



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
TOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO E DE DITERPENOS CLERODÂNICOS  
ISOLADOS DAS FOLHAS DA PLANTA *Casearia sylvestris* SWARTZ

Fortaleza – Ceará  
Julho de 2010

Cod. orient. 135275  
Dir. 14045207  
Univ. 25/05/2010

**Paulo Michel Pinheiro Ferreira**

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
TOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO E DE DITERPENOS CLERODÂNICOS  
ISOLADOS DAS FOLHAS DA PLANTA *Casearia sylvestris* SWARTZ**

Tese submetida à Coordenação do Curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Oncologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

T 615.333127  
F4432  
00.01

**Fortaleza – Ceará  
Julho de 2010**

F443e Ferreira, Paulo Michel Pinheiro

Estudos pré-clínicos da atividade antiproliferativa e toxicológica da fração e de diterpenos clerodânicos isolados das folhas da planta *Casearia sylvestris* Swartz / Paulo Michel Pinheiro Ferreira. – Fortaleza, 2010.

157 f. : Il.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,  
Fortaleza-Ce, 2010.

1. Casearia - Toxicidade 2. Antineoplásicos 3.  
Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais 4.  
Diterpenos de Clerodano - farmacologia I. Pessoa,  
Cláudia do Ó (orient.) II. Título

CDD: 615.323138

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E  
TOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO E DE DITERPENOS CLERODÂNICOS  
ISOLADOS DAS FOLHAS DA PLANTA *Casearia sylvestris* SWARTZ**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Farmacologia. Área de Concentração: Oncologia Experimental

Aprovada em 23/ 07/ 2010

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa – Orientadora  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Gardenia ~~Carmen~~ Gadelha Militão  
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

---

Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

---

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais,  
exemplos de caráter, bondade e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, meu enorme agradecimento pela orientação, compreensão, ajuda e disponibilidade que permitiram a realização deste trabalho; pelo papel de guia e grande incentivadora para o desenvolvimento dos trabalhos, sempre disposta a abrir caminhos que facilitem o aprendizado técnico-científico e a evolução profissional e pessoal.

À **Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo**, pelas sugestões 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 anticâncer.

Ao **Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro e Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani**, do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP, Araraquara), pelo isolamento e caracterização química dos diterpenos estudados neste trabalho.

Aos **professores doutores Aristeu Gomes Tininis** (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP, Sertãozinho) e **André Gonzaga dos Santos** (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara) pelo isolamento/análise fitoquímica dos compostos estudados em trabalho conjunto com o NuBBE.

À **Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz**, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC) e à **Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), pela colaboração na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

À **Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão**, da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda de bancada em várias etapas na construção e desenvolvimento dos experimentos *in vitro*.

À **Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro**, por seu interesse na construção deste trabalho com dicas imprescindíveis.

À **Profa. Dra. Ana Paula Negreiro Nunes Alves**, do Departamento de Clínica Odontológica (UFC), pelo auxílio na compreensão de alterações celulares e teciduais.

Ao **Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães**, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC), pela cooperação e amizade inestimável durante todos os anos de convívio dentro e fora do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE).

Ao **Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti**, pela ajuda e sugestões nos experimentos de genotoxicidade.

Aos **amigos professores** da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, pela conversas, idéias, projetos e auxílio, especialmente aos

**doutores Chistiane Mendes Feitosa e Rivelilson Mendes de Freitas** e pelo estímulo sempre que me diziam a seguinte frase (Estimuladora?): Quando é que você termina o seu doutorado? Pois, termina logo que seu "mestre" tá sujando nossos projetos e você tá perdendo oportunidades para crescer na academia"... Sei não viu, ô vida!!!

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

À **Ms. Patrícia Marçal da Costa** (a mulher *Egg & Blotting*), pela cumplicidade, amizade e ajuda nos experimentos.

Ao **Ms. Francisco Washington Araújo Barros** (a forrageira do LOE; não sei onde cabe tanta comida!), pela empolgação científica, ajuda nos experimentos e distração.

Às alunas de Iniciação Científica (IC), **Daisy Jereissati Barbosa Lima e Arinice de Menezes Costa**, por estarem dispostas a me atender mesmo a uma distância de 550 km (Fortaleza ↔ Picos): Daisy você já fez o MTT? Arinice cuide muito bem dos animais, eles valem ouro!!!!

Aos amigos **mestres, doutores e ICs do LOE: José Roberto (Zé**, que foi perturbar a região sudeste do país), **Aline Martins (Microarray!!)**, **Danilo Damasceno, Cecilia Carvalho, Bruno Soares, Paula Jimenez, Elthon Góis, Delano Marinho, Assuero Meira, Ana Jérсия, Aline Sbardelotto, Gabriela Vieira, Hidemburgo, Igor Cabral (Boy do LOE), Rafael Sucupira e Paula Abreu** pelo agradável convívio e ajuda.

À técnica **Silvana França** (ou melhor **Silvana Thatcher**, mas só que de aço), cuja dedicação é essencial para o laboratório, e de quem o controladorismo e a onipresença (Ela sabe de tudo que se passa no LOE mesmo que esteja de férias!) é, muitas vezes, incompreendido e um mistério (necessariamente nesta ordem). À **Erivanda França**, que não nega os laços de sangue, e que tem se tornado cada dia mais necessária à manutenção e crescimento do LOE. À **Rogéria Montenegro**, pelo auxílio sempre disponibilizado.

Às secretárias **Sheyla Prado e Adelânia Marinho**, pela disponibilidade em ajudar a resolver problemas burocráticos, administrativos e até mesmo pessoais.

A minha namorada **Jaksilania Aires Forte**, pela paciência, força, compreensão, amizade e amor inigualável. Sem sua ajuda... Não sei... Acho que não conseguiria.

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

**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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Universidade Federal do Piauí



**“O único lugar onde o *Sucesso* vem antes do *Trabalho* é no dicionário. Se A é o sucesso, então A é igual a X + Y + Z. O trabalho é X; Y é o lazer; Z é manter a boca fechada.”**

Albert Einstein (1879 -1955)

## RESUMO

### ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E TOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO E DE DITERPENOS CLERODÂNICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DA PLANTA *Casearia sylvestris* SWARTZ

Tese de Doutorado. Autor: PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

**Palavras-chave:** *Casearia sylvestris*; diterpenos clerodânicos; atividade antitumoral; toxicidade.

Dentre todas as moléculas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40 % tem origem natural. Porém, a maioria dos antineoplásicos usados na clínica causa efeitos adversos devido a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas. Diante dessa necessidade de desenvolvimento de novos fármacos anticâncer, avaliou-se, inicialmente, a atividade citotóxica *in vitro* de uma Fração rica em Casearinas (FC) e dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), D (Cas D), X (Cas X) e Caseargrevida F (Cas F) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* frente a um painel de 14 linhagens de células tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (PMCB) humano. As substâncias testadas foram citotóxicas contra todas as linhagens utilizadas, sendo a Cas F e Cas X as moléculas mais ativas. Os estudos de mecanismo de ação com a Cas B (1 e 2  $\mu\text{M}$ ), Cas D (2 e 4  $\mu\text{M}$ ), Cas F (0.5 e 1  $\mu\text{M}$ ) e Cas X (0.7 e 1.5  $\mu\text{M}$ ) e FC (0.4 e 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ) usando a linhagem leucêmica HL-60 como modelo experimental mostraram redução na síntese de DNA e na integridade de membrana, fragmentação de DNA e despolarização mitocondrial, especialmente após 24 h de exposição, período durante o qual detectou-se também parada do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Cas X e FC), ativação das caspases iniciadoras -8/-9 e das efetoras -3/-7 e externalização de fostaditilserina (Cas F e X), características condizentes com apoptose e corroboradas pela condensação cromatínica, cariorréxis, vacuolização citoplasmática e rarefação e retração celulares, achados morfológicos melhor observados após 12 e 24 h de incubação. O ensaio do cometa alcalino em PBMC humana revelou que todas as substâncias apresentam potencial genotóxico *in vitro*, possuindo a Cas X o menor índice de dano ao DNA. A avaliação antitumoral em camundongos transplantados com células de Sarcoma 180 mostrou taxas de inibição de crescimento tumoral de 35.8, 86.2 e 53.7 % com as doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral por gavagem da FC após 7 dias de tratamento, respectivamente, embora tal atividade não elevou o tempo de sobrevivência. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para a FC i.p. e oral, foram, respectivamente, 80.9 e 267.1 mg/kg de peso corpóreo. A administração subcrônica da FC durante 30 dias consecutivos em camundongos Swiss via i.p. (5 e 10 mg/kg/dia) diminuiu o ganho de peso, hematócrito, colesterol total, albumina, a glicose e o peso relativo do coração, além de causar linfocitopenia, neutrofilia, hepatoesplenomegalia, aumento do índice de dano ao DNA de PBMC e na formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea enquanto a administração via oral (10 e 20 mg/kg/dia) induziu o aumento do estômago. Ambas as vias de administração causaram tumefação celular e o surgimento de focos inflamatórios no parênquima ou estroma hepático/renal, esteatose microvesicular, acúmulo de pigmentos de hemossiderina, hiperplasia das células de Kupffer, congestão da polpa vermelha e desorganização dos folículos linfóides esplênicos. A grande maioria destas alterações assemelha-se à toxicidade dos quimioterápicos citotóxicos tradicionais e refletem a capacidade antiproliferativa dos diterpenos clerodânicos presentes na FC, enfatizando a potencialidade destas moléculas como modelo para a produção e/ou síntese de novos compostos com propriedades anticâncer.

## ABSTRACT

### PRE-CLINICAL STUDIES OF THE ANTIPROLIFERATIVE AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY OF THE FRACTION AND CLERODANE DITERPENES ISOLATED FROM *Casearia sylvestris* SWARTZ LEAVES

Doctorate Thesis. Author: PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA. Advisor: Dr. Cláudia do Ó Pessoa. Postgraduate Program on Pharmacology, Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.

**Keywords:** *Casearia sylvestris*; clerodane diterpenes; antitumor activity; toxicity.

Among all antitumor molecules available between 1940 and 2002, 40 % has natural origin. However, most of the clinically used antineoplastic compounds lead to adverse effects due to a therapeutic narrow window, pharmacological multiple resistance and morphological and physiological similarities between transformed and normal cells. Given this requirement for the developing of new anticancer drugs, it was initially evaluated the cytotoxic activity of a Fraction rich in Casearinas (FC) and of the diterpen clerodanes casearin B (Cas B), D (Cas D), X (Cas X) e Caseargrewiin F (Cas F) isolated from *Casearia sylvestris* leaves against a panel of 14 tumor cell lines and on human polymorphic blood mononuclear cells (PBMC). The substances tested were cytotoxic against all lines used, being the Cas F and X the most active compounds. Studies of mechanism of action with Cas B (1 and 2  $\mu\text{M}$ ), Cas D (2 and 4  $\mu\text{M}$ ), Cas F (0.5 and 1  $\mu\text{M}$ ), Cas X (0.7 and 1.5  $\mu\text{M}$ ) and FC (0.4 e 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) using the HL-60 leukaemia cell line as experimental model showed DNA synthesis and membrane integrity reduction, DNA fragmentation and mitochondrial depolarization, specially after 24 h exposure, when it was also detected cell cycle arrest in  $G_0/G_1$  phase (Cas X e FC), activation of the initiator -8/-9 and effector -3/-7 caspases and phosphatidylserine externalization, consistent features with apoptosis and corroborated by the chromatinic condensation, karyorrhexis, cytoplasmic vacuolation and rarefaction and cellular shrinkage, morphological findings better observed after 12 and 24 h of incubation. Comet assay in human PBMC revealed that all substances present *in vitro* genotoxic potential, possessing Cas X the lower DNA damage index. Antitumoral evaluation in mice transplanted with Sarcoma 180 cells showed tumor growth inhibition ratios of 35.8, 86.2 e 53.7 % with doses of FC 10 and 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral by gavage after 7 days of treatment, respectively, though such activity did not elevated the survive time.  $DL_{50}$  values for the i.p. and oral FC were 80.9 e 267.1 mg/kg body weight, respectively. The subchronic injection of the FC for consecutively 30 days in Swiss mice (5 and 10 mg/kg/day) decreased the weight gain, hematocrit, total cholesterol, albumin, glucose and heart relative weight besides causing lymphocytopenia, neutrophilia, hepatosplenomegaly, increased rates of DNA damage in PBMC and in micronuclei formation of bone marrow erythrocytes while oral administration (10 and 20 mg/kg/day) led to enlarged stomach. Both routes of administration caused cell swelling and appearance of inflammatory foci in the parenchyma or stroma liver / kidney, microvesicular steatosis, accumulation of hemosiderin pigments, hyperplasia of Kupffer cells, red pulp congestion and disorder of splenic lymphoid follicles. The largest part of these changes is comparable to the toxicity of traditional cytotoxic chemotherapics and reflects the antiproliferative capacity of the clerodane diterpenes present in FC, emphasizing the potential of these molecules as model for production and/or synthesis of new compounds with anticancer properties.

<b>Figura 25</b> – Análise histológica do fígado de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>100</b>
<b>Figura 26</b> – Análise histológica dos rins de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>101</b>
<b>Figura 27</b> – Análise histológica do baço de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>102</b>
<b>Figura 28</b> – Análise histológica do coração de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>103</b>
<b>Figura 29</b> – Análise histológica dos pulmões de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>104</b>
<b>Figura 30</b> – Análise histológica do estômago de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias.....	<b>105</b>
<b>Figura 31</b> – Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do ensaio de cometa alcalino em células mononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) de camundongos Swiss machos adultos.....	<b>109</b>
<b>Figura 32</b> – Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células) observados na medula óssea de camundongos Swiss machos adultos.....	<b>110</b>
<b>Figura 33</b> – Resumo dos resultados dos estudos de avaliação da atividade citotóxica e antitumoral dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F), casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas da planta <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>111</b>
<b>Figura 34</b> – Resumo dos resultados dos estudos de toxicidade aguda e subcrônica (30 dias de tratamento) da Fração rica em Casearinas (FC) obtida das folhas da planta <i>Casearia sylvestris</i> em camundongos Swiss.....	<b>112</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-desoxiuridina
<b>Cas B</b>	Casearina B
<b>Cas D</b>	Casearina D
<b>Cas F</b>	Caseargrevina F
<b>Cas X</b>	Casearina X
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória Média
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DD</b>	<i>Death Domain</i> (Domínio de Morte)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dox</b>	Doxorrubicina
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FC</b>	Fração rica em Casearinas
<b>ID</b>	Índice de dano
<b>IGDE</b>	<i>Isobutyl Gallate-3,5-Dimethyl Ether</i> (3,5-dimetóxi-galato de isobutila)
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>MGDE</b>	<i>Methyl Gallate-3,5-Dimethyl Ether</i> (3,5-dimetóxi- galato de metila)
<b>MN(s)</b>	Micronúcleo(s)
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
<b>NCI-US</b>	<i>National Cancer Institute of United States</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
<b>PBMC</b>	Células polimorfonucleares de sangue periférico ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
<b>RDW</b>	Varição da distribuição do tamanho eritrocitário ( <i>Red cell Distribution Width</i> )
<b>RPMI</b>	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
<b>Sarcoma 180</b>	S-180
<b>TBS</b>	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
<b>U</b>	Unidade
<b>7-AAD</b>	7-Amino-Actinomicina-D

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
1 – INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Câncer: Considerações Gerais e Epidemiologia.....	21
1.2 Morte Celular por Necrose e Apoptose.....	23
1.3 Produtos Naturais com Atividade Anticâncer.....	27
1.4 Planta estudada: <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	31
1.4.1 Propriedades Farmacológicas.....	33
1.4.2 Terpenos - Diterpenos Clerodânicos.....	34
1.5 Toxicidade de Plantas.....	37
1.6 Genotoxicidade.....	38
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Materiais.....	44
3.2 Métodos.....	50
3.2.1 Extração da Fração rica em Casearinas e isolamento dos diterpenos clerodânicos Casearina B, Casearina D, Caseargrevina F e Casearina X.....	50
3.2.2 Determinação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> contra Linhagens Tumorais – Ensaio do MTT.....	51
3.3 Estudos do Mecanismo de Ação <i>in vitro</i> .....	53
3.3.1 Análise morfológica – Coloração por May-Grünwald-Giemsa.....	53
3.3.2 Avaliação da inibição da síntese de DNA através da incorporação de 5-bromo-2-desoxiuridina.....	53
3.3.3 Citometria de Fluxo.....	54
3.3.3.1 Integridade de Membrana.....	54
3.3.3.2 Ciclo Celular e Fragmentação de DNA.....	55
3.3.3.3 Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.....	55
3.3.3.4 Caspases-3, -7, -8 e -9.....	56
3.3.3.5 Externalização de Fosfatidilserina – Ensaio de Anexina V.....	56
3.3.3.6 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	57
3.4. Estudo da Capacidade Antiproliferativa em Células de Sarcoma 180.....	57
3.4.1 Determinação da Citotoxicidade em Cultura Primária do Tumor Sarcoma	

<b>180 – Ensaio do Alamar Blue</b> .....	<b>58</b>
<b>3.4.2 Avaliação da Atividade Antitumoral em Camundongos transplantedos com Sarcoma 180</b> .....	<b>59</b>
3.4.2.1 Observações Hematológicas e Histológicas.....	59
3.4.2.2 Análise de Sobrevivência.....	60
<b>3.5 Caracterização Toxicológica da Fração rica em Casearinas</b> .....	<b>60</b>
<b>3.5.1 Determinação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> em Cultura Primária de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano – Ensaio do Alamar Blue</b> .....	<b>60</b>
<b>3.5.2 Avaliação da Genotoxicidade <i>in vitro</i> contra Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano – Ensaio do Cometa</b> .....	<b>61</b>
<b>3.5.3 Determinação da Toxicidade Aguda</b> .....	<b>63</b>
<b>3.5.4 Determinação da Toxicidade Subcrônica</b> .....	<b>64</b>
3.5.4.1 Análise do Perfil Bioquímico e Hematológico.....	64
3.5.4.2 Determinação do Potencial Genotóxico <i>in vivo</i> – Ensaio do Cometa.....	64
3.5.4.3 Determinação de Danos Cromossômicos – Teste do Micronúcleo.....	65
3.5.4.4 Observações Histopatológicas.....	65
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1 Identificação das Casearinas na Fração rica em Casearinas</b> .....	<b>67</b>
<b>4.2 Atividade Citotóxica</b> .....	<b>69</b>
<b>4.3 Inibição da incorporação de BrdU</b> .....	<b>72</b>
<b>4.4 Alterações Celulares avaliadas por Citometria de Fluxo</b> .....	<b>73</b>
4.4.1 Integridade de Membrana.....	73
4.4.2 Fragmentação Internucleossomal de DNA.....	74
4.4.3 Despolarização Mitocondrial.....	75
4.4.4 Parada do Ciclo Celular na fase G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> .....	77
4.4.5 Incapacidade de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio.....	80
4.4.6 Ativação de Caspases Iniciais -8/ -9.....	80
4.4.7 Ativação de Caspases Efetoras -3/-7.....	80
4.4.8 Externalização de Fosfatidilserina.....	83
<b>4.5 Alterações morfológicas</b> .....	<b>85</b>
<b>4.6 Atividade Antitumoral da Fração rica em Casearinas</b> .....	<b>89</b>
4.6.1 Leucograma.....	91
4.6.2 Morfologia Tumoral.....	92
<b>4.7 Toxicidade da Fração rica em Casearinas</b> .....	<b>93</b>
4.7.1 Genotoxicidade <i>in vitro</i> em PBMC.....	93

<b>4.7.2 Toxicidade Aguda.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7.3 Toxicidade Subcrônica.....</b>	<b>95</b>
4.7.3.1 Alterações Macroscópicas.....	95
4.7.3.2 Alterações Microscópicas – Histopatologia.....	98
4.7.3.3 Alterações Funcionais Bioquímicas e Hematológicas.....	106
4.7.3.4 Genotoxicidade <i>in vivo</i> e Danos Cromossômicos.....	109
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>5.1 Atividade Citotóxica e Antitumoral.....</b>	<b>114</b>
<b>5.2 Toxicidade.....</b>	<b>125</b>
<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA - UFC).....</b>	<b>157</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Alguns exemplos de fármacos antitumorais encontrados em plantas.....	29
<b>Tabela 2</b> – Linhagens celulares tumorais utilizadas na avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> através do ensaio de MTT.....	52
<b>Tabela 3</b> – Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de diterpenos clerodânicos e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> após 72 h de incubação quantificada através do ensaio de MTT.....	70
<b>Tabela 4</b> – Citotoxicidade de diterpenos clerodânicos e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> quantificada em cultura primária de células do tumor Sarcoma 180..	72
<b>Tabela 5</b> – Efeitos dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> sobre as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 determinados por citometria de fluxo (iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato) após 6 e 12 h de incubação.....	78
<b>Tabela 6</b> – Efeitos dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> sobre as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 determinados por citometria de fluxo (iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato) após 24 h de incubação.....	79
<b>Tabela 7</b> – Atividade antitumoral da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> e seus efeitos sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180.....	90
<b>Tabela 8</b> – Alterações no leucograma do sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com uma Fração rica em Casearinas (FC).....	92

