug delivery. **Pharmaceutical Res.**, 14: 1106-1114, 1997.

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, 99: 1-13, 2003.

REDINBO, M. R., STEWART, L., KUHN, P., CHAMPOUX, J. J., HOL, W. G. J. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. **Sci.** 279(5356): 1504-1513, 1998.

RINGEL, I. & HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **J. Natl. Cancer Inst.**, 83(4): 288-291, 1991.

ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1(4): 364-369, 2001.

RUPPELT, B. M., PEREIRA, E. F. R., GONÇAVES, L. C., PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 86: 203-235, 1991.

SANTOS, A. G. Desenvolvimento de metodologia para a análise de variabilidade intra-específica e dinâmica de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2001.

SASSIOTO, M. C. P., FILHO, N. C., FACCO, G. G., SODRÉ, S. T., NEVES, N., PURISCO, S. U., FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cir. Bras.**, 19(6): 637-641, 2004.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, 1: 411 - 435, 1977.

SERTIÉ, J. A. A., CARVALHO, J. C. T., PANIZZA, S. Antiulcer activity of crude extracts from leaves of *C. sylvestris*. **Pharm. Biol.**, 38: 112-119, 2000.

SCHACTER, L. Etoposide phosphate: what, why, where, and how? **Semin. Oncol.**, 23(6 Suppl 13): 1-7, 1996.

SCHIFF, P. B., FANT, J., HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Nat.**, 277: 665-667, 1979.

SHARMA, P.& SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.**, 74: 239-243, 2001.

SHEN, Y. C., WANG, L. T., WANG, C. H., KHALIL, A. T., GUH, J. H. Two new cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Chem. Pharm. Bull.**, 52(1): 108-110, 2004.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.

SRIVASTAVA, V., NEGI, A. S., KUMAR, J. K., GUPTA, M., KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg. Med. Chem.**, 13: 5892-5908, 2005.

STAKER, B. L., HJERRILD, K., FEESE, M. D., BEHNKE, C. A., BURGIN, A. B., STEWART, .L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 99: 15387-15392, 2002.

STRASSER, A., O'CONNOR, L., DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, 69: 217- 245, 2000.

SUBRAHMANYAM, D., RENUKA, B., RAO, C. B., SAGAR, P. S., DEEVI, D. S., BABU, J. M., VYAS, K. Novel D-Ring Analogues of Podophyllo-.233 toxin as Potent Anti-Cancer Agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8: 1391-1396, 1998.

TININIS, A. G. Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2006.

UNDEVIA, S. D., GOMES-ABUIN, G., RATAIN, M. J. Pharmacokinetic variability of Anticancer Agentes. **Nat. Rev. Cancer**, 5: 447-458, 2005.

UTSUGI, T., SHIBATA, J., SUGIMOTO, Y., AOYAGI, K., WIERZBA, K., KOBUNAI, T., TERADA, T., OH-HARA, T., TSURUO, T. YAMADA, Y. Antitumor activity of a novel podophyllotoxin derivative (TOP-53) against lung cancer and lung metastatic cancer. **Cancer Res.**, 56: 2809–2814, 1996.

VAKKILA, J. & LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat. Rev. Immunol.**, 4: 641-647, 2004.

WALL, M. E., WANI, M. C., COOK, C. E., PALMER, K. H., McPHAIL, A. T., SIM, G. A. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Campto- thecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, 88:3888-3890, 1966.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGIN, P., McPHAIL, A. T. Plant Antitumor Agents: VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, 93: 2325-2327, 1971.

WATERMAN, P. G. Some aspects of the chemistry of the Flacourtiaceae – an underexplored plant family. **Rev. Lat. Am. Quim.**, 24: 100-107, 1996.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Res.** 45: 1-8, 1985.