<b>Tabela 9</b> – Efeitos da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos tratados via intraperitoneal (10 e 25 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos.....	<b>97</b>
<b>Tabela 10</b> – Perfil bioquímico sérico do sangue periférico de camundongos Swiss machos adultos tratados com a Fração rica em Casearinas.....	<b>107</b>
<b>Tabela 11</b> – Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos albinos Swiss machos adultos tratados com a Fração rica em Casearinas.....	<b>108</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.....	22
<b>Figura 2</b> – Esquema demonstrando as principais vias de ativação da apoptose, suas interconexões e as alterações morfológicas mais características.	26
<b>Figura 3</b> – <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	32
<b>Figura 4</b> – Substituintes R <sup>1</sup> -R <sup>5</sup> das casearinas A-X, Caseagrevina F e casearvestrinas A-C.....	35
<b>Figura 5</b> – Outros diterpenos clerodânicos extraídos de diferentes partes de <i>Casearia sylvestris</i> .....	36
<b>Figura 6</b> – As várias possibilidades do bloqueio da divisão celular resultante da exposição a agentes genotóxicos e/ou citotóxicos.....	40
<b>Figura 7</b> – Estrutura dos diterpenos clerodânicos isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> : Casearina B (2), Casearina D (4), Casearina X (23) e Caseagrevina F (27).....	51
<b>Figura 8</b> – Representação dos tipos de cometa, sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA.....	63
<b>Figura 9</b> – Perfil cromatográfico da Fração rica em Casearinas (FC) obtido a partir das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> por cromatografia líquida quantitativa de alta eficiência.....	68
<b>Figura 10</b> – Inibição da síntese de DNA avaliada através da incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação.....	73
<b>Figura 11</b> – Integridade de membrana de células leucêmicas da linhagem HL-60 analisada com iodeto de propídeo através de citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação.....	74
<b>Figura 12</b> – Fragmentação do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 revelada com iodeto de propídeo e triton X-100 através de citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação.....	75
<b>Figura 13</b> – Despolarização mitocondrial de células leucêmicas da linhagem HL-60 com rodamina 123 por citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação.....	76

<b>Figura 14</b> – Perfil das alterações celulares envolvidas na capacidade citotóxica da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> determinado por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de exposição.....	<b>77</b>
<b>Figura 15</b> – Ativação das caspases iniciadoras -8 (A) / -9 (B) analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação.....	<b>81</b>
<b>Figura 16</b> – Ativação das caspases efetoras -3/-7 analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação.....	<b>82</b>
<b>Figura 17</b> – Externalização de fosfatidilserina analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 com anexina-V e 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD) após 6, 12 e 24 h de incubação.....	<b>84</b>
<b>Figura 18</b> – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 6 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevina F [0.5 µM (C), 1 µM (D)] e casearina X [0.7 µM (E), 1.5 µM (F)] isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>86</b>
<b>Figura 19</b> – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 12 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevina F [0.5 µM (C), 1 µM (D)] e casearina X [0.7 µM (E), 1.5 µM (F)] isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>87</b>
<b>Figura 20</b> – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevina F [0.5 µM (C), 1 µM (D)] e casearina X [0.7 µM (E), 1.5 µM (F)] isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>88</b>
<b>Figura 21</b> – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer de camundongos Swiss machos tratados com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 22</b> – Morfologia de células da linhagem tumoral Sarcoma 180 extraídas de camundongos Swiss machos adultos.....	<b>93</b>
<b>Figura 23</b> – Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do ensaio de Cometa Alcalino em células mononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) de voluntários humanos sadios.....	<b>93</b>
<b>Figura 24</b> – Avaliação do crescimento de camundongos Swiss machos adultos durante o tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .....	<b>96</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer: Considerações Gerais e Epidemiologia

O câncer é definido como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de diferentes tipos presentes em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo espalhar-se (metástase) para regiões distantes do organismo (KUMAR et al., 2004; INCA, 2010).

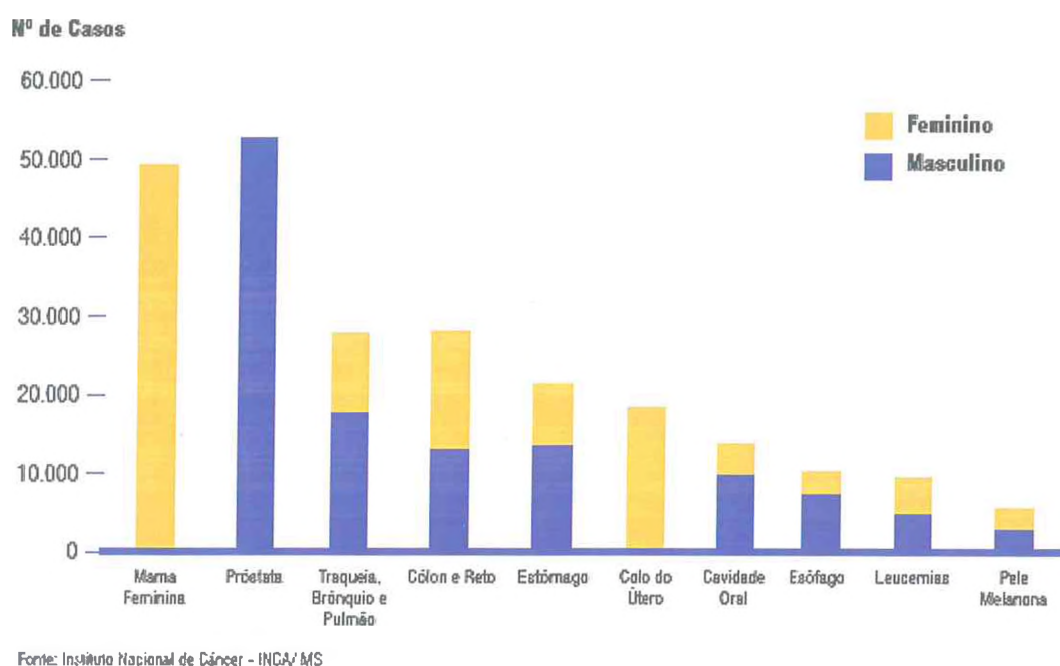
Considera-se neoplásica a célula que adquire as seguintes vantagens metabólicas e capacidades biológicas quando comparadas às células não transformadas: a) perda do controle da proliferação e divisão celular; b) imortalização celular devido à ativação da enzima telomerase; c) alterações cromossômicas (de forma e número); d) perda das propriedades adesivas da membrana plasmática, que permite o reconhecimento célula-célula e a inibição por contato do movimento e crescimento celular; e) perda de função e da capacidade de diferenciação ou especialização; f) capacidade para invadir tecidos vizinhos ou distantes e formar metástases; g) capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Dessa forma, todos os casos de câncer estão envolvidos com as vias de transmissão de sinais biológicos e no controle positivo e negativo do ciclo celular e da morte celular programada (LIOTTA & KOHN, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

A idéia de que substâncias químicas possam desencadear a formação de tumores é bem antiga. Em 1775, o inglês Sir Percival Pott verificou e correlacionou cânceres no escroto de limpadores de chaminé com a fuligem e o carvão. Um século mais tarde, em Frankfurt, Rehn relatou uma maior incidência de câncer de bexiga em pessoas que trabalhavam na seleção manual de cristais de anilina (DOLL & PETTO, 1981). Nos últimos 25 anos, estudos epidemiológicos tem confirmado a contribuição de fatores específicos do estilo de vida na etiologia do câncer, tornando o câncer uma doença capaz de ser prevenida em cerca de 50% dos casos (COLDITZ et al., 1996). Os fatores ambientais divergem bastante entre as populações e incluem obesidade, ausência de atividade física, peso ao nascer, idade de início da puberdade, dieta, infecções microbianas, consumo de álcool, uso de tabaco e de medicamentos, exposição ocupacional (água e ar) e causas de base reprodutiva. Todos esses fatores ambientais com potencial carcinogênico podem demorar anos até transformarem a célula de forma a originar um tumor clinicamente detectável (DOLL e PETO, 1981; COLDITZ et al., 1996; RIBEIRO et al., 2003). Esse lento processo de carcinogênese 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, quando, pelo menos, dois mecanismos independentes estão envolvidos, a ativação gênica e a atividade mitótica. Neste momento, o estilo de vida pode ter efeitos benéficos e evitar o desenvolvimento do câncer. A progressão é caracterizada pela proliferação descontrolada, por alterações metabólicas e morfológicas interpretadas como perda de diferenciação e alta agressividade das células malignas, evoluindo para manifestações clínicas e metástases (ALMEIDA et al., 2005; ESSERS et al., 2006).

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, sendo responsável por 25 % das mortes. Acredita-se que até 2020 mais 20 milhões de novos casos irão surgir (ALMEIDA et al., 2005; CRUK, 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 apontam que ocorrerá um total de 489.270 novos casos de câncer, sendo 236.240 casos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (**Figura 1**). Somente no estado do Ceará surgirão 18.150 novos casos (3,71 % do total) (INCA, 2010).



**Figura 1** – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.

Atualmente, o tratamento da maioria dos cânceres consiste na combinação de diferentes abordagens terapêuticas diferindo, principalmente, em relação ao tipo e à gravidade da doença. A quimioterapia, aliada à cirurgia e à radioterapia, constituem as principais modalidades utilizadas (KUMAR et al., 2004). A quimioterapia consiste em um tratamento a base de fármacos que interfere em processos distintos tais como crescimento, disseminação e invasão tecidual por células cancerígenas (SOUZA et al., 2007). O câncer pode ser tratado através de monoquimioterapia ou poliquimioterapia, esta mais utilizada por apresentar resultados mais eficientes, ao reduzir o risco de resistência e atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO et al., 2003). Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma inespecífica, lesionando tanto células malignas quanto normais (ANAZETTI et al., 2003; KATZUNG et al., 2003; COSTA et al., 2008), particularmente, aquelas de crescimento rápido, como as do trato gastrointestinal, dos bulbos capilares e da medula óssea, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo, emagrecimento e maior susceptibilidade às infecções. Porém, na grande maioria dos casos, o corpo recupera-se após o tratamento, sendo que o uso clínico dos mesmos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na procura de um índice terapêutico favorável (KATZUNG et al., 2003).

## **1.2 Morte Celular por Necrose e Apoptose**

A homeostase nos organismos multicelulares é realizada pelo equilíbrio entre a proliferação e a morte de células. A desregulação destes mecanismos implica no surgimento de doenças como o câncer e doenças auto-imunes (FISCHER et al., 2004). Com o propósito de pesquisar e compreender essas patologias, diversos tipos de morte celular vêm sendo descritos, tais como a apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica, excitotoxicidade e senescência. No entanto, a apoptose e a necrose são os tipos mais intensamente estudados (KRYSKO et al., 2008).

Na necrose a célula apresenta maior permeabilidade de sua membrana, as organelas se dilatam, causando aumento de volume da célula, os ribossomos se dissociam do retículo endoplasmático rugoso e o núcleo se desintegra. Embora alguns casos de necrose mostrem condensação cromatínica, núcleos fragmentados não é uma característica comum, ao contrário do que é visto na apoptose (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004). 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). A diminuição na produção de ATP causa interferência na função ou inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , levando a tumefação celular devido ao aumento de  $\text{Na}^+$  citosólico e ocasionando a perda da permeabilidade seletiva da membrana



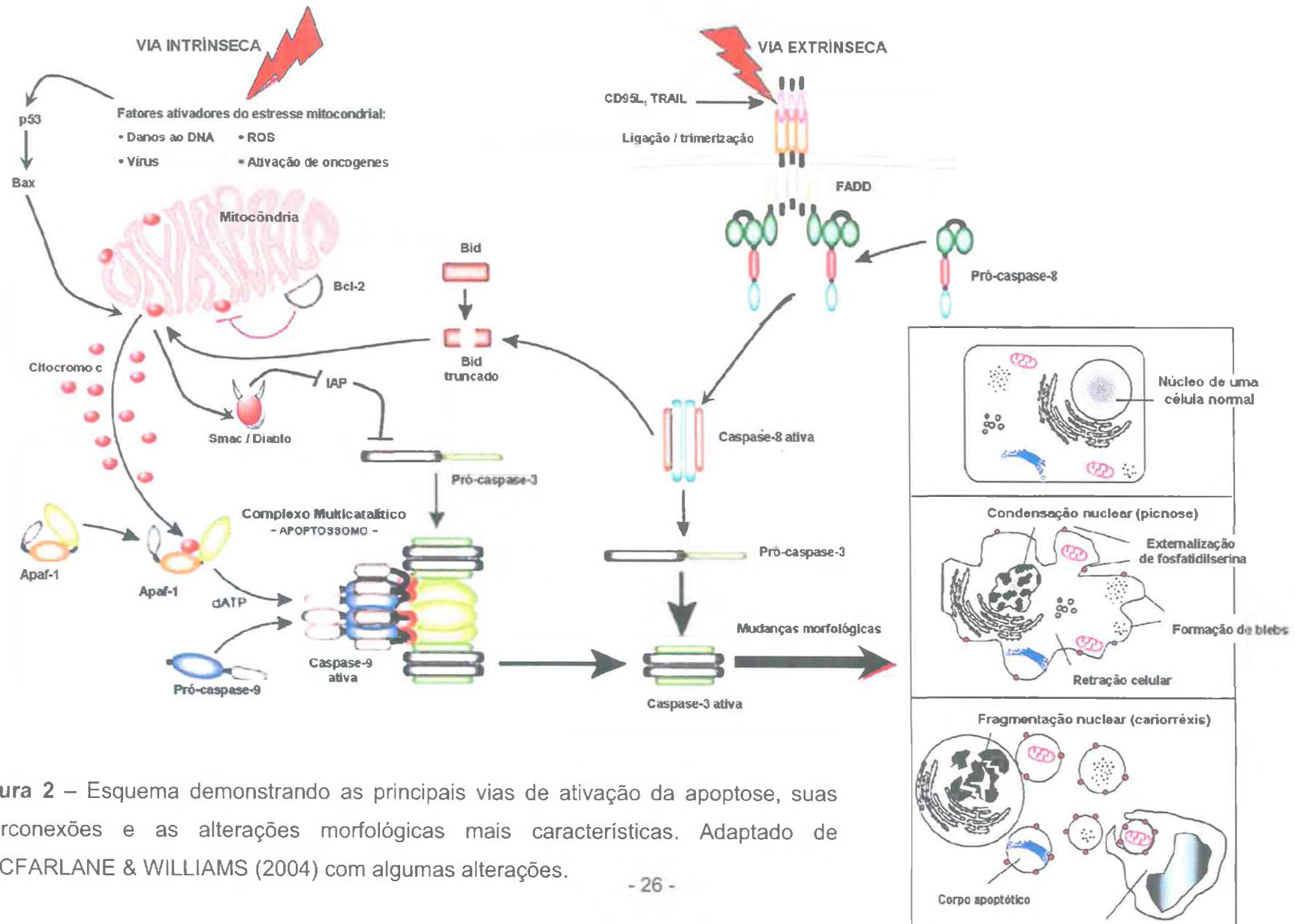
O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem ruptura da membrana plasmática, extravasamento do conteúdo celular e ativação de resposta inflamatória (EDINGER & THOMPSON, 2004; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Por outro lado, o conceito de morte celular programada foi proposto pela primeira vez em 1965 por LOCKSHIN & WILLIAMS (1965) para indicar uma forma não acidental de morte, mas foi somente em 1972 que Kerr sugeriu o termo 'apoptose', uma palavra de origem grega que significa 'cair fora' ou 'folhas caindo das árvores no outono', para sugerir um tipo de suicídio celular a fim de eliminar células indesejáveis ou desnecessárias ao organismo mediante a ativação de um programa bioquímico de desmontagem dos componentes celulares, internamente controlado, que requer energia e não envolve processo inflamatório (KERR, 1972). A apoptose possui papel chave para o desenvolvimento tecidual durante a embriogênese, na renovação celular e atrofia fisiológica de órgãos, como do útero e das mamas após o parto e desmame e na deleção de linfócitos T auto-reativos ou não responsivos no timo (STRASSER et al., 2000; KUMAR et al., 2004). A ativação da apoptose ocorre por duas vias gerais: via extrínseca e intrínseca (**Figura 2**).

Quando a via intrínseca é ativada (**Figura 2**), o primeiro passo é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial seguida da liberação de proteínas que normalmente estavam localizadas no espaço intermembranar [citocromo c, fator de indução da apoptose, Smac/DIABLO (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low Propidium iodidel*), entre outros]. O citocromo c se liga a Apaf-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) e forma um complexo multicatalítico chamado apoptossomo. Este complexo ativa a caspase-9 a partir de sua forma zimogênica pró-caspase-9. Então, a caspase-9 cliva as caspases efetoras -3, -6 e -7, ativando-as para realizar a fragmentação do DNA (KUMAR et al., 2004; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A via de receptor de morte ou via extrínseca (**Figura 2**) envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor receptor* - rTNF). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana rTNF-1, FAS (CD95), TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma denominado de domínio de morte (*Death Domain* - DD) que contém uma seqüência de 65 aminoácidos. Após a associação dos receptores de membrana ao seu correspondente DD, ocorre uma mudança conformacional nos receptores, o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora FAS que irá associar-se com o domínio de morte (DD) formando o FADD. Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a procaspase-8 e forma caspase-8 (STRASSER et al., 2000; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Além da caspase-3, as duas vias de ativação da apoptose podem estar interligadas através do Bid, uma proteína encontrada no citosol das células e que normalmente é clivada pela caspase-8, formando uma proteína truncada, tBid, a qual é translocada para a mitocôndria, onde ativa o Bax, iniciando a liberação do citocromo *c* e, conseqüentemente, a disfunção mitocondrial (LI et al., 1998; LUO et al., 1998). Após um estímulo de morte, a proteína Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro de Bax ou por competir os sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (HENGARTNER, 2000). Portanto, o processo de apoptose está totalmente interligado para a amplificação do sinal apoptótico e ativação das caspases, embora a essência da via intrínseca seja determinada pelo equilíbrio entre as moléculas protéicas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) que regulam a permeabilidade mitocondrial (STRASSER et al., 2000).



**Figura 2** – Esquema demonstrando as principais vias de ativação da apoptose, suas interconexões e as alterações morfológicas mais características. Adaptado de MACFARLANE & WILLIAMS (2004) com algumas alterações.

### 1.3 Produtos Naturais com Atividade Anticâncer

As estruturas dos compostos naturais possuem alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como modelos para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Essas características se devem a diversos fatores: maior número de centros quirais, átomos de oxigênio, aceptores e doadores de hidrogênio e rigidez molecular quando comparados aos compostos sintéticos. É possível que essa seleção de fatores se deva à pressão evolutiva que os organismos estejam passando a milhares de anos ao interagir com uma grande variedade de proteínas e outros tipos de alvos específicos, o que explica, pelo menos em parte, a eficácia dos produtos naturais nas mais variadas terapias farmacológicas (FEHER & SCHMIDT, 2003).

Entre 1981 e 2002, das 1.031 novas entidades químicas (*New Chemical Entities - NCE*) aprovadas como medicamento pelo *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. Apesar do interesse na modelagem molecular, na química combinatória e outras técnicas de síntese química, 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 (NEWMAN et al., 2003; BUTLER, 2004; BALUNAS & KINGHORN, 2005; FERREIRA et al., 2008).

Desde 1500 a.C., as plantas e seus extratos, chás e infusões têm sido reconhecidos como detentoras de potencial anticâncer (LYONS & PETRUCELLI, 1978; BUTLER, 2004). Entretanto, o estudo racional e ordenado de plantas como fonte de agentes antineoplásicos começou apenas em 1947 com o pioneirismo de Lee Hartwell e colaboradores, quando os constituintes vegetais foram caracterizados e associados à atividade antitumoral do extrato bruto (PETER, 1997). Segundo Dewick (1996), através da bioprospecção de 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de plantas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute of United States, NCI-US*) identificou importantes compostos antitumorais como a camptotecina, a podofilotoxina, a combretastina e o paclitaxel (SRIVASTAVA et al., 2005) (Tabela 1). Assim, de todas as moléculas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40 % tem origem natural ou de derivados de produtos naturais e outros 8 % foram substâncias sintéticas inspiradas em moléculas naturais (NEWMAN et al., 2003).

Devido à grande importância que as substâncias naturais representam na prática clínica, inúmeros análogos foram sintetizados na tentativa de se obter fármacos mais potentes. Assim foi com o diterpeno Paclitaxel (Taxol®) que, inicialmente, 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 pelo FDA para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER & VERMORKEN, 1998). Apesar de ter sido a droga mais vendida no ano de 2000, o paclitaxel apresenta baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água (SCHIFF et al., 1979) e causa fortes náuseas, formigamento nos pés e mãos, leucopenia e trombocitopenia. Alguns anos depois surgiu o Docetaxel (Taxotere®), um análogo estrutural com propriedades farmacológicas melhores que o taxol (atividade antitumoral e solubilidade aquosa), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão, embora cause supressão da medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos e alopecia (RINGEL & HORWITZ, 1991). Com solubilidade 1.800 vezes maior que o paclitaxel, a pró-droga Isotaxel surgiu como uma molécula inativa, mas após 12 min em pH fisiológico ocorre a conversão do isotaxel a taxol (HAYASHI et al., 2003). Já o Nab-paclitaxel (ABI-007; Abraxane®) é uma nova formulação do paclitaxel que dispensou o uso do cremofor como solvente, diminuiu os efeitos colaterais (neuropatia periférica e neutropenia, principalmente) e aumentou a eficácia do tratamento quando comparada ao paclitaxel e docetaxel (ISMAEL et al., 2008).

Tabela 1 – Alguns exemplos de fármacos antitumorais encontrados em plantas.

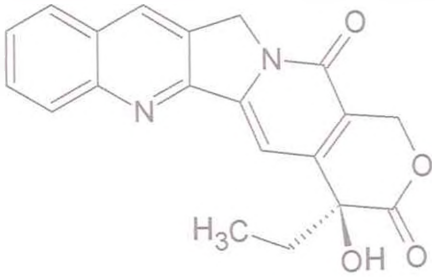
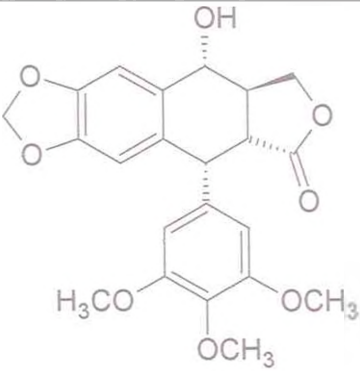
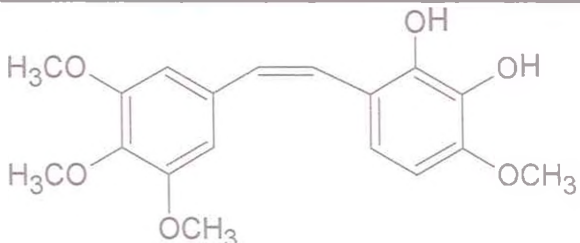
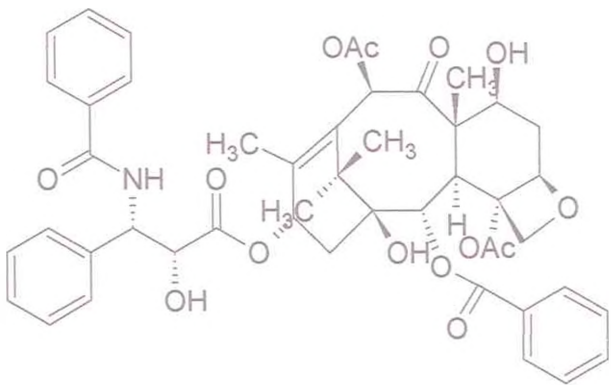
Estrutura	Classe / Origem	Mecanismo de Ação Original / Derivados	Atividade citotóxica e antitumoral	Referência
 <p data-bbox="450 810 685 842">Camptotecina A-1</p>	<p data-bbox="958 507 1077 536">Alcalóide</p> <p data-bbox="958 608 1137 687"><i>Camptotheca acuminata</i></p>	<p data-bbox="1272 507 1462 576">Inibição da topoisomerase I</p> <p data-bbox="1227 647 1507 906">Topotecan (Hycamptin®) Irinotecan (Camptosar®) Rubitecan (Orathecin®) Lurtotecan (NX211) Mesilato de Exatecan (DX-8951f)</p>	<p data-bbox="1547 507 1765 576">Mama, cólon, reto e pâncreas</p>	<p data-bbox="1805 507 2060 810">WALL et al. (1966); REDINBO et al. (1998); STAKER et al. (2002); ROYCE et al. (2004); SRIVASTAVA et al. (2005)</p>
 <p data-bbox="472 1318 663 1342">Podofilotoxina</p>	<p data-bbox="958 922 1070 951">Lignano</p> <p data-bbox="958 1023 1137 1102"><i>Podophyllum peltatum</i></p>	<p data-bbox="1227 922 1507 1134">Parada do ciclo celular na metáfase devido ao bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II</p> <p data-bbox="1227 1198 1507 1273">Etoposídeo (Vepesid®) Tenoposídeo Vumon®</p>	<p data-bbox="1547 922 1771 1321">Tumores de Wilms, de pulmão, linfomas, leucemia aguda, pulmão, cérebro e contra vários cânceres genito-urinários (ovário, bexiga e teratomas)</p>	<p data-bbox="1805 922 2060 1230">UTSUGI et al. (1996); SCHACTER (1996); SUBRAHMANYAM et al. (1998); GORDALIZA et al. (2004)</p>

Tabela X – Alguns exemplos de fármacos antitumorais encontrados em plantas (continuação).

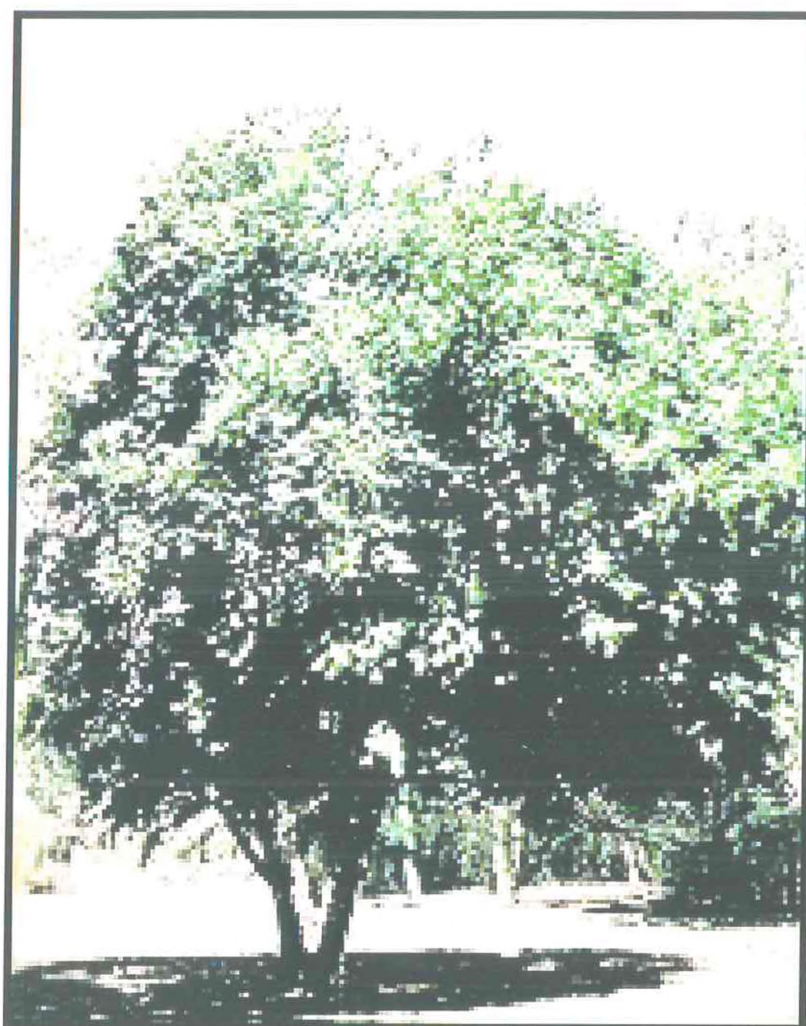
Estrutura	Classe / Origem	Mecanismo de Ação Original / Derivados	Atividade citotóxica e antitumoral	Referência
 <p data-bbox="439 826 707 855">Combretastatina A-1</p>	<p data-bbox="965 555 1093 587">Estilbeno</p> <p data-bbox="965 659 1099 738"><i>Cobretum caffrum</i></p>	<p data-bbox="1229 555 1514 675">Despolimerização e supressão da dinâmica dos microtúbulos</p> <p data-bbox="1229 746 1469 855">Combretastatina A-4 Combretastatina A-4 fosfato</p>	<p data-bbox="1554 555 1749 627">Cólon, pulmão e leucemias</p>	<p data-bbox="1809 555 1984 587">OHSUMI et al. (1998);</p> <p data-bbox="1809 651 2045 722">SRIVASTAVA et al. (2005)</p>
 <p data-bbox="510 1353 645 1385">Paclitaxel</p>	<p data-bbox="965 882 1137 914">Diterpenóide</p> <p data-bbox="965 986 1178 1010"><i>Taxus brevifolia</i></p>	<p data-bbox="1229 882 1491 962">Estabilização dos microtúbulos</p> <p data-bbox="1229 1026 1491 1050">Docetaxel (Taxotere®)</p> <p data-bbox="1229 1121 1317 1145">Isotaxel</p> <p data-bbox="1229 1209 1395 1281"><i>Nab</i>-paclitaxel (Abraxane®)</p>	<p data-bbox="1554 882 1783 1098">Pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço</p>	<p data-bbox="1809 882 1977 914">SCHIFF et al. (1979);</p> <p data-bbox="1809 978 2056 1185">EISENHAUER &amp; VERMORKEN, (1998); HAYASHI et al. (2003); ISMAEL et al. (2008)</p>

#### 1.4 Planta estudada: *Casearia sylvestris* Swartz

*Casearia sylvestris* Swartz (**Figura 3**) (Sinônimos: *Samyda parviflora* L., *Casearia parviflora* L., *Anavinga samyda* Gaertn. F.) pertence, tradicionalmente, à família Flacourtiaceae, a qual é composta de 89 gêneros e 1300 espécies encontradas em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo, possuindo o gênero *Casearia* quase 180 espécies (LITTLE & WADSWORTH, 1964; TORRES & YAKAMOTO, 1986). Recentemente, abordagens moleculares aplicadas à sistemática filogenética de diversas famílias, inclusive Flacourtiaceae e Salicaceae, que culminaram no surgimento do *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), além de constatações ecológicas, químicas e morfológicas, resultaram na extinção da família Flacourtiaceae e na transferência da maioria dos seus gêneros para a família Salicaceae, entre eles o gênero *Casearia* (SOUZA & LORENZI, 2005).

Muito comum nas Américas, a espécie *C. sylvestris* ocorre desde Cuba, Antilhas e Porto Rico passando pelo México, Brasil, Bolívia e Peru até Argentina e Uruguai. No Brasil, é encontrada praticamente em todo o território desde o Amazonas, próximo ao rio Tapajós até o estado do Rio Grande do Sul (LITTLE & WADSWORTH, 1964; TORRES & YAKAMOTO 1986, HACK et al. 2005). No Brasil, *C. sylvestris* é conhecida como guaçatonga, uma palavra originária do tupi-guarani, o que sugere seu remoto uso pelas comunidades indígenas. Além de guaçatonga, outros nomes populares para a planta são erva-de-lagarto, língua-de-giú, cafezinho-do-mato, café-bravo, *corta-lengua*, *bugre herb* e *wild coffee* (HOEHNE, 1939; LITTLE & WADSWORTH, 1964; TORRES & YAKAMOTO 1986).





Folhas



Inflorescência



Frutos

Fonte: BLANCO (2008)

**Figura 3** – *Casearia sylvestris* Swartz.

#### 1.4.1 Propriedades Farmacológicas

Os índios da tribo Karajá têm o hábito de preparar uma maceração da casca de *C. sylvestris* para tratar diarreia; outras tribos brasileiras esmagam suas raízes para usá-las em ferimentos, contra a lepra tropical e como remédio antiofídico; já os índios Shipibo-Conibo do Peru utilizam uma decocção da casca para gripes e resfriados (HOEHNE, 1939). Certamente, a ação antimicrobiana contra fungos (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*) (CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; DA SILVA et al., 2008a) e bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*) (CHIAPPETA et al., 1983; MOSADDIK et al., 2004; DA SILVA et al., 2008a) explica o uso popular no tratamento de feridas, pequenas ulcerações de pele e diarreia. Nos últimos anos, a planta tem sido usada como um dos princípios ativos de cremes contra herpes e comercializada em formulações associadas a outras plantas para o preparo de chás e infusões com objetivos terapêuticos (CAMARGO et al., 1993; SIMÕES et al., 2001).

Extratos das folhas de *C. sylvestris* possuem propriedades antiulcerogênicas, o que legitima sua vasta aplicação contra dores gastrointestinais (HOEHNE, 1939). BASILE et al. (1990) e ESTEVES et al. (2005) mostraram que o extrato etanólico e o óleo essencial extraído das folhas de guaçatonga são capazes de diminuir significativamente o volume gástrico e a produção de ácido clorídrico de forma mais eficiente que misoprostol sem alterar o pH da secreção estomacal. A proteção da mucosa estomacal tem sido atribuída a compostos bioativos presentes nas folhas (terpenos, cumarinas, taninos e alguns óleos) (SERTIÉ et al., 2000), os quais tem mostrado atividade antioxidante e antiinflamatória (ABREU-GONZAGA et al., 2003; MENEZES et al., 2004; ESTEVES et al., 2005). De fato, inúmeras pesquisas têm descrito o potencial antiinflamatório de extratos preparados a partir das folhas de guaçatonga, baseadas quase sempre no uso popular de preparações simples e baratas (HOEHNE, 1939; RUPPELT et al., 1991; SASSIOTO et al., 2004).

O extrato aquoso das folhas mostra potencial inibitório contra atividades tóxicas, enzimáticas, hemorrágicas e anticoagulantes exibidas por uma variedade de venenos, principalmente contra aqueles das classes de PLA<sub>2</sub> I (*Phospholipase A<sub>2</sub>*) (Elapidae), II (Viperidae) e III (abelhas) (BORGES et al., 2000, 2001; DA SILVA et al., 2008b). Esse extrato é capaz de diminuir as lesões musculares esqueléticas ao prevenir a formação de edema no tecido conectivo do endomísio e ao diminuir o bloqueio muscular, achados que elevam os percentuais de proteção contra danos teciduais dependendo do tipo de veneno (CAVALCANTE et al., 2007).

Além de todo o potencial bioativo acima descrito, o extrato aquoso das folhas apresenta ações neuromodulatórias ao interferir na atividade de enzimas dos sistemas purinérgico e colinérgico e ao inibir a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase do sistema nervoso

central (DA SILVA et al., 2006), o extrato hidroalcoólico mostra efeitos antinociceptivos através da inibição na produção de mediadores inflamatórios ou por ativação do sistema opióide (MATTOS et al., 2007) e o extrato hexânico possui ação larvicida contra *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006).

#### 1.4.2 Terpenos - Diterpenos Clerodânicos

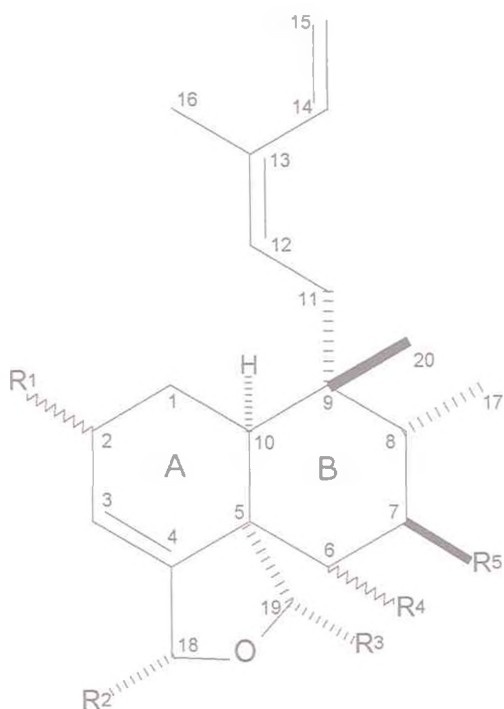
O grupo dos terpenos é o maior representante de compostos naturais oriundos de plantas, possuindo, pelo menos, 30.000 moléculas dos mais variados tipos estruturais (CONNOLLY & HILL, 1991). Essa enorme variedade estrutural de metabólitos terpênicos está relacionada, principalmente, à evolução de enzimas pertencentes à superfamília Terpeno Sintase, que inclui mais de uma centena de genes conhecidos até hoje. Os terpenos são formados por uma unidade básica de 5 carbonos chamada isopreno. Assim, os terpenos são classificados como monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>) e triterpenos (C<sub>30</sub>) (TRAPP & CROTEAU, 2001).

A maioria dos compostos isolados das folhas de *Casearia* sp. é representada por diterpenos clerodânicos tricíclicos oxigenados que exibem uma configuração *cis* entre os anéis A e B e um sistema diacetálico típico nas posições C-18 e C-19 (**Figura 4**). Vários diterpenos clerodânicos foram isolados de *C. sylvestris*: casearinas A-X (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; WANG et al., 2009a, SANTOS et al., 2010), casearina X dialdeído, caseargrevina F (SANTOS et al., 2010), 2β-metóxi-cleroda-3,13-dieno-18-carboxi-15,16-olide, 15ξ-metóxi-cleroda-3,12-dieno-18-carboxi-15,16-olide (WANG et al., 2009b), ácido hardvíquico e 15-hidroxi-3-clerodeno-2-ona (SANTOS et al., 2007), isolados das folhas; casearvestrinas A-C, das folhas e galhos (OBERLIES et al., 2002) e *rel*-19S-acetoxi-18R-butanoyloxy-18,19-epóxi-6S-hidroxi-2R-(2-metilbutanoiloxi)-5S,8R,9R,10S-cleroda-3,13(16),14-trieno, isolado das raízes (ESPÍNDOLA et al., 2004) (**Figuras 4 e 5**).

---

## Diterpenos

---



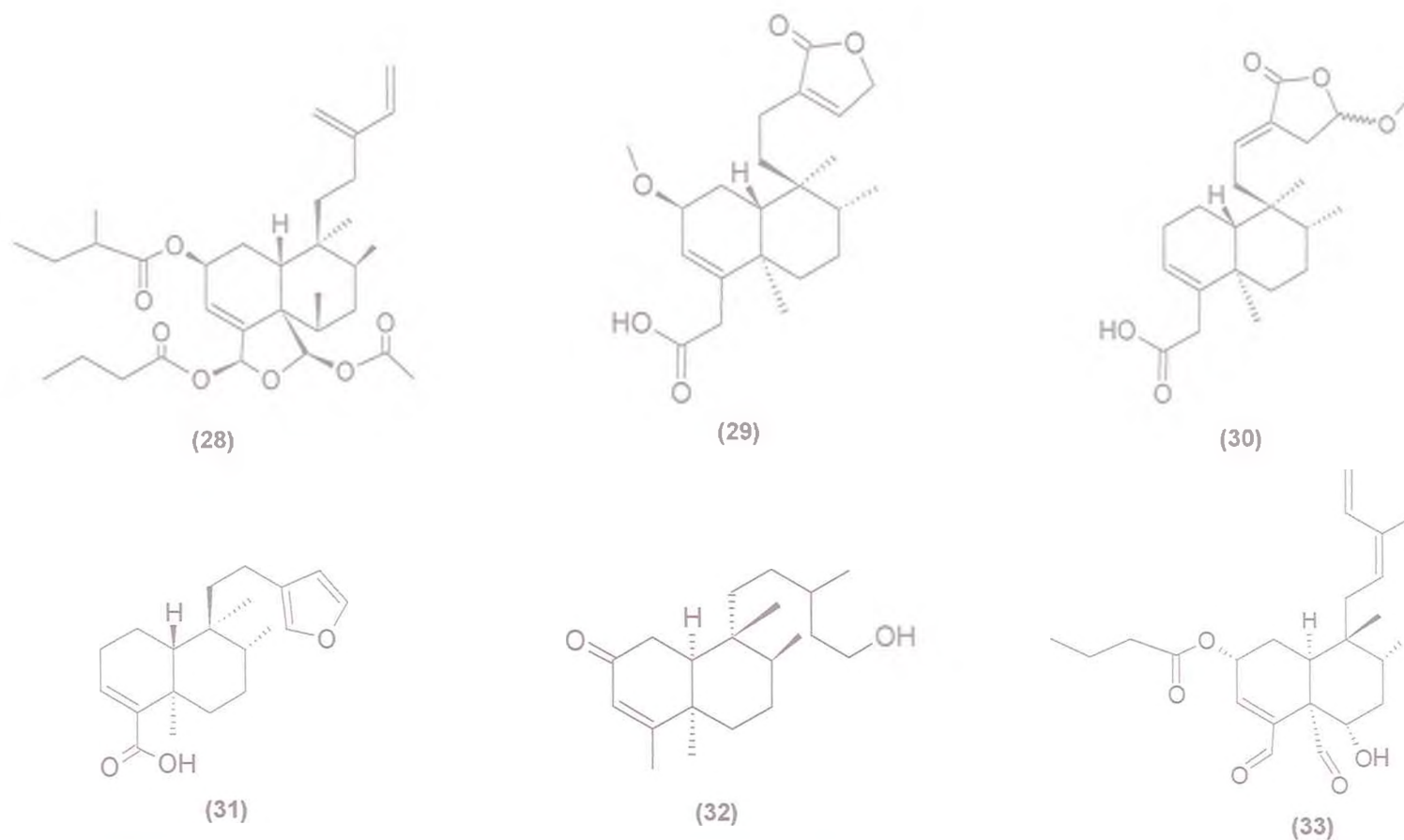
**Figure 4** - Substituintes R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup> das casearinas A-X, Caseagrevina F e casearvestrinas A-C (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; WANG et al., 2009a; SANTOS et al., 2010) e citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) em V-79 (células de pulmão de hamster chinês) das casearinas A-R (adaptado de MORITA et al., 1991).

---

Casearina A	(1)
Casearina B	(2)
Casearina C	(3)
Casearina D	(4)
Casearina E	(5)
Casearina F	(6)
Casearina G	(7)
Casearina H	(8)
Casearina I	(9)
Casearina J	(10)
Casearina K	(11)
Casearina L	(12)
Casearina M	(13)
Casearina N	(14)
Casearina O	(15)
Casearina P	(16)
Casearina Q	(17)
Casearina R	(18)
Casearina S	(19)
Casearina T	(20)
Casearina U	(21)
Casearina V	(22)
Casearina X	(23)
Casearvestrina A	(24)
Casearvestrina B	(25)
Casearvestrina C	(26)
Caseagrevina F	(27)

---

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	1.0
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	8.5
OH (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> CO <sub>2</sub>	0.77
OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	1.8
OH (α)	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> CO <sub>2</sub>	4.7
OH (α)	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	29
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	0.17
OH (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	0.37
OH (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	H	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	0.51
OCH <sub>3</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	1.1
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	0.52
OCH <sub>3</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	OH	1.6
OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	OH	1.8
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	5.9
OCH <sub>3</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	6.0
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	7.8
OH (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	4.3
= O	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	5.4
OCH <sub>3</sub> (α)	= O	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	—
OCH <sub>3</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (β)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	—
OCH <sub>3</sub> (α)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	—
OH (α)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	—
n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> (α)	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	H	—
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO <sub>2</sub> (β)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	H	—
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CO <sub>2</sub> (β)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	H	—
n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> CO <sub>2</sub> (β)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	H	—
n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> (α)	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH (α)	H	—



**Figure 5** – Outros diterpenos clerodânicos extraídos de diferentes partes de *Casearia sylvestris*: *rel*-19*S*-acetoxi-18*R*-butanoyloxy-18,19-epóxi-6*S*-hidroxi-2*R*-(2-metilbutanoiloxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno (**28**); 2β-metóxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olide (**29**); 15ξ-methoxy-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olide (**30**); ácido hardvíquico (**31**); 15-hidroxi-3-clerodeno-2-ona (**32**) e Casearina X dialdeído (**33**) (ESPÍNDOLA et al., 2004; SANTOS et al., 2007; WANG et al. 2009b; SANTOS et al., 2010).

### 1.5 Toxicidade de Plantas

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Esse consumo com finalidade curativa é mais difundido em áreas rurais, onde o acesso ao atendimento clínico-laboratorial é difícil e financeiramente mais dispendioso (HOLETZ et al., 2002), sendo as plantas, na maioria das vezes, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (JÚNIOR & PINTO, 2005), fato que favorece a manifestação de efeitos tóxicos, principalmente, devido a mecanismos químicos de proteção, além dos mecânicos (como espinhos, cornos e pêlos ou o desenvolvimento de revestimento) (CHEEKE, 1998). Geralmente, os mecanismos químicos de defesa são representados por substâncias tóxicas que se concentram nas partes da planta que mais contribuem para o desenvolvimento como folhas novas, ramos de florescência e sementes (RALPHS et al., 2000). As principais classes de constituintes químicos de plantas com atividade farmacológica que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são os ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MATOS, 1988), sendo os alcalóides, glicosídeos, lectinas e ácidos orgânicos as classes químicas mais importantes na toxicologia de vegetais (CHEEKE, 1998).

Para um reconhecimento preciso da toxicidade de plantas deve-se ter familiaridade com as plantas da região e o conhecimento das variações sazonais na concentração de substâncias tóxicas. Cada planta, assim como outras causas de doenças, produz quadros clínico-patológicos mais ou menos característicos e os achados podem comprovar a etiologia e auxiliar no diagnóstico diferencial. A cultura e o desconhecimento da população, além da quantidade ingerida pelo acidentado são fatores que dificultam o diagnóstico e o tratamento em casos de envenenamento por plantas (CHEEKE, 1998; TOKARNIA et al., 2002). No contexto da terapia antineoplásica, a determinação do potencial toxicológico e genotóxico de plantas ou de substâncias oriundas destas merece grande atenção devido ao risco de efeitos adversos que estão quase sempre relacionados a uma estreita janela terapêutica, à múltipla resistência farmacológica e às similaridades morfológicas e fisiológicas entre células normais e transformadas, o que torna muito difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento, principalmente, para pacientes no estágio avançado da doença, quando os efeitos adversos da quimioterapia podem superar os benefícios e aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (KAMB, 2005; SOUZA et al., 2007). Por isso, continua sendo imprescindível o estudo dos eventos celulares e moleculares envolvidos na progressão do câncer e na ação farmacológica dos agentes citotóxicos, sobretudo daqueles que afetam a integridade do material genético (RIBEIRO et al., 2003; COLLINS, 2004).

## 1.6 Genotoxicidade

Diariamente, o DNA das nossas células sofre mais de dez mil lesões, em parte, devido ao próprio metabolismo celular e/ou erros durante a replicação do material genético. Contudo, a exposição a agentes químicos, físicos e biológicos contribui para incrementar a carga mutagênica a qual os seres humanos estão expostos (SLUPPHAUG et al., 2003). O efeito genotóxico de um agente potencialmente mutagênico depende do seu alvo celular. Esses agentes mutagênicos podem induzir mudanças genômicas por interagir diretamente ou indiretamente com o DNA ou por interagir com proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; HOUTGRAAFF et al., 2006). Devido à variedade das lesões moleculares relevantes ao desenvolvimento do câncer e de defeitos genéticos transmissíveis, a análise de múltiplos efeitos genéticos é geralmente necessária no *screening* em genotoxicidade de substâncias. Inclusive plantas medicinais, tais como *Chrysobalanus icaco* (FERREIRA-MACHADO et al., 2004), *Aloe vera* (PAES-LEME et al., 2005) e *Copaifera langsdorffii* (CAVALCANTI et al., 2006) tem mostrado potencial genotóxico e mutagênico, descobertas que inspiram cuidados a cerca do uso descontrolado de produtos de origem vegetal. Desse modo, essas substâncias devem ser testadas em diferentes ensaios a fim de se obter informações suficientes sobre seu potencial genotóxico (RIBEIRO et al., 2003).

Um grande número de testes de curta-duração está disponível para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam: mutação gênica (teste de Ames), dano cromossômico (aberrações cromossômicas, micronúcleo) ou lesão no DNA (ensaio do cometa). A associação íntima desses indicadores biológicos com os mecanismos conhecidos de ativação de proto-oncogenes ou perda de função de genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (RIBEIRO et al., 2003; COLLINS, 2004). Embora a toxicidade genética não seja uma medida de carcinogenicidade, ela é frequentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade avaliam um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (TICE et al., 2000), havendo associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade tanto em roedores como no homem (SARTO et al., 1987; COLDITZ et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2009).

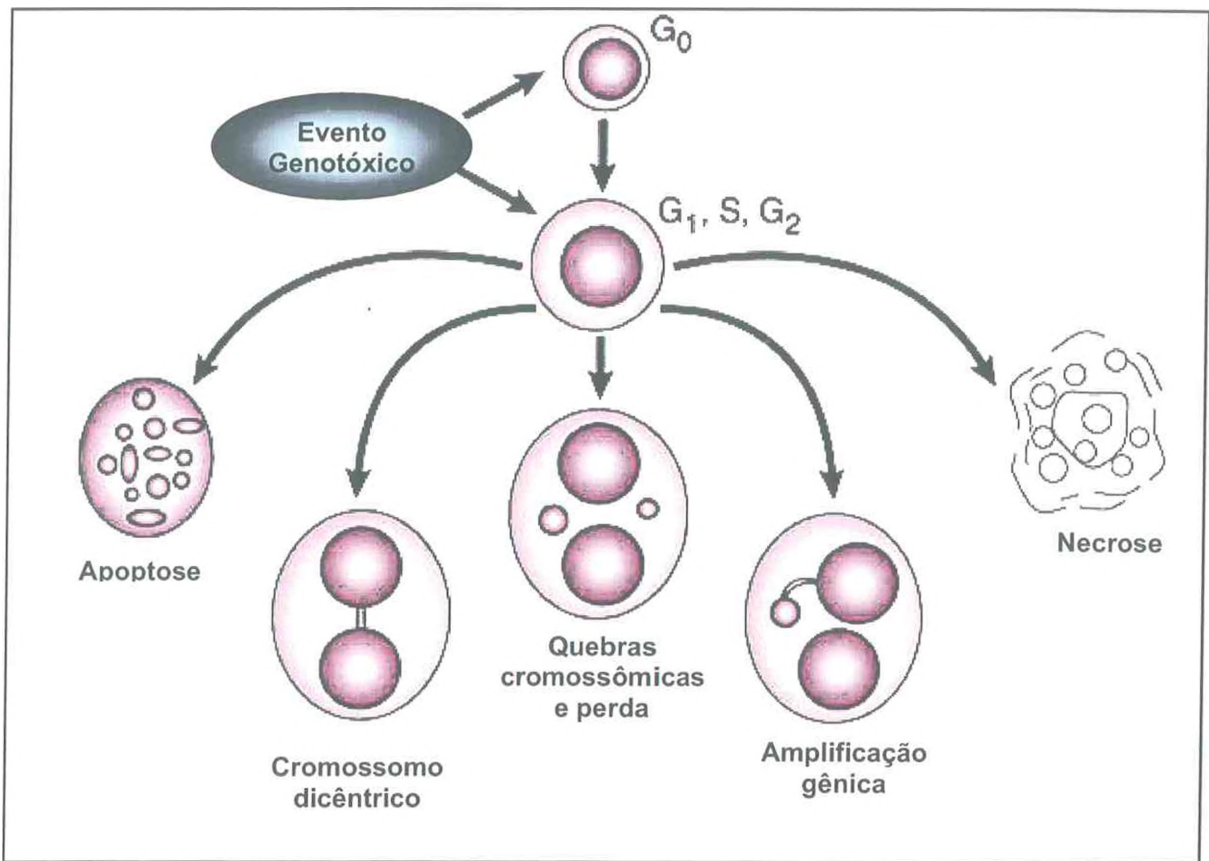
O Ensaio do Cometa, mais especificamente conhecido pela sigla inglesa SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*) tornou-se um dos principais métodos de estudo do dano às moléculas de ácido desoxirribonucléico, alcançando o *status* de teste padrão para avaliar a segurança de novos fármacos, genotoxicidade *in vitro* contra células normais e transformadas, humanas ou animais, ecotoxicologia, biomonitoramento populacional, 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 (HARTMANN & SPEIT, 1997; DIXON et al., 2002; COLLINS, 2004; CAVALCANTI et al., 2006), além de sua aplicação *in vivo* quando se deseja estudar o efeito genotóxico de uma dada substância em um órgão específico (SASAKI et al., 2000; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). O princípio do teste está baseado na capacidade do DNA sofrer migração em uma matriz de agarose durante uma eletroforese. A detecção de migrações alteradas de DNA depende de vários parâmetros como, por exemplo, a concentração da agarose no gel, do pH, da temperatura, da voltagem e amperagem e da duração da eletroforese (HARTMANN et al., 2003). A versão alcalina do cometa identifica quebras simples e duplas no DNA, sítios álcali-lábeis, sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas enquanto a versão neutra identifica quebras duplas. Estas lesões, a depender de sua natureza, podem ser corrigidas mediante expressão de vários genes envolvidos nos mais variados mecanismos de reparo do DNA (TICE et al., 2000).

Outro método utilizado na avaliação genotóxica de fármacos é o teste de Micronúcleos (MNs). Micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (SCHMID, 1975; RAMIREZ & SALDANHA, 2002). Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (SCHMID, 1975; RIBEIRO et al., 2003). As análises morfológicas e estruturais mostram os MNs possuem cromatina similar e com intensidade de cor semelhante ou mais fraca que o núcleo principal, borda evidente (sugerindo membrana nuclear), formato arredondado, localização intracitoplasmática e um diâmetro menor que 1/5 do núcleo principal (**Figura 6**) (TOLBERT et al., 1992).

A formação de micronúcleos é uma das maneiras que o organismo dispõe para se adaptar ao dano gerado por agentes exógenos ou endógenos e manter a célula viável (FENECH, 2007), por isso a contagem de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células) associada ao ensaio do cometa tem sido um instrumento útil no monitoramento de indivíduos expostos a agentes genotóxicos de natureza ocupacional ou ambiental (SARTO et al., 1987), uma vez que o estilo de vida é responsável pela exposição a agentes que produzem a maioria das neoplasias (DOLL & PETO, 1981; COLDITZ et al., 1996).



Fonte: FENECH (2007)

**Figura 6** – As várias possibilidades do bloqueio da divisão celular resultante da exposição a agentes genotóxicos e/ou citotóxicos.

# **OBJETIVOS**

---

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial antitumoral e toxicológico dos diterpenos clerodânicos Casearina B (Cas B), Casearina D (Cas D), Caseargrevina F (Cas F) e Casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas da planta *Casearia sylvestris*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* dos diterpenos clerodânicos Cas B, D, F e X e da FC contra células tumorais e normais usando os ensaios do MTT e Alamar Blue;
- Investigar o mecanismo de ação das moléculas usando células leucêmicas da linhagem HL-60 como modelo experimental e métodos *in vitro* para avaliação das alterações morfológicas, bioquímicas e celulares (incorporação de 5-bromo-2-desoxiuridina, coloração por May-Grünwald-Giemsa e citometria de fluxo);
- Avaliar a capacidade antitumoral da FC em camundongos transplantados com células do tumor Sarcoma 180;
- Determinar a genotoxicidade *in vitro* da Cas B, D, F e X e da FC em células mononucleares de sangue periférico humano usando o ensaio de Cometa;
- Averiguar a toxicidade *in vivo* da FC através do perfil hematológico e bioquímico, da análise histológica de órgãos-chave e do potencial genotóxico (teste do Cometa e formação de Micronúcleos).

# 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, DELTA Modelo 105Di®

Bomba à vácuo, EXIMPUMP®

Citocentrífuga, CT-2000 CIENTEC®

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®

Contador automático de células sanguíneas Coulter Counter T-530®

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Estantes de ventilação, ALESCO®

Fluxo laminar, VECO®

Incubadora de células, (CO<sub>2</sub> Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

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

Microondas, Panasonic®

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

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Micrótomo, Slee Mainz®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences®

##### Soluções, Reagentes e Fármacos

Ácido Acético

-

Vetec®

Ácido Clorídrico

-

Vetec®

Álcool Etilíco

-

Vetec®

Alcool Metílico	-	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®
Alamar Blue (Resazurina)	0.312 mg/mL	Sigma®
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®
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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Immunotech® Proquímios® Proquímios®
Diacetato de 2'7'-	-	Invitrogen®

diclorohidrofluoresceína			
Dimetilsulfóxido (DMSO)		-	Vetec®
Doxorrubicina		-	Sigma®
EDTA		-	Qeel®
Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução		Sigma® Dako®
Entellan	Meio para montagem rápida de lâminas para análise em microscopia óptico		Merck®
Ficoll		-	Sigma®
Fitohemaglutinina		-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L		Dinâmica®
Halotano (Fluothane)	100 mL		Zeneca®
Heparina		-	Vetec®
Hidróxido de Sódio (NaOH)		-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL		Boehringer®
Kits para análises bioquímicas	AST, ALT, albumina, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, glucose, amilase, colesterol total e triglicerídeos		Larbolab® Labtest®
Kit <i>Guava Nexin Assay</i>		-	Guava Technologies®



Kit <i>FAM Caspase Activity</i> <i>FLICA Apoptosis Detection</i>	-	Sigma®
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 PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0.600g Cloreto de Potássio = 0.030g Cloreto de Cálcio 2H <sub>2</sub> O = 0.020g Lactato de Sódio = 0.30g Água q. s. p. 100 mL	Laboratórios Biosintética®
Rodamina 123	-	Sigma®
Sulfato de Gentamicina	-	Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2.5M, EDTA 100mM Tris 10 mM, 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 - 7.5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino		Cultilab®
SSC 10X	Cloreto de sódio 1.5 M Citrato de sódio 0.15 M H <sub>2</sub> 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 2.14 g de NaHPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.276 g de NaHPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7.2)	Labsynth® Labsynth® Labsynth® -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1.5 M Tris 0.5 M (pH= 7.6) H <sub>2</sub> O	Labsynth® Proquímios®
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2.5 % 0.125 g de EDTA 450 mL de PBS	Cultilab® Proquímios®
Triton X -100		Isofar®
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído H <sub>2</sub> O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
5- Fluorouracil	2.5 mg/1 mL	Sigma®

### Modelos biológicos

- Camundongos albinos (*Mus musculus* Linnaeus)

Todos os animais utilizados nos estudos *in vivo* foram camundongos adultos machos albinos (*Mus musculus* Linnaeus) da linhagem Swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições padrões de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e luminosidade (12h de ciclo claro/escuro) e sob regime de ingestão *ad libitum* de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento. Todos os protocolos investigacionais utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (COPEA) da Universidade Federal do Ceará (Processo nº 032/2008, ANEXO A) e estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguindo padrões internacionais de uso de animais de laboratório (ANDRADE et al., 2002; EEC DIRECTIVE OF 1986, 86/609/EEC).

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

As linhagens celulares cedidas pela NCI-US foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, 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 CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h.

- Células polimorfonucleares de sangue periférico humano (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC)

A coleta do sangue periférico humano foi conduzida de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e realizada por profissionais capacitados da UNIFAC (Unidade de Farmacologia Clínica, Universidade Federal do Ceará) utilizando seringas de 10 mL estéreis e descartáveis. Voluntários adultos saudáveis foram escolhidos na faixa etária de 18 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumante ou etilista, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos (RIBEIRO et al., 2003).

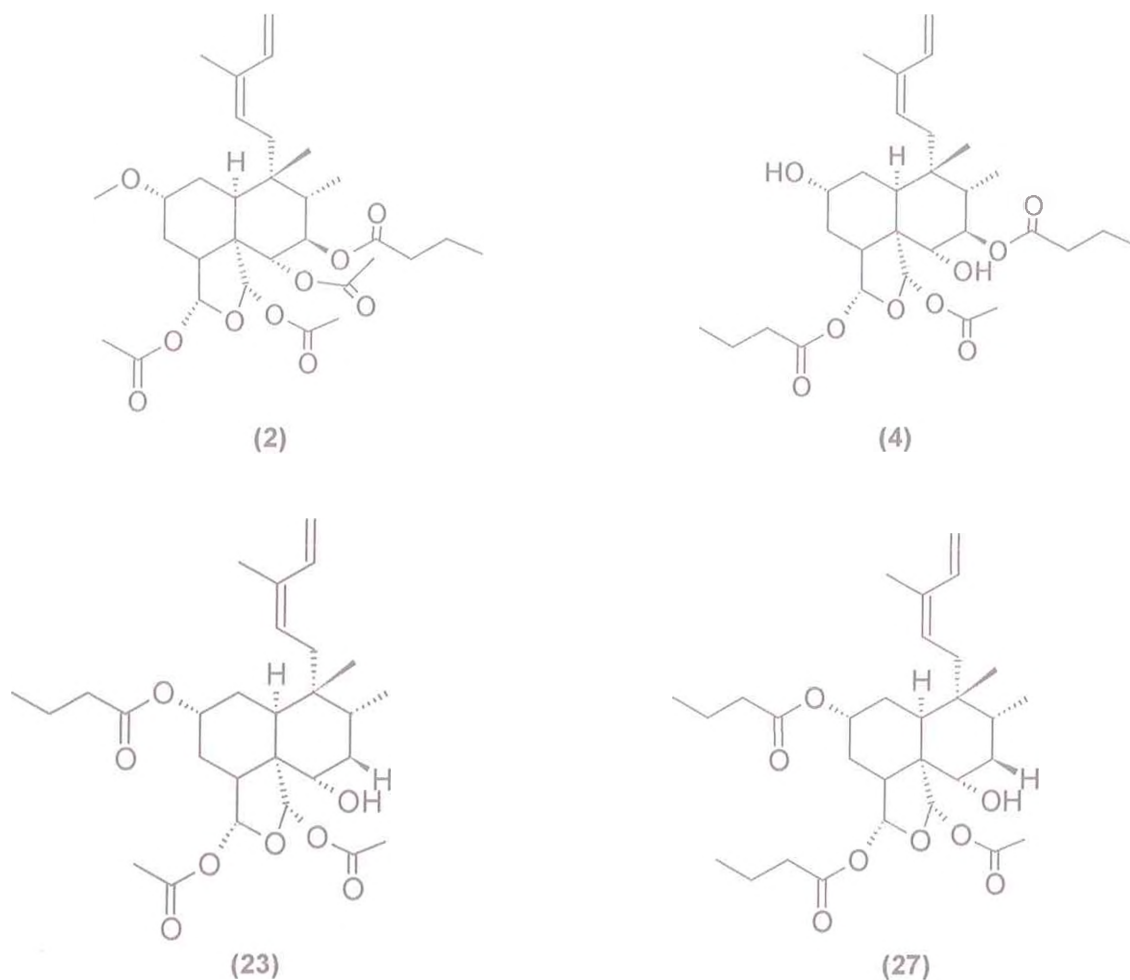
Rev-110450/12/10

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Extração da Fração rica em Casearinas e isolamento dos diterpenos clerodânicos Casearina B, Casearina D, Caseargrevina F e Casearina X

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

O isolamento e a determinação estrutural dos diterpenos clerodânicos foram realizados no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo). As folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (20 kg) foram extraídas com cerca de 200 L de etanol em extrator de aço inox (capacidade 300 L) com sistemas de circulação de solvente e de aquecimento, à 40 °C por cerca de 24 h. O extrato líquido foi concentrado sob pressão reduzida e, em seguida, seco em capela e dessecador com sílica gel sob vácuo, fornecendo 1.540 g de extrato seco. Parte deste extrato (473.6 g) foi fracionada através de uma extração em fase sólida (EFS) utilizando carvão ativo/sílica gel 60-200 $\mu$ m (1:1, m/m) como fase estacionária e os eluentes hexano/acetato de etila (95:05, v/v), acetato de etila e metanol, fornecendo 3 frações respectivamente. Análises por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  revelaram que apenas EFS2 (AcOEt, 124.1 g) apresentou os sinais característicos de casearinas (correspondendo à Fração rica em Casearinas, FC). Dezesesseis gramas da fração EFS2 foram submetidos a fracionamento por cromatografia em coluna em sílica gel 40-63  $\mu$ m num gradiente de hexano/acetato de etila/isopropanol 78:20.5:1.5 até 60:37,2:2.7, fornecendo 45 frações. Algumas frações obtidas pela cromatografia em coluna foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (C-18; modo isocrático com concentração de metanol variando de 67-75% dependendo da fração;  $\lambda = 235$  nm): frações CC8+9+10+11 (2.564 mg) forneceram a casearina X (1.123.5 mg); frações CC15+16+17+18+19 (2.656 mg) forneceram a casearina B (250.6 mg) e a caseargrewiina F (846.5 mg); fração CC31 (217.2 mg) forneceu a casearina D (83.5 mg) (**Figura 7**). As estruturas químicas das substâncias foram determinadas com base nos resultados dos experimentos de Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  unidimensionais e bidimensionais, Espectrometria no Infravermelho, Espectrometria no Ultravioleta e Espectrometria de Massas de Alta Resolução, além da comparação dos dados espectrométricos com a literatura (MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2010).



**Figura 7** – Estrutura dos diterpenos clerodânicos isolados das folhas de *Casearia sylvestris*: Casearina B (2), Casearina D (4), Casearina X (23) e Caseargrevina F (27).

### 3.2.2 Determinação da Citotoxicidade *in vitro* contra Linhagens Tumerais – Ensaio do MTT

Cinco substâncias, sendo quatro diterpenos clerodânicos, Cas B, D, F e X e uma fração rica em casearinas (FC), foram avaliadas quanto a sua capacidade citotóxica frente a 13 linhagens de células tumorais mantidas em cultura (Tabela 2) através do método de MTT (MOSMANN, 1983), o qual provou ser uma forma rápida, sensível e barata de analisar 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 (como a succinil desidrogenase) presentes somente nas células metabolicamente ativas (BERRIDGE et al., 1996).

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 (0.04 - 25 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço)

usando sistema automatizado de plaqueamento (*High Throughput Screening*). O quimioterápico doxorubicina (Dox) foi usado como controle positivo (0.01 - 8.6  $\mu$ M). Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e precipitado foi ressuscitado em 150  $\mu$ L de DMSO e agitado por 10 min até completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm.

**Tabela 2** – Linhagens celulares tumorais utilizadas na avaliação da citotoxicidade *in vitro* através do ensaio de MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda humana	0.3 x 10 <sup>6</sup>
HL-60	Leucemia promielocítica humana	0.3 x 10 <sup>6</sup>
K-562	Leucemia mielocítica crônica humana	0.3 x 10 <sup>6</sup>
CEM	Leucemia linfocítica humana	0.5 x 10 <sup>6</sup>
Hs578-T	Carcinoma de mama humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
MDA/MB-231	Carcinoma de mama humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
MX-1	Carcinoma de mama humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
PC-3	Carcinoma de próstata humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
DU-145	Carcinoma de próstata humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	0.7 x 10 <sup>5</sup>
SF-295	Glioblastoma humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
MDA/MB-435	Melanoma humano	0.1 x 10 <sup>6</sup>
B-16/F10	Melanoma murino	0.6 x 10 <sup>5</sup>

#### Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluição seriada e em duplicata. Os valores de CI<sub>50</sub> (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 *Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software*).

### **3.3. Estudos do Mecanismo de Ação *in vitro***

Os estudos de mecanismo de ação dos quatro diterpenos clerodânicos (Cas B, Cas D, Cas F e Cas X) e da FC foram realizados usando a linhagem HL-60 como modelo experimental (MILITÃO et al., 2006; COSTA et al., 2008). As concentrações utilizadas das substâncias testes foram estimadas a partir dos valores de  $CI_{50}$  encontrados pelo método do MTT para esta mesma linhagem celular para o período de 24 h de exposição. Em seguida, células HL-60, na concentração de  $0.3 \times 10^6$  células/mL, foram incubadas por um tempo determinado (dependendo da metodologia empregada) com Cas B (1 e 2  $\mu$ M), Cas D (2 e 4  $\mu$ M), Cas F (0.5 e 1  $\mu$ M) e Cas X (0.7 e 1.5  $\mu$ M). Para a FC (0.4 e 0.8  $\mu$ g/mL) foi estabelecido o tempo de 24 h de incubação para todos os experimentos envolvidos nos estudos de mecanismo de ação. O quimioterápico Dox (0.6  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %).

#### **3.3.1 Análise morfológica – Coloração por May-Grünwald-Giemsa**

A coloração por May-Grunwald-Giemsa consiste é uma mistura do tipo Romanovsky muito usada para coloração de esfregaços do sangue e medula óssea. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear bem como alterações no citoplasma.

Após o término de incubação de 6, 12 e 24h as lâminas foram preparadas com 50 $\mu$ L da suspensão de células em citocentrífuga e fixadas com álcool metílico 100 % por 30 s. Em seguida, as lâminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 s, e em seguida com Giemsa por 10 s.

#### Análise dos dados

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

#### **3.3.2 Avaliação da inibição da síntese de DNA através da incorporação de 5-bromo-2-desoxiuridina**

A 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga à timidina que é incorporada ao DNA das células em proliferação. A detecção do BrdU é realizada por técnicas de imunocitoquímica, onde são usados anticorpos monoclonais e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB), que vai conferir uma coloração marrom ao núcleo das células que incorporaram a BrdU (RIBEIRO et al., 2003).

Três horas antes do término do período de incubação de 24 h, foram adicionadas 20 µL na concentração de 10 µM de BrdU na cultura de células. Lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem, elas foram fixadas em metanol: ácido acético (7:1.5) por 5 min, lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70°C (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 *overnight* em câmara úmida. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 min e com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 min. Para efeito de revelação, foi adicionado a DAB. Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utilizou-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 incorporaram o BrdU). Os dados foram expressos como da média ± erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes (n = 2). Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de (P < 0.05), usando o programa *GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA)*.

#### **3.3.3 Citometria de Fluxo**

Todas as análises foram realizadas no citômetro *Guava EasyCyte Mine® (Guava Express Plus software)*. Cinco mil eventos foram contabilizados em cada experimento e os debris celulares foram omitidos das análises.

A citometria de fluxo (*EasyCyte, Guava Technologies®*) é capaz de comparar populações de células quanto às características de tamanho e de granulosidade (relativo a organelas, vacúolos etc) usando um laser de argônio (488nm). A partir desta ferramenta, pode-se delimitar a região (através de um *gate*) que compreende a população de células normais realizando a contagem da população de interesse.

##### 3.3.3.1 Integridade de Membrana

A integridade de membrana foi determinada utilizando iodeto de propídeo (*Propidium Iodide - PI*) na concentração de 50 µg/mL após 6, 12 e 24 h de incubação. De cada poço, 100 µL da suspensão de células foram incubados com PI diluído em tampão salina-fosfato (*Phosphate-Buffered Saline - PBS*) por 5 min. A fluorescência foi então medida para permitir a observação de mudanças na morfologia, granulosidade e integridade de membrana (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).



### 3.3.3.2 Ciclo Celular e Fragmentação de DNA

Esse método consiste na capacidade do PI se ligar ao DNA das células cuja membrana plasmática foi primeiramente permeabilizada por um detergente (triton X-100) para permitir a entrada do corante no núcleo. Durante o período de crescimento celular (fase  $G_1$ ) uma célula diplóide apresenta um conteúdo  $2n$  no seu DNA nuclear. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ( $2 \rightarrow 4n$ ) e na fase seguinte (fase  $G_2$ ) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível  $4n$ . Em seguida ocorre a mitose (fase M) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo  $2n$  de DNA. As células que não se encontram em divisão celular ( $G_0$ ) apresentam um conteúdo  $2n$  de DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam (FISCHER et al., 2004).

Ao final de 6, 12 e 24 h de incubação, retirou-se uma alíquota de 40  $\mu$ L da suspensão de células, a qual foi adicionada a 80  $\mu$ L de uma solução de lise (1:3) contendo PI 50  $\mu$ g/mL, 0,1 % de citrato de sódio e 0.1 % de triton X-100. Após 30 min de incubação protegido de luminosidade, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo no filtro vermelho, onde foram obtidos histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular ( $G_0$  /  $G_1$ , S e  $G_2$ /M) e a quantidade de células com DNA fragmentado (COSTA et al., 2008). Os dados foram posteriormente analisados com o programa *ModFit LT 3.1 software* (Verity software house).

### 3.3.3.3 Potencial Transmembrânico da Mitocôndria

Como destacado anteriormente, a mitocôndria está envolvida em diversas vias apoptóticas intrínsecas. A membrana externa da mitocôndria se rompe, formando poros que liberam citocromo c, o qual contribui para o desdobramento de rotas apoptóticas. Através destes poros forma-se um efluxo de íons  $H^+$ , induzindo uma alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (CURY-BOAVENTURA et al., 2004).

A despolarização mitocondrial foi avaliada através da incorporação de Rodamina 123, um corante fluorescente, sem efeitos citotóxicos ou citotásticos, permeável às membranas fosfolipídicas e catiônico, sendo ativamente seqüestrado pela mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina ligada às cargas positivas internas enquanto que as mitocôndrias das células apoptóticas terão menos afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (CURY-BOAVENTURA et al., 2004).

As células tratadas por 6, 12 e 24 h foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de rodamina 123 (1 µg/mL) por 15 min protegido da luz. Após essa incubação, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em PBS e incubado por 30 min antes da análise no citômetro (MILITÃO et al., 2006).

#### 3.3.3.4 Caspases-3, -7, -8 e -9

A ativação das caspases-3, -7, -8 e -9 possui papel fundamental no mecanismo de morte celular, sendo responsável pela clivagem de vários componentes relacionados ao reparo e à replicação do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspases permite avaliar os mecanismos de indução de morte (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

A determinação das caspases iniciadoras -8/-9 e efetoras ativadas -3/-7 foi realizada com o *FAM Caspase Activity FLICA Apoptosis Detection Kit*. A detecção se dá pela alta fluorescência verde emitida com a ligação covalente do inibidor de caspases (*Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases*, FLICA®) que atravessa facilmente a membrana plasmática. As células em apoptose inicial serão marcadas exclusivamente pelo FLICA. A contra coloração para detecção de células em apoptose tardia e necrose foi realizada com PI, o qual é bastante hidrofílico e só é capaz de se ligar ao DNA das células que tiverem danos na membrana plasmática emitindo, então, alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser de argônio (488nm).

Às células tratadas ou não tratadas durante 24 h com as substâncias testes foram acrescentados 10µL de FLICA 10X. Em seguida, elas foram incubadas por 1 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, homogeneizando as amostras a cada 20 minutos. Depois da incubação, 80 µL de tampão de lavagem foram adicionados às células, as quais foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. O precipitado foi ressuspensionado em uma solução de trabalho (PI 1:200 em tampão de lavagem 1x) antes da análise em citômetro de fluxo.

#### 3.3.3.5 Externalização de Fosfatidilserina – Ensaio de Anexina V

A externalização do fosfolípido de membrana, fosfatidilserina (PS) é, frequentemente, um dos primeiros eventos a ocorrer quando a célula entra em apoptose (VERMES et al., 1995).

A externalização de PS foi analisada por citometria de fluxo após exposição à Cas F e Cas X através da marcação de fosfatidilserina com a anexina V depois de 6, 12 e 24 h de tratamento (VERMES et al., 1995). Para tanto, foi utilizado o kit Guava Nexin® Reagent. Um volume de 100 µL de células de cada poço foi adicionado aos 100 µL do reagente de trabalho. Este reagente é composto por anexina V conjugada com ficoeritrina e em associação com 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD). Em seguida, as células foram levemente

agitadas e incubadas por 20 min em temperatura ambiente (25 °C) e protegido da luz. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela (583 nm) e o 7-AAD na fluorescência vermelha (680 nm). A percentagem de células viáveis, apoptóticas inicial e tardia e necróticas foi calculada.

#### 3.3.3.6 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio intracelulares foram monitoradas utilizando o diacetato de 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF-DA), que é convertido em um produto altamente fluorescente denominado de diclorofluoresceína na presença de espécies reativas de oxigênio intracelulares (LEBEL et al., 1992).

Trinta minutos antes de completar o período de incubação de 1 e 3 h com Cas B, D, F e X e com a FC, as células foram incubadas com 20 µM de H<sub>2</sub>-DCF-DA e mantidas a 37 °C por 30 min no escuro. Após esse período de incubação as células foram centrifugadas duas vezes, lavadas e ressuspensas em tampão PBS e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. Os resultados foram comparados ao controle negativo (grupo não-tratado). β-lapachona (2 µM) foi utilizada como controle positivo (MARINHO-FILHO et al., 2010).

#### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Possíveis diferenças significativas foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de *Student Newman-Keuls* (P < 0.05), usando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

### **3.4. Estudo da Capacidade Antiproliferativa em Células de Sarcoma 180**

O Sarcoma 180 (S-180) foi inicialmente identificado no *Crocker Laboratory (Columbia University, New York)* em 1914. É um tumor de natureza sólida e transplantável que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa e manteve-se sem alterações até os dias atuais. Em 1951, após inoculação intraperitoneal de fluido leitoso de S-180 sólido em camundongos, desenvolveu-se a forma ascítica do tumor nos animais (SCHABEL et al., 1977).

### 3.4.1 Determinação da Citotoxicidade em Cultura Primária do Tumor Sarcoma 180 – Ensaio do Alamar Blue

O Alamar Blue® é um teste utilizado desde a década de 1950 para detectar a contaminação de fluidos biológicos devido a sua grande sensibilidade. Recentemente identificado como resazurina, é um bioindicador fluorescente/colorimétrico, com sua forma oxidada apresentando uma coloração azul (não fluorescente/célula não viável) e sua forma reduzida, uma coloração rósea (fluorescente/célula viável) (O'BRIEN et al., 2000). Assim como o MTT, o Alamar Blue® sofre redução metabólica nas células vivas e pode ser utilizado para quantificar a viabilidade e a proliferação celular.

Com o intuito de prognosticar a atividade dos diterpenos clerodânicos e da FC em modelo de câncer *in vivo*, coletou-se, sob condições de assepsia, uma suspensão de células do tumor S-180 da cavidade peritoneal de um camundongo mantido em condições padrões após 7-10 dias de manutenção. A suspensão foi centrifugada a 500 rpm por 5 min para obtenção de um pellet, o qual foi lavado três vezes com meio RPMI estéril. A concentração de células foi ajustada para  $0.5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. Logo após o plaqueamento das células em placas de 96 poços, as substâncias testes foram adicionadas (0.04 – 25 µg/mL) e as placas foram transferidas para uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. O quimioterápico Dox (0.01 – 8.6 µM) foi utilizado como controle positivo. Seis horas antes de completar o período de incubação, 10 µL da solução estoque (0.312 mg/mL) de Alamar Blue® foram adicionados em cada poço. Após 72 h de incubação, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro de placa nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado). Para o cálculo da inibição da proliferação celular (PC), utilizou-se a seguinte fórmula:

$$PC (\%) = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

Onde:

$A_{LW}$  e  $A_{HW}$  são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O  $R_0$  foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$ . Onde,  $AO_{LW}$  e  $AO_{HW}$  são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente (COSTA et al., 2008, com algumas adaptações).

#### Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluição seriada e em duplicata. Os valores de  $CI_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

### 3.4.2 Avaliação da Atividade Antitumoral em Camundongos transplantados com Sarcoma 180

Camundongos machos adultos saudáveis foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g (P > 0.05). O tumor S-180 foi utilizado com 10 dias de implantação na cavidade peritoneal do animal. O animal doador ou da manutenção foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, retirou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparado uma suspensão de células com 5 mL de Ringer lactato, 200 µL de gentamicina (5 mg/mL) e 500 µL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas  $2 \times 10^6$  células / 0.5 mL na região axilar esquerda dos camundongos (PEREIRA & CHAVES, 1983; MAGALHÃES et al., 2010). Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo o veículo de diluição (DMSO 4 % em água destilada) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia). Para a FC, foram estabelecidas as doses de 10 e 25 mg/kg/dia, ambas administradas via intraperitoneal (i.p.) e as doses de 25 e 50 mg/kg/dia aplicada via oral por gavagem, com seu respectivo grupo controle negativo (DMSO 4 %).

Os animais foram pesados no início e no final do experimento e observados quanto ao aparecimento de qualquer sinal de toxicidade, como diarreia, ereção de pêlos, letargia e convulsões. No 8º dia, 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:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle;

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

#### 3.4.2.1 Observações Hematológicas e Histológicas

No final do tratamento e antes do sacrifício, os animais tratados com a FC foram anestesiados com halotano e o sangue foi coletado via plexo retrorbital (WAYNFORTH, 1980) com pipetas heparinizadas e tubos estéreis para a contabilização de leucócitos totais e diferenciados usando um contador automático de células sanguíneas.

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 tumores foram desidratados com álcool, clarificados com xilol, embebidos em parafina e secções de 3-5 µm de espessura foram preparadas em

lâminas. Após completa reidratação, as lâminas foram lavadas com água destilada, coradas com Hematoxilina/Eosina (H/E) e examinadas em microscópio óptico (400x).

#### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de *Student Newman-Keuls* ( $P < 0.05$ ), utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*). As lâminas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle negativo (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito por microfotografias.

#### 3.4.2.2 Análise de Sobrevivência

Camundongos machos adultos sadios foram divididos aleatoriamente em 7 grupos ( $n = 10$  para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 27 g ( $P > 0.05$ ). Células do tumor S-180 foram inoculadas nos animais como descrito anteriormente. As doses estabelecidas para a análise de sobrevivência foram as mesmas administradas no tratamento antitumoral: 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 25 e 50 mg/kg/dia oral por gavagem da FC. O controle negativo foi representado pelo tratamento i.p. e oral dos animais com DMSO 4 %. Os animais foram observados diariamente para a anotação de morte.

#### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como a média de dias de sobrevivência em um gráfico de Kaplan-Meyer. Para a comparação entre as curvas de sobrevida, utilizou-se o teste de *Log-rank* (chi-quadrado) ( $P < 0.05$ ), utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

### **3.5 Caracterização Toxicológica da Fração rica em Caseínas**

No geral, o principal objetivo dos estudos de toxicidade é identificar a presença do composto responsável pelos danos, as alterações específicas relacionadas a ele e correlacioná-las com estudos histopatológicos, hematológicos e com o perfil bioquímico sérico (CULLEN & MILLER, 2006; RAMAIAH, 2007).

#### **3.5.1 Determinação da Citotoxicidade *in vitro* em Cultura Primária de Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano – Ensaio do Alamar Blue**

Para avaliar a seletividade das substâncias entre células tumorais e normais, utilizou-se o método do Alamar Blue e células mononucleares de sangue periférico humano, que inclui linfócitos e monócitos, como modelo experimental (COSTA et al., 2008).

PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de 20 mL de sangue periférico acrescida de 5 mL de PBS estéril. Essa mistura foi adicionada a um tubo Falcon com 2 mL de Ficoll e submetida a centrifugação (2000 rpm por 30 min). Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro chamada de nuvem de linfócitos foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo. Posteriormente, completou-se com PBS até o volume de 11 mL e centrifugou-se o tubo a 1000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em 2 mL de PBS. As células foram ressuspensionadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina/estreptomicina para uma concentração final de final  $3 \times 10^5$  células/mL. Fitohemaglutinina (4 %) foi adicionada para induzir a proliferação celular. Após 24 h de incubação das células, as substâncias (Cas B, D, F, X e FC) foram adicionadas (0.04 - 25 µg/mL) e as placas foram transferidas para uma estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade. O quimioterápico Dox (0.01 - 8.6 µM) foi utilizado como controle positivo. Vinte e quatro horas antes de completar o período de incubação de 72 h, 10 µL da solução estoque (0.312 mg/mL) de Alamar Blue® foram adicionados em cada poço (COSTA et al., 2008). Para a determinação dos valores de CI<sub>50</sub> os valores foram analisados como anteriormente.

#### Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluição seriada e em duplicata. Os valores de CI<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

### **3.5.2 Avaliação da Genotoxicidade *in vitro* contra Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano – Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa foi realizado objetivando analisar o potencial de danos ao DNA da Cas B, Cas D, Cas F e Cas X em PBMC. Os experimentos foram feitos de acordo com SINGH et al. (1988), com pequenas modificações (HARTMANN & SPEIT, 1997; COLLINS, 2004). Para tanto, PBMC foram isolados e incubados (como descrito acima) por 24 h. Após esse período, acrescentou-se 0.5 e 1.0 µM da Cas B, Cas D, Cas F e Cas X e 0.4 e 0.8 µg/mL da FC à placa de vinte e quatro poços a qual foi, em seguida, transferida para estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade.

Após a incubação de 24 h, retirou-se uma alíquota de 20 µL de células, a qual foi adicionada em 110 µL de agarose 0.5 % de baixo ponto de fusão para preparo das lâminas (3 lâminas por amostra). As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose 1.5 % de ponto de fusão normal a 60 °C e mantidas à temperatura ambiente por 24 h até a

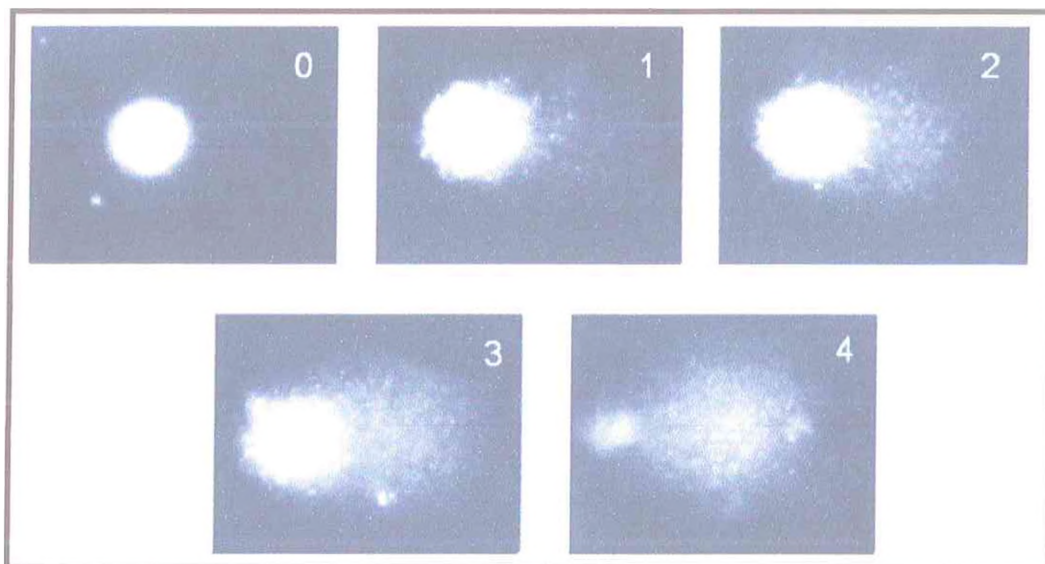
solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão, a qual foi preparada previamente. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm) para uniformizar a distribuição das células e mantidas a 4 °C para solidificação da agarose.

Após solidificação da agarose, a lamínula foi gentilmente removida e a lâmina mergulhada em solução de lise a 4 °C e 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 álcali-lábeis (RIBEIRO et al., 2003). 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 %.

Para análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (**Figura 8**). 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

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).





Fonte: Collins (2004)

**Figura 8** – Representação dos tipos de cometa, sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA: 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 %)

#### Análise dos dados

Foram contados 100 cometas por lâmina (n = 4) para a quantificação do índice de dano ao DNA. Os resultados foram expressos como 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), utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

#### **3.5.3 Determinação da Toxicidade Aguda**

A toxicidade aguda foi realizada em camundongos machos adultos com 25-30 g e 7-8 semanas de idade. As soluções da FC foram preparadas imediatamente antes da administração intraperitoneal (25, 50, 75 e 100 mg/kg) e oral por gavagem (50, 200, 300 e 400 mg/kg). As vias i.p. e oral foram escolhidas como uma forma de avaliar a interferência de fatores como absorção, pH estomacal e intestinal, atividade enzimática do trato digestivo e metabolismo de primeira passagem (KARALLIEDDE et al., 2003). Para cada dose, sete animais foram administrados e observados durante 14 dias para anotação de mudanças comportamentais, sintomas de envenenamento e morte (HODGE & STERNER, 1944).

### Análises dos dados

Os valores de dose letal (DL<sub>50</sub>) com seus respectivos intervalos de confiança foram obtidos usando o método de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1979).

#### **3.5.4 Determinação da Toxicidade Subcrônica**

Camundongos albinos machos adultos saudáveis foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 25 e 29 g (P > 0.05). Para a FC foram estabelecidas as doses de 5 e 10 mg/kg/dia, ambas administradas via i.p. e as doses de 10 e 20 mg/kg/dia aplicada via oral por gavagem, com seus respectivos grupos de controle negativo (DMSO 4 % i.p. e oral). O tratamento foi realizado durante 30 dias consecutivos, os animais foram pesados semanalmente e observados diariamente quanto ao aparecimento de quaisquer sinais de toxicidade, como diarreia, erexão de pêlos, letargia e convulsões. No 31º dia, os animais foram submetidos a diferentes estudos para avaliar o potencial toxicológico da FC como descrito a seguir.

##### 3.5.4.1 Análise do Perfil Bioquímico e Hematológico

Antes do sacrifício, os animais tratados com a FC foram submetidos a um jejum de 8 h antes da coleta de sangue via plexo retrorbital (WAYNFORTH, 1980). Os camundongos foram anestesiados com halotano e o sangue foi coletado com pipetas heparinizadas e tubos estéreis.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos séricos o soro foi obtido por centrifugação a 2000 rpm por 10 min, o qual foi submetido a técnicas padronizadas de kits comerciais baseados em métodos cinéticos, enzimáticos e colorimétricos através de espectrofotometria segundo as orientações do fabricante (Labtest® ou Larbolab®). O soro coletado foi utilizado para a análise das funções hepática [albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, uréia nitrogenada sanguínea (*Blood Urea Nitrogen* - BUN)], renal (creatinina) e pancreática (amilase, glicose) e dos níveis sanguíneos de colesterol total e triglicérides.

Para a avaliação hematológica foram contabilizados as hemácias, plaquetas, leucócitos totais e diferenciados, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a variação da distribuição do tamanho eritrocitário (*Red cell Distribution Width* – RDW) usando um contador automático de células sanguíneas.

##### 3.5.4.2 Determinação do Potencial Genotóxico *in vivo* – Ensaio do Cometa

Um total de 200 µL de sangue periférico de cada animal foi retirado e acrescentou-se Ficoll para permitir o isolamento de PBMC. Depois de isoladas, 20 µL de células

mononucleares foram transferidas para tubos eppendorf contendo 110  $\mu$ L de agarose 0.5 % de baixo ponto de fusão para preparo das lâminas (3 lâminas por amostra). Os passos seguintes foram seguidos como descrito anteriormente.

#### 3.5.4.3 Determinação de Danos Cromossômicos – Teste do Micronúcleo

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 h após o término do tratamento, imediatamente após a coleta de sangue. Os fêmures foram retirados, limpados e as epífises proximais foram seccionadas. A medula óssea foi retirada fazendo uso de seringas de 5 mL previamente preenchida com 0.5 mL de soro fetal bovino. Posteriormente, a agulha foi firmemente inserida na abertura do fêmur e o soro fetal bovino foi injetado de modo a deslocar a medula para dentro de um tubo Falcon contendo 3 mL de soro fetal bovino. Após a obtenção do material medular, este foi centrifugado (1000 rpm por 5 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado, homogeneizado. Uma gota da suspensão de células foi transferida para uma lâmina limpa e seca, sendo, em seguida, realizado o esfregaço. Foram preparadas duas lâminas por cada animal. Vinte e quatro horas após a confecção das lâminas, o material foi fixado e corado pelo método de Leishman. As lâminas foram montadas com entellan (SCHMID, 1975).

Toda a análise foi realizada em teste cego, utilizando microscópio óptico binocular, com objetivas de 20X e 40X. Foram considerados MNs as estruturas tipicamente arredondadas, com diâmetro de 1/5 a 1/20 do diâmetro dos eritrócitos jovens identificados pela coloração azulada (SCHMID, 1975; HEDDLE et al., 1983). Um total de 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) foi quantificado por lâmina (duas lâminas/animal) (HEDDLE et al., 1983).

#### 3.5.4.4 Observações Histopatológicas

Imediatamente após a retirada dos fêmures, foi realizada a dissecação dos rins, baço, fígado, coração, pulmões e estômago para avaliação do peso relativo. Todos esses órgãos foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica e microscópica como descrito anteriormente.

#### Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Possíveis diferenças significativas entre os grupos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) seguida de *Student Newman-Keuls* ( $P < 0.05$ ), utilizando o programa *Prism* versão 3.0 (*GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA*).

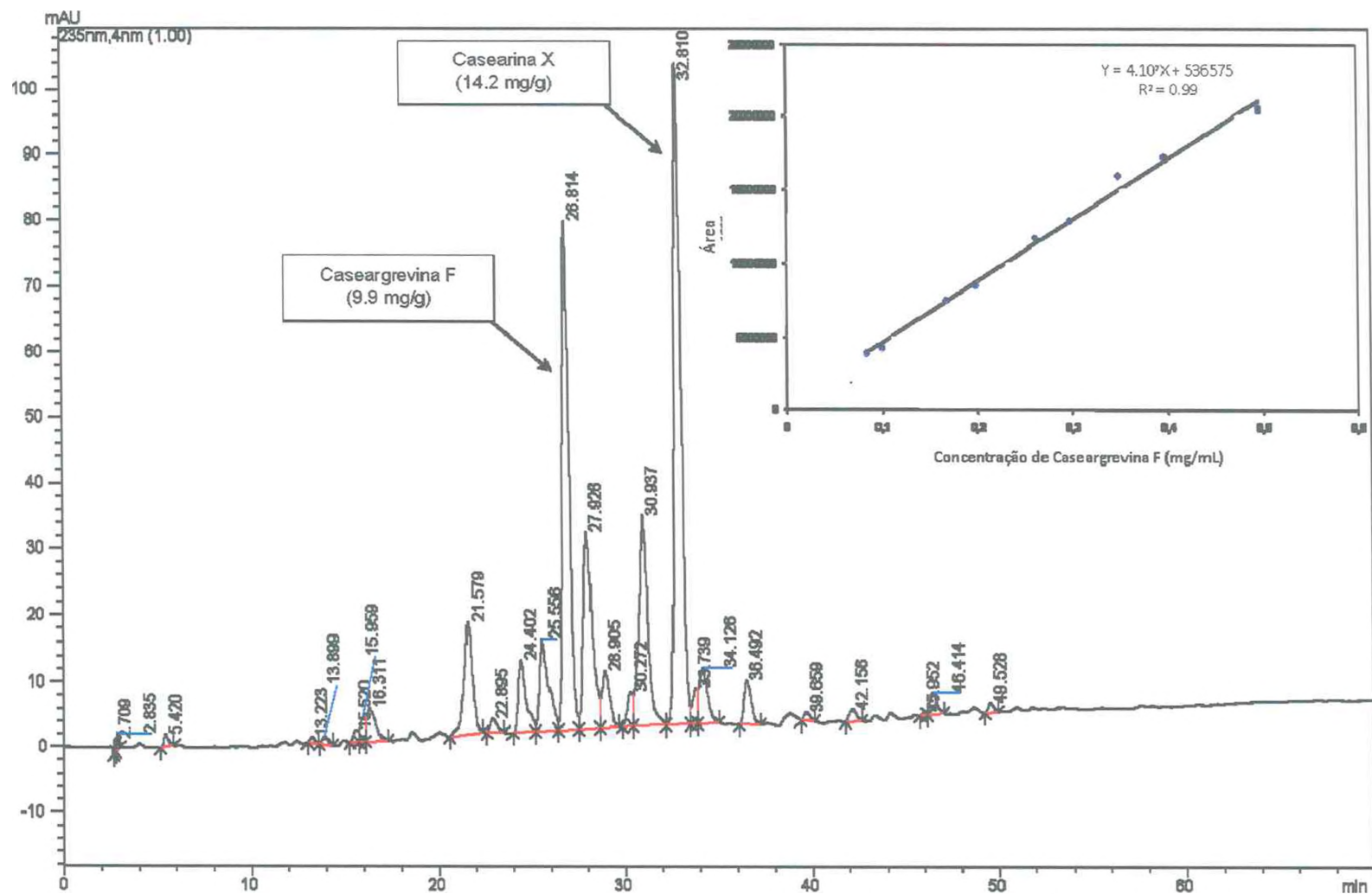
# RESULTADOS

---

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 Identificação das Casearinas na Fração rica em Casearinas

A quantificação do teor de clerodanos diterpênicos, baseada em uma curva de calibração para Cas F (coeficiente de correlação:  $R^2 = 0.99$ ; curva de calibração:  $Y = 4.10^7X + 536575$ ), revelou que a FC (fração EFS2) tem um percentual de casearinas totais de 56.5 % (mg/g), sendo a Cas F e a Cas X as moléculas mais presentes (teor de 9.9 e 14.2 %, respectivamente), como visto no cromatograma obtido por cromatografia líquida quantitativa de alta eficiência, onde os maiores picos de retenção correspondem à Cas F (pico 5) e à Cas X (pico 10) (**Figura 9**). Adicionalmente, o cromatograma apresenta vários outros picos com espectros Ultravioleta ( $\lambda_{\max} = 230-235$  nm) similares a outros clerodanos isolados de *C. sylvestris* (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; ESPÍNDOLA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2010).



**Figura 9** – Perfil cromatográfico da Fração rica em Casearinas (FC) obtido a partir das folhas de *Casearia sylvestris* por cromatografia líquida quantitativa de alta eficiência. A quantificação dos diterpenos clerodânicos mais presentes foi determinada com base na curva de calibração para a Caseargrevina F (no lado superior direito da figura). Detecção por luz ultravioleta a 230 nm.

## 4.2 Atividade Citotóxica

Primeiramente, a avaliação da atividade citotóxica das substâncias em estudo foi realizada pelo método do MTT em 13 linhagens de células tumorais (12 linhagens humanas e 01 murina). Os valores de  $CI_{50}$ , determinados após 72 h de incubação, estão representados na **Tabela 3**.

O clerodano diterpênico que apresentou maior potencial citotóxico foi a Cas F, com valores de  $CI_{50}$  menores que  $0.8 \mu\text{M}$  para todas as linhagens tumorais em cultura testadas, desde as leucêmicas [MOLT-4 ( $0.09 \mu\text{M}$ ), HL-60 ( $0.20 \mu\text{M}$ ), CEM ( $0.13 \mu\text{M}$ ), K-562 ( $0.74 \mu\text{M}$ )] até tumores sólidos [MDA-MB/231 ( $0.14 \mu\text{M}$ ), Hs578-T ( $0.26 \mu\text{M}$ ), MX-1 ( $0.36 \mu\text{M}$ ), PC-3 ( $0.31 \mu\text{M}$ ), DU-145 ( $0.76 \mu\text{M}$ ), HCT-8 ( $0.15 \mu\text{M}$ ), SF-295 ( $0.17 \mu\text{M}$ ), MDA/MB-435 ( $0.13 \mu\text{M}$ ) e B-16/F10 ( $0.15 \mu\text{M}$ )]. A Cas X mostrou também promissora atividade citotóxica *in vitro*, com maior efeito contra as células leucêmicas das linhagens MOLT-4 ( $0.22 \mu\text{M}$ ), HL-60 ( $0.28 \mu\text{M}$ ) e CEM ( $0.39 \mu\text{M}$ ) e melanoma humano MDA/MB-435 ( $0.35 \mu\text{M}$ ) e, por outro lado, menos citotoxicidade contra outra linhagem leucêmica, K-562 ( $8.93 \mu\text{M}$ ). Já as casearinas B e D mostraram moderada atividade citotóxica, com valores de  $CI_{50}$  variando entre  $1.44$  e  $0.54 \mu\text{M}$  para a linhagem MOLT-4 a  $5.37$  e  $8.53 \mu\text{M}$  para DU-145, respectivamente. A FC mostrou potente efeito citotóxico, com  $CI_{50}$  menor que  $0.5 \mu\text{g/mL}$  contra todas as linhagens estudadas, revelando ser mais ativa contra células MX-1 ( $0.18 \mu\text{g/mL}$ ).

O potencial antitumoral das substâncias foi confirmado usando um modelo de cultura primária do tumor S-180 (**Tabela 4**). A Cas F [ $0.55 \mu\text{g/mL}$  ( $1.0 \mu\text{M}$ )] e a FC ( $0.6 \mu\text{g/mL}$ ) foram as substâncias mais ativas contra células de S-180, enquanto a Dox mostrou um  $CI_{50}$  de  $3.17 \mu\text{M}$ . A Cas D foi a molécula menos ativa ( $6.8 \mu\text{M}$ ), enquanto os compostos Cas B ( $2.2 \mu\text{M}$ ) e X ( $3.0 \mu\text{M}$ ) revelaram atividade moderada.

Uma vez que as substâncias testadas apresentaram citotoxicidade contra linhagens tumorais, decidiu-se avaliar seu efeito citotóxico também contra células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) em cultura primária após 72 h de incubação através do ensaio de Alamar Blue. Semelhante aos resultados obtidos para as linhagens cancerosas, as substâncias estudadas revelaram ser citotóxicas contra PBMC, embora todas tenham demonstrado algum grau de seletividade para a linhagem leucêmica HL-60 quando comparada a sua respectiva  $CI_{50}$  em PBMC (**Tabela 4**). Mais uma vez, a Cas F revelou resultados mais promissores, uma vez que ela foi 53.4 vezes mais citotóxica contra HL-60, apresentando-se mais seletiva até mesmo que o controle positivo Dox (coeficiente de seletividade de 44.5). Em escala de seletividade, a Cas X foi a segunda colocada (7.2), seguida pela Cas B (2.4), D (2.4) e pela FC (1.9).

**Tabela 3** – Atividade citotóxica *in vitro* de diterpenos clerodânicos e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* após 72 h de incubação quantificada através do ensaio de MTT.

Substância	CI <sub>50</sub> [µg/mL (µM)]*						
	MOLT-4	HL-60	CEM	K-562	MDA-MB/231	Hs578-T	MX-1
<b>Doxorrubicina</b>	0.03 (0.05)	0.02 (0.04)	0.02 (0.04)	0.14 (0.24)	0.03 (0.05)	0.01 (0.02)	0.002 (0.004)
	0.02 – 0.05	0.01 – 0.02	0.02 – 0.03	0.09 – 0.23	0.02 - 0.03	0.01 - 0.02	0.001 - 0.004
<b>Casearina B</b>	0.83 (1.44)	1.54 (2.67)	0.87 (1.51)	1.89 (3.28)	2.10 (3.62)	2.10 (3.63)	2.83 (4.89)
	0.41 – 1.69	1.39 – 1.51	0.75 – 0.99	1.67 – 2.14	1.87 - 2.36	1.87 – 2.36	2.35 – 3.40
<b>Casearina D</b>	0.30 (0.54)	1.91 (3.44)	1.46 (2.63)	1.74 (3.13)	2.35 (4.23)	2.43 (4,39)	3.60 (6.50)
	0.14 – 0.62	1.25 – 2.91	1.29 – 1.64	1.56 – 1.95	1.52 – 3.00	1.88 – 3.14	2.71 – 4.76
<b>Caseargrevina F</b>	0.05 (0.09)	0.11 (0.20)	0.07 (0.13)	0.41 (0.74)	0.08 (0.14)	0.13 (0.26)	0.18 (0.36)
	0.05 – 0.11	0.10 – 0.12	0.05 – 0.10	0.35 – 0.47	0.08 - 0.09	0.12 – 0.15	0.16 – 0.20
<b>Casearina X</b>	0.12 (0.22)	0.15 (0.28)	0.21 (0.39)	4.76 (8.93)	0.81 (1.51)	0.61 (1.14)	0.51 (0.95)
	0.10 – 0.17	0.14 – 0.16	0.19 – 0.23	2.65 – 8.56	0.67 – 0.99	0.48 – 0.77	0.42 – 0.63
<b>Fração Casearinas</b>	0.47	0.35	0.44	0.35	0.26	0.29	0.18
	0.20 – 1.11	0.28 – 0.42	0.30 – 0.65	0.30 – 0.44	0.23 - 0.29	0.25 – 0.31	0.15 – 0.21



**Tabela 3** – Atividade citotóxica *in vitro* de diterpenos clerodânicos e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* após 72 h de incubação quantificada através do ensaio de MTT (continuação).

Substância	CI <sub>50</sub> [µg/mL (µM)]*					
	PC-3	DU-145	HCT-8	SF-295	MDA/MB-435	B-16/F10
<b>Doxorrubicina</b>	0.24 (0.41)	0.17 (0.29)	0.01 (0.02)	0.23 (0.40)	0.48 (0.83)	0.002 (0.004)
	0.21 – 0.27	0.12 – 0.23	0.01 – 0.02	0.19 – 0.25	0.34 – 0.66	0.001 – 0.003
<b>Casearina B</b>	1.66 (2.87)	3.11 (5.37)	2.95 (5.11)	1.56 (2.70)	1.01 (1.75)	2.10 (3.63)
	1.35 – 2.03	2.48 – 3.89	2.54 – 3.41	1.19 – 2.03	0.82 – 1.24	1.87 – 2.36
<b>Casearina D</b>	0.78 (1.41)	4.74 (8.53)	1.54 (2.80)	0.84 (1.53)	0.71 (1.29)	3.61 (6.52)
	0.59 – 1.01	3.92 – 5.74	1.33 – 1.78	0.70 – 1.01	0.63 – 0.79	3.06 – 4.25
<b>Caseargrevina F</b>	0.17 (0.31)	0.42 (0.76)	0.08 (0.15)	0.09 (0.17)	0.07 (0.13)	0.08 (0.15)
	0.15 – 0.19	0.31 – 0.58	0.07 – 0.09	0.08 – 0.10	0.06 – 0.07	0.07 – 0.08
<b>Casearina X</b>	0.46 (0.86)	0.64 (1.19)	0.52 (0.97)	0.23 (0.43)	0.19 (0.35)	0.63 (1.15)
	0.41 – 0.52	0.58 – 0.72	0.48 – 0.56	0.19 – 0.27	0.19 – 0.21	0.48 – 0.81
<b>Fração Casearinas</b>	0.29	0.27	0.33	0.23	0.28	0.25
	0.25 – 0.34	0.20 – 0.35	0.27 – 0.40	0.22 – 0.24	0.25 – 0.31	0.22 – 0.28

\* Os valores (n=3) correspondem à CI<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95 % obtidos por regressão não-linear para as linhagens tumorais humanas de leucemia (MOLT-4, CEM, HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-231, Hs578-T, MX-1), carcinoma de próstata (PC-3, DU-145), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e de melanoma humano (MDA/MB-435) e murino (B-16/F10). O quimioterápico doxorrubicina foi usado como fármaco padrão (controle positivo).

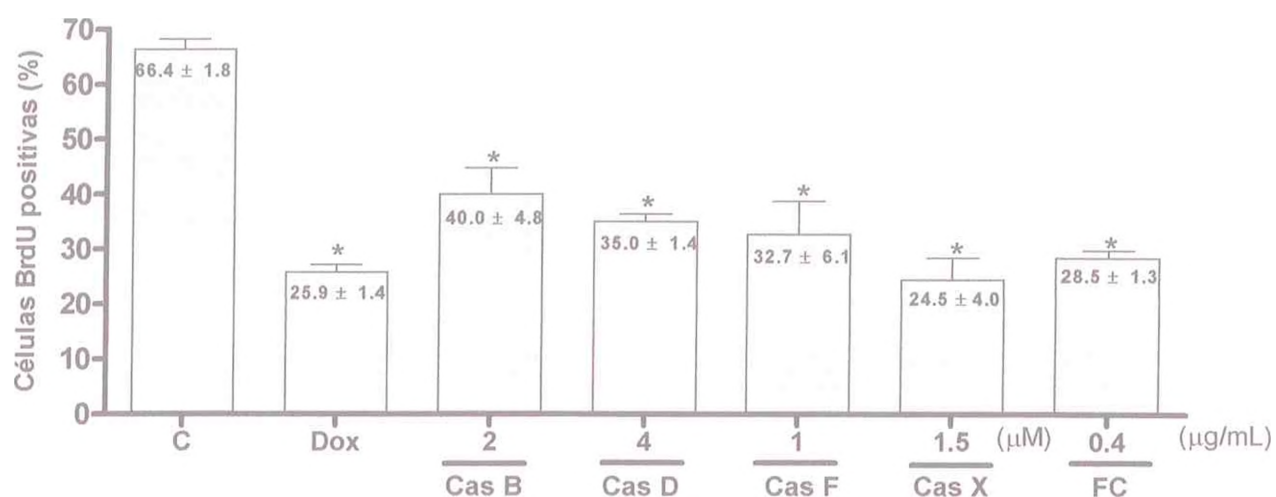
**Tabela 4** – Citotoxicidade de diterpenos clerodânicos e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* quantificada em cultura primária de células do tumor Sarcoma 180 e em células mononucleares de sangue periférico através do ensaio de Alamar Blue após 72 h de incubação.

Linhagens	CI <sub>50</sub> [µg/mL (µM)]*					
	Doxorrubicina	Casearina B	Casearina D	Caseargrevina F	Casearina X	Fração Casearina
S-180	1.85 (3.17)	1.27 (2.20)	3.78 (6.80)	0.55 (1.00)	1.61 (3.00)	0.60
	1.42 – 2.42	1.06 – 1.52	3.25 – 4.40	0.43 – 0.70	1.39 – 1.86	0.41 – 0.90
PBMC	0.97 (1.78)	3.63 (6.29)	4.54 (8.17)	5.39 (10.68)	1.10 (2.01)	0.65
	0.52 – 1.80	2.98 – 4.41	3.90 – 5.29	4.80 – 6.06	0.91 – 1.32	0.50 – 0.86
HL-60	0.04	2.67	3.44	0.20	0.28	0.35
Seletividade**	44.5	2.4	2.4	53.4	7.2	1.9

\* Os valores (n=2) correspondem à CI<sub>50</sub> e intervalo de confiança de 95 % obtidos por regressão não-linear para células do tumor Sarcoma 180 (S-180) obtidas da cavidade peritoneal de camundongos e para células mononucleares de sangue periférico (PBMC) isoladas a partir de voluntários humanos sadios. Os valores de CI<sub>50</sub> para a linhagem leucêmica HL-60 foram obtidos através do ensaio de MTT (ver Tabela 3). O quimioterápico doxorrubicina (Dox) foi usado como fármaco padrão (controle positivo). \*\* Coeficiente de seletividade calculado através da CI<sub>50</sub> em PBMC / CI<sub>50</sub> em HL-60.

#### 4.3 Inibição da incorporação de BrdU

O potencial antiproliferativo dos compostos foi determinado usando uma técnica de imunocitoquímica que permite determinar o percentual de incorporação do nucleotídeo BrdU pelas células que estão se multiplicando. Utilizando somente as concentrações correspondentes aos valores de CI<sub>50</sub> de cada amostra (Figura 10), todas as substâncias estudadas foram capazes de diminuir o percentual de incorporação da BrdU de forma significativa após 24 h de incubação: 40.0 ± 4.8, 35.0 ± 1.4, 32.7 ± 6.1, 24.5 ± 4.0 e 28.5 ± 1.3 % para a Cas B (2 µM), D (4 µM), F (1 µM), X (1.5 µM) e FC (0.4 µg/mL), respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (C) (66.4 ± 1.8 %) (P < 0.01). Na concentração de 0.8 µg/mL, a FC causou destruição celular tão intensa ao ponto de impossibilitar a contagem de células. Por esse motivo, decidiu-se avaliar a inibição da síntese de DNA apenas na concentração corresponde à CI<sub>50</sub>/2. As células tratadas com Dox (0.6 µM) apresentaram um percentual de incorporação de 24.5 % (P < 0.01).

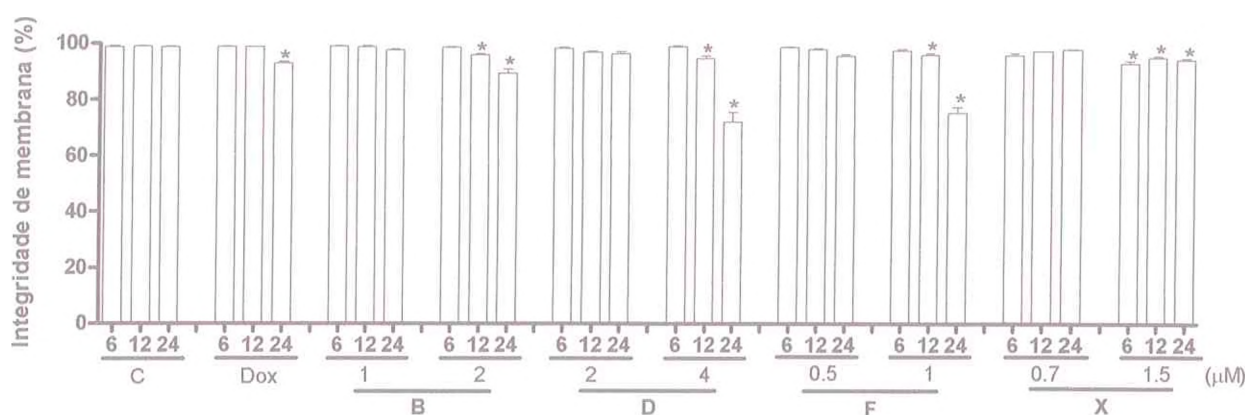


**Figura 10** – Inibição da síntese de DNA avaliada através da incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) e com a Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0.6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 2). \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.4 Alterações Celulares avaliadas por Citometria de Fluxo

##### 4.4.1 Integridade de Membrana

A integridade de membrana analisada com PI após 6, 12 e 24 h de incubação mostrou que todas as substâncias testadas diminuíram a integridade da membrana plasmática das células. Porém, observou-se que essa diminuição de integridade foi dependente do tempo e da concentração (**Figura 11**). Assim, todos os compostos causaram desintegração da membrana somente na maior concentração testada (valor da  $CI_{50}$ ) a partir de 12 h (98.8 ± 0.1, 95.7 ± 0.4, 94.4 ± 1.0, 95.7 ± 0.6 e 94.9 ± 0.5 %) e 24 h de incubação [96.1 ± 0.8, 89.1 ± 1.6, 71.8 ± 3.4, 74.9 ± 2.1 e 94.1 ± 0.4 % para o controle, Cas B (2 μM), D (4 μM), F (1 μM) e X (1.5 μM), respectivamente] (P < 0.01). A exceção foi a Cas X 1.5 μM, a qual foi a única capaz de reduzir a integridade após 6 h de incubação (92.7 ± 1.0 %). Por outro lado, a Dox mostrou resultados significantes somente após 24 h (92.6 ± 0.7 %). De maneira semelhante aos clerodanos, a FC (**Figura 14**) causou ruptura de membrana após 24 h em ambas as concentrações estudadas (0.4 e 0.8 μg/mL, 93.6 ± 0.7 e 80.4 ± 1.3 %, respectivamente) (P < 0.01).



**Figura 11** – Integridade de membrana de células leucêmicas da linhagem HL-60 analisada com iodeto de propídeo através de citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0.6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

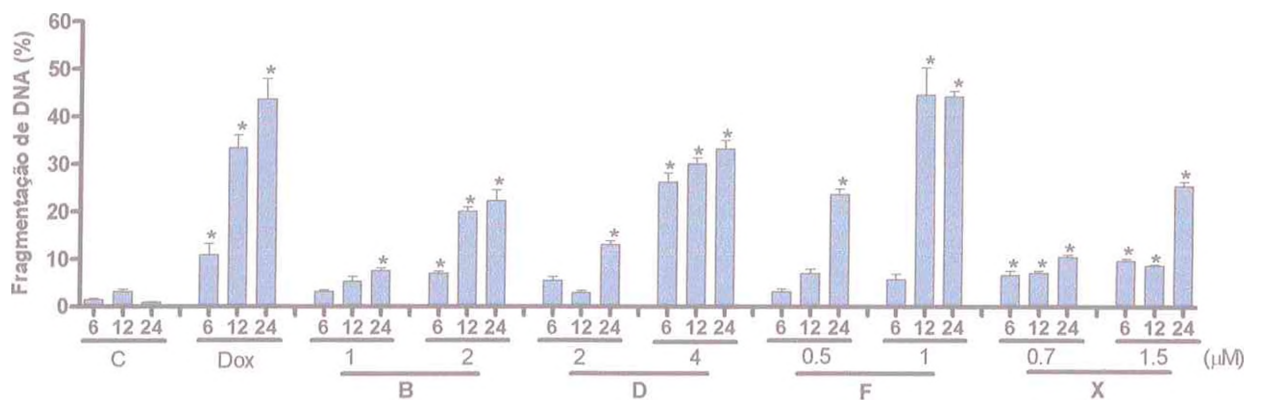
#### 4.4.2 Fragmentação Internucleossomal de DNA

Nesse ensaio, as células controle e tratadas foram incubadas com uma solução contendo triton X-100 e PI. O triton permeabiliza a membrana celular e o PI se liga ao 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 12**, todos os compostos testados induziram a fragmentação do DNA em todas as doses avaliadas, de maneira tempo ou concentração dependente do composto. Dox causou fragmentação a partir das 6 h de incubação (10.9 ± 2.3 %), sendo que após 12 e 24 h, os índices percentuais de fragmentação aumentaram significativamente (33.4 ± 2.7 e 43.6 ± 4.3 %, respectivamente) (P < 0.01).

Entre todas as amostras estudadas, a Cas X foi a única que acarretou fragmentação ao DNA das células leucêmicas já nas primeiras 6 h de exposição na menor concentração testada (0.7 μM, 6.6 ± 0.9 %) quando comparada ao controle negativo (1.5 ± 0.3 %) (P < 0.01). Esse mesmo nível de fragmentação se manteve estatisticamente constante até o período final de incubação (24 h) com a concentração de 0.7 μM (7.1 ± 0.5 e 10.5 ± 0.5 %) e até 12 h de exposição com a concentração de 1.5 μM (9.7 ± 0.4 e 8.7 ± 0.6, respectivamente). O pico de fragmentação foi observado somente após 24 h de incubação, onde o percentual de fragmentação foi de 25.4 ± 0.9 % (P < 0.01). A Cas F foi a molécula

que mostrou maior potencial de indução de fragmentação após 24 h de incubação nas concentrações de 0.5  $\mu\text{M}$  ( $23.7 \pm 1.0 \%$ ) e de 1  $\mu\text{M}$  após 12 e 24 h ( $44.5 \pm 5.7$  e  $44.2 \pm 1.1 \%$ , respectivamente) ( $P < 0.01$ ) quando comparado ao controle de 12 e 24 h ( $3.2 \pm 0.4$  e  $0.9 \pm 0.1 \%$ ). As moléculas Cas B e D apresentaram atividade similar, uma vez que ambas foram capazes de induzir quebra das moléculas de DNA após 24 h na menor concentração testada (1  $\mu\text{M}$ ,  $7.5 \pm 0.6 \%$ ; 2  $\mu\text{M}$ ,  $13.0 \pm 0.8 \%$ ) e após 6 h (7.1  $\pm 0.3$  e  $26.3 \pm 1.9 \%$ ), 12 h ( $20.0 \pm 0.9$  e  $30.1 \pm 1.2 \%$ ) e 24 h de incubação ( $22.3 \pm 2.2$  e  $33.2 \pm 1.8 \%$ ) com a maior dose (2 e 4  $\mu\text{M}$ , para Cas B e Cas D, respectivamente).

A FC não fugiu à regra (**Figura 14**) e foi capaz de induzir a fragmentação de DNA tanto na concentração de 0.4  $\mu\text{g/mL}$  ( $13.7 \pm 1.5 \%$ ) quanto na de 0.8  $\mu\text{g/mL}$  ( $67.8 \pm 4.6 \%$ ) após 24 h de tratamento ( $P < 0.01$ ).

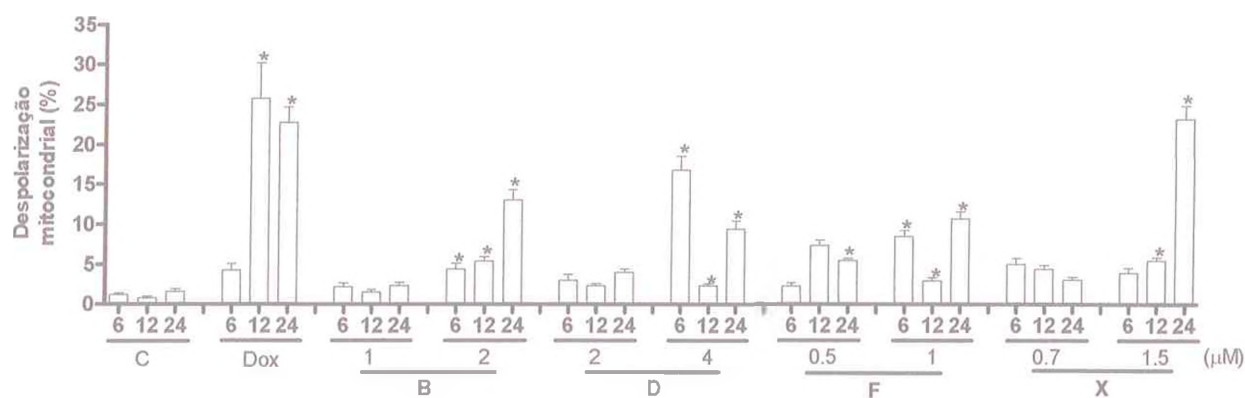


**Figura 12** – Fragmentação do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 revelada com iodeto de propídeo e triton X-100 através de citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.01$  comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

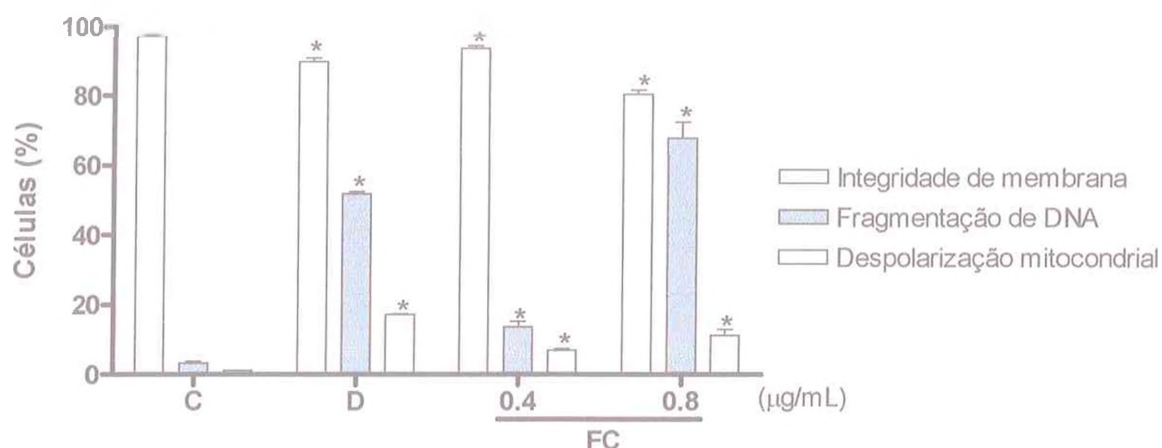
#### 4.4.3 Despolarização Mitocondrial

Apenas a Cas F 0.5  $\mu\text{M}$  ( $5.4 \pm 0.3 \%$ ) e a FC 0.4  $\mu\text{g/mL}$  ( $7.1 \pm 0.5 \%$ ) mostraram resultados significantes na menor concentração quando comparadas com o controle ( $1.1 \pm 0.1 \%$ ) após 24 h de tratamento enquanto as outras substâncias estudadas foram capazes de alterar o potencial transmembrânico das células HL-60 somente na maior concentração ( $P < 0.01$ , **Figuras 13 e 14**). Assim, as casearinas B 2  $\mu\text{M}$  ( $4.4 \pm 0.8$ ,  $5.4 \pm 0.6$  e  $13.0 \pm 1.2 \%$ ), D 4  $\mu\text{M}$  ( $16.8 \pm 17$ ,  $2.3 \pm 0.3$  e  $9.4 \pm 1.0 \%$ ) e F 1  $\mu\text{M}$  ( $8.5 \pm 0.7$ ,  $2.9 \pm 0.4$  e  $10.7 \pm 0.9 \%$ )

causaram despolarização após 6, 12 e 24 h de incubação, respectivamente. Por outro lado, a Cas X 1.5  $\mu\text{M}$  e Dox 0.6  $\mu\text{M}$  mostraram resultados significantes somente após 12h ( $5.5 \pm 0.4$  e  $25.7 \pm 4.5$  %) e 24 h ( $23.2 \pm 1.7$  e  $22.7 \pm 1.9$  %), respectivamente ( $P < 0.01$ ).



**Figura 13** – Despolarização mitocondrial de células leucêmicas da linhagem HL-60 com rodamina 123 por citometria de fluxo após 6, 12 e 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.01$  comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.



**Figura 14** – Perfil das alterações celulares envolvidas na capacidade citotóxica da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* determinado por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de exposição: integridade de membrana (iodeto de propídeo), fragmentação de DNA (iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato) e despolarização mitocondrial (rodamina 123). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0.6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.4.4 Parada do Ciclo Celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

As células tratadas ou não tratadas com as substâncias por 6, 12 e 24 h foram marcadas com PI, o percentual de DNA em cada fase do ciclo celular foi quantificado por citometria de fluxo e, posteriormente, analisado pelo programa *ModFit LT 3.1*. Os níveis de DNA fragmentado se mostraram elevados de maneira significativa com todas as substâncias e períodos estudados (P < 0.01), entretanto somente a Cas X (0.7 e 1.5 µM) e a FC (0.4 e 0.8 µg/mL) no período de 24 h de incubação foram capazes de favorecer o acúmulo de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (63.1 ± 2.5 e 63.1 ± 10.6 %; 60.5 ± 0.6 e 28.8 ± 1.6 %) e de diminuir o percentual de células na fase S (30.2 ± 2.8 e 29.2 ± 10.5 %; 31.4 ± 0.6 %) do ciclo celular, quando comparadas ao controle (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 17.1 ± 1.0 %; S, 76.5 ± 1.4 %), respectivamente (**Tabela 6**) (P < 0.01).

Dox (0.6 µM) foi ativa em dois tempos de incubação distintos: 12h (**Tabela 5**), quando ocorreu parada na fase de síntese de DNA (79.3 ± 1.8 %) e 24 h (**Tabela 6**), quando houve redução no percentual de células em G<sub>2</sub>/M (1.1 ± 0.6 %).

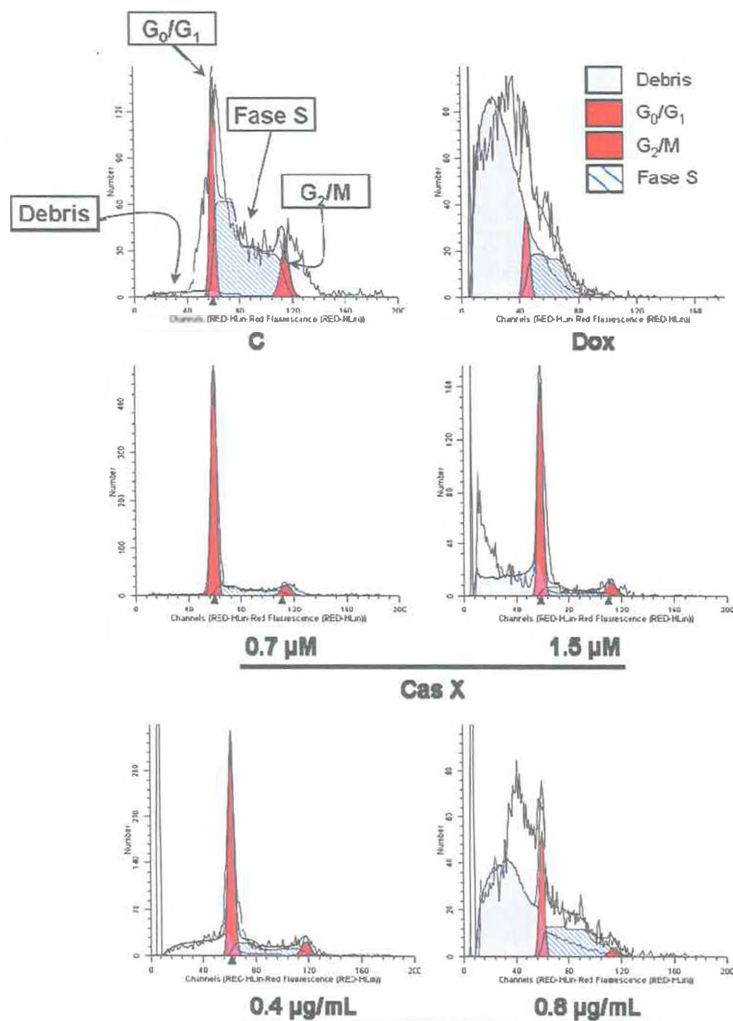
**Tabela 5** – Efeitos dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* sobre as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 determinados por citometria de fluxo (iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato) após 6 e 12 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 1.6 %). Doxorubicina (Dox, 0.6  $\mu$ M) foi usada como controle positivo.

Substância	Concentração ( $\mu$ M)	Fases do Ciclo Celular					
		6 h			12 h		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>C</b>	-	13.1 $\pm$ 0.9	78.6 $\pm$ 1.5	6.3 $\pm$ 0.8	21.5 $\pm$ 0.6	71.4 $\pm$ 1.2	7.1 $\pm$ 1.2
<b>Dox</b>	0.6	14.1 $\pm$ 2.7	77.2 $\pm$ 4.0	7.5 $\pm$ 1.2	17.5 $\pm$ 2.0	79.3 $\pm$ 1.8*	1.3 $\pm$ 0.5
<b>Cas B</b>	1.0	12.1 $\pm$ 0.3	83.0 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.7	20.7 $\pm$ 2.0	71.3 $\pm$ 2.3	8.0 $\pm$ 0.7
	2.0	16.1 $\pm$ 2.3	77.2 $\pm$ 3.1	6.0 $\pm$ 0.8	22.4 $\pm$ 1.9	70.4 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 0.7
<b>Cas D</b>	2.0	12.4 $\pm$ 0.7	78.3 $\pm$ 2.0	7.0 $\pm$ 0.8	26.3 $\pm$ 1.5	68.3 $\pm$ 1.2	5.0 $\pm$ 1.0
	4.0	7.6 $\pm$ 1.5	82.8 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 2.0	22.9 $\pm$ 1.1	72.0 $\pm$ 1.5	5.2 $\pm$ 0.9
<b>Cas F</b>	0.5	14.3 $\pm$ 0.6	79.9 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 1.6	72.3 $\pm$ 2.9	5.7 $\pm$ 0.8
	1.0	10.9 $\pm$ 0.3	82.9 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 0.8	18.1 $\pm$ 1.8	75.4 $\pm$ 1.4	6.4 $\pm$ 0.6
<b>Cas X</b>	0.7	21.0 $\pm$ 3.4	72.3 $\pm$ 1.9	7.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 0.9	74.3 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.4
	1.5	22.5 $\pm$ 3.9	71.8 $\pm$ 2.1	5.6 $\pm$ 0.4	26.9 $\pm$ 1.3	67.3 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.6

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes (n = 3) e analisados com o programa *ModFit LT 3.1 software (Verity software house)*. \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.



**Tabela 6** – Efeitos dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargreina F (Cas F) e casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas de *Casearia sylvestris* sobre as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 determinados por citometria de fluxo (iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato) após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 1.6 %). Doxorrubicina (Dox, 0.6  $\mu$ M) foi usada como controle positivo. No lado esquerdo, o ciclo celular das células do C, Dox, Cas X e FC está representado por gráficos produzidos a partir do programa *ModFit LT 3.1 software*.



Substância	Concentração ( $\mu$ M)	Fases do Ciclo Celular – 24 h		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
<b>C</b>	-	17.1 $\pm$ 1.0	76.5 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 0.7
<b>Dox</b>	0.6	21.5 $\pm$ 3.3	77.3 $\pm$ 3.6	1.1 $\pm$ 0.6*
<b>Cas B</b>	1.0	18.1 $\pm$ 0.4	74.5 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.6
	2.0	17.9 $\pm$ 1.6	76.7 $\pm$ 2.1	5.4 $\pm$ 1.1
<b>Cas D</b>	2.0	17.3 $\pm$ 2.1	77.3 $\pm$ 2.4	6.4 $\pm$ 0.9
	4.0	20.3 $\pm$ 1.4	74.4 $\pm$ 0.8	5.1 $\pm$ 1.3
<b>Cas F</b>	0.5	19.4 $\pm$ 2.9	73.5 $\pm$ 2.5	7.2 $\pm$ 1.0
	1.0	17.6 $\pm$ 1.8	81.4 $\pm$ 2.5	4.7 $\pm$ 1.9
<b>Cas X</b>	0.7	63.1 $\pm$ 2.5*	30.2 $\pm$ 2.8*	6.6 $\pm$ 0.6
	1.5	63.1 $\pm$ 10.6*	29.2 $\pm$ 10.5*	5.7 $\pm$ 1.9
<b>FC</b>	0.4 $\mu$ g/mL	60.5 $\pm$ 0.6*	31.4 $\pm$ 0.6*	8.4 $\pm$ 0.2
	0.8 $\mu$ g/mL	28.8 $\pm$ 1.6*	69.1 $\pm$ 1.4	4.0 $\pm$ 0.9

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes (n = 3) e analisados com o programa *ModFit LT 3.1 software* (Verity software house).

\* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.4.5 Incapacidade de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio

Todas as substâncias foram testadas quanto à capacidade de indução da formação de EROS após 1 e 3 h de incubação. Nenhuma das amostras foi capaz de aumentar o percentual de expressão de EROS quanto comparadas com o controle negativo após 1 e 3 h ( $0.1 \pm 0.0$  e  $0.4 \pm 0.1$  %, respectivamente). O controle positivo  $\beta$ -lapachona induziu o aumento significativo de EROS tanto após 1 h ( $45.6 \pm 3.4$  %) quanto após 3 h ( $12.2 \pm 2.3$  %) ( $P < 0.01$ ).

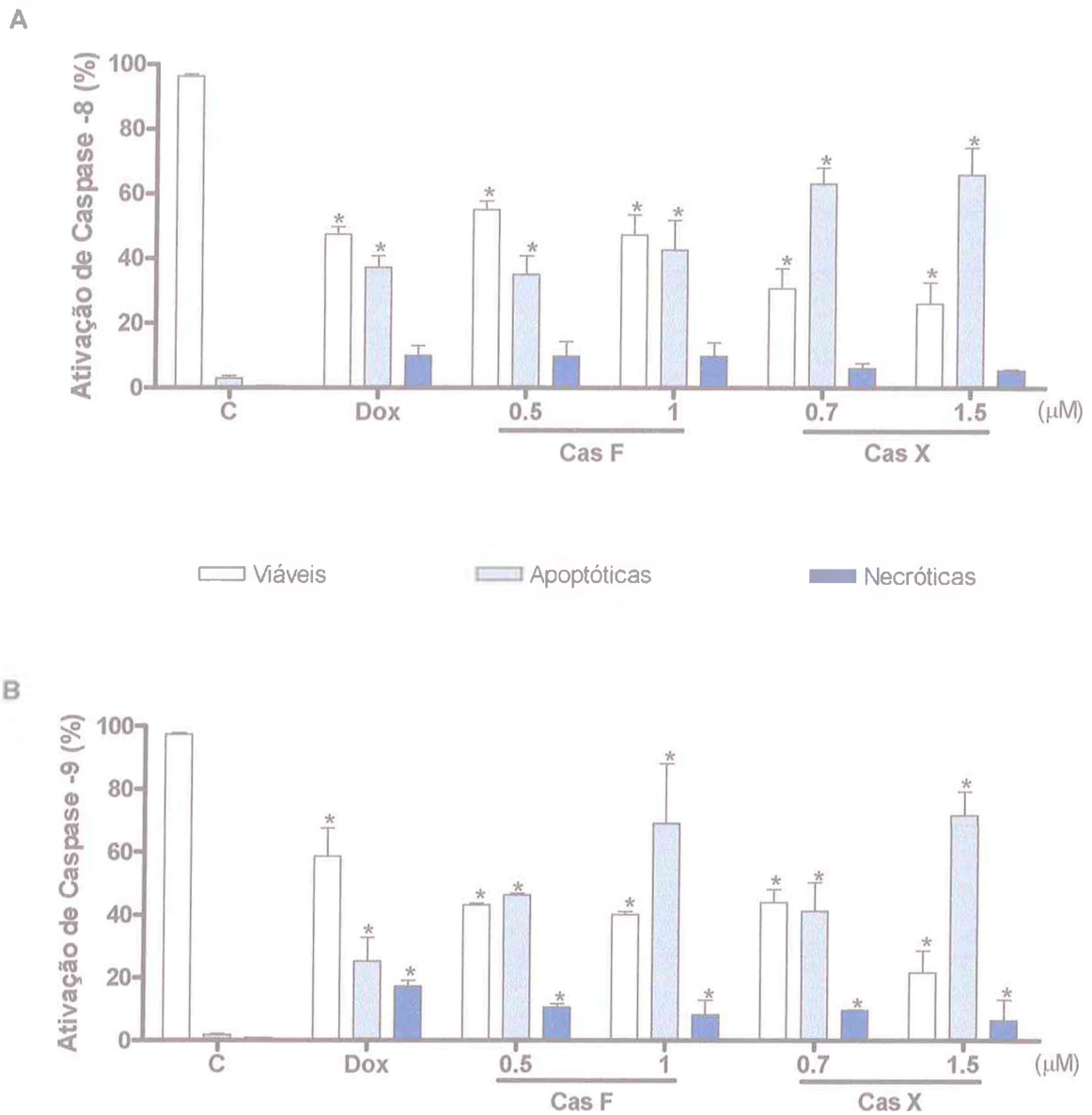
#### 4.4.6 Ativação de Caspases Iniciais -8/-9

A ativação das caspases iniciadoras -8/-9 e efetoras -3/-7 foi avaliada após 24 h de incubação com as duas moléculas mais ativas: Cas F e Cas X. A caspase-8 foi ativada por ambas as moléculas, as quais causaram diminuição do número de células viáveis ( $55.2 \pm 2.5$  e  $47.4 \pm 6.1$  %, Cas F 0.5 e 1  $\mu$ M;  $30.7 \pm 6.2$  e  $26.1 \pm 6.6$  %, Cas X 0.7 e 1.5  $\mu$ M, respectivamente) e aumento de células apoptóticas ( $35.1 \pm 5.7$  e  $42.7 \pm 9.2$  %, Cas F 0.5 e 1  $\mu$ M;  $63.1 \pm 5.0$  e  $65.9 \pm 8.4$  %, Cas X 0.7 e 1.5  $\mu$ M, respectivamente) de forma independente da concentração quando comparadas ao controle negativo ( $9.3 \pm 0.7$  e  $3.1 \pm 0.6$  %, viáveis e apoptóticas, respectivamente) (**Figura 15A**,  $P < 0.01$ ).

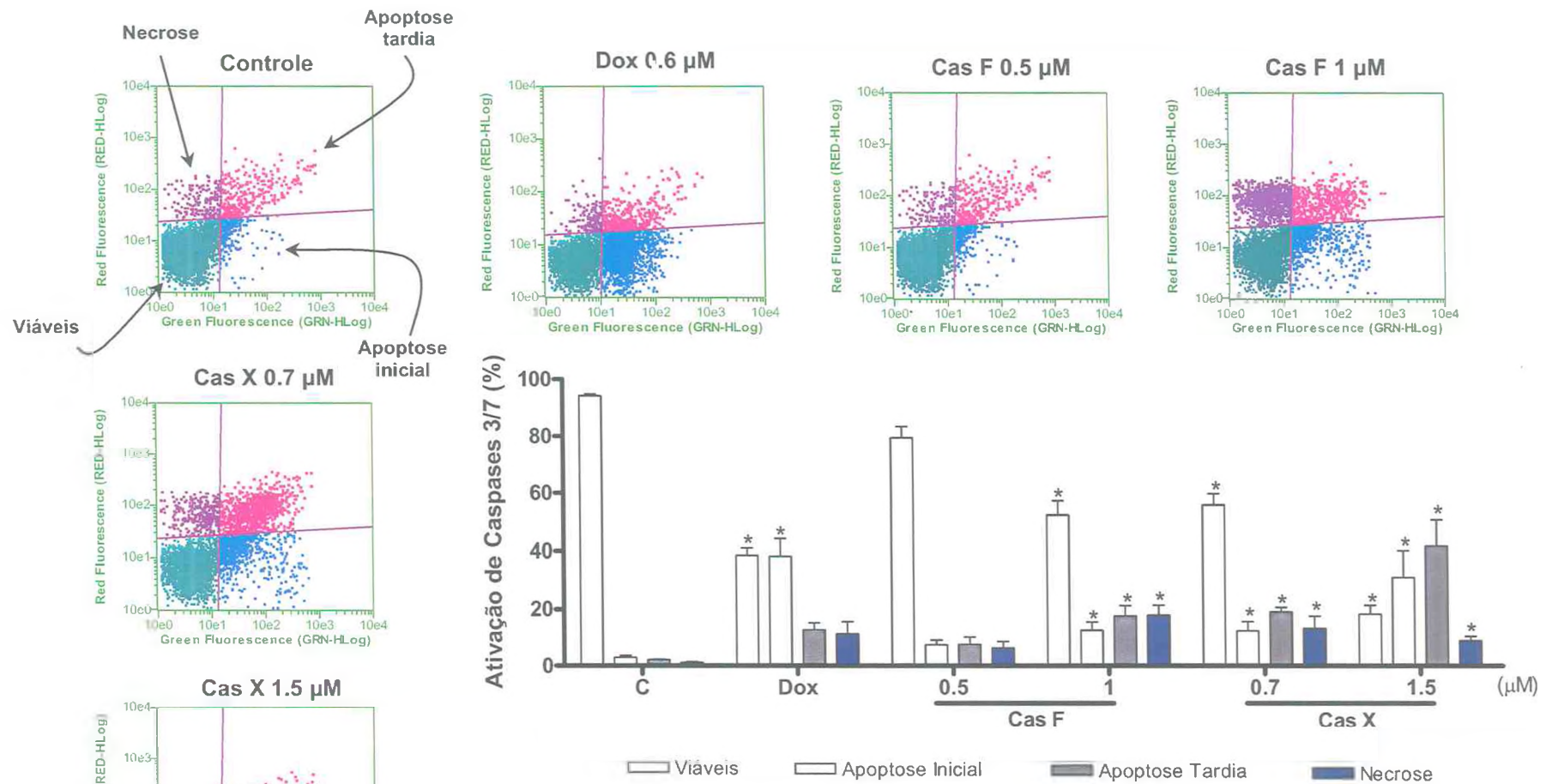
Na avaliação da caspase -9, a Cas F 0.5  $\mu$ M ( $43.2 \pm 0.4$ ,  $46.4 \pm 0.4$  e  $10.7 \pm 1.2$  %), F 1  $\mu$ M ( $40.1 \pm 1.0$ ,  $69.2 \pm 19.0$  e  $8.3 \pm 4.7$  %), X 0.7  $\mu$ M ( $44.0 \pm 4.0$ ,  $41.3 \pm 9.0$  e  $9.6 \pm 0.2$  %) e X 1.5  $\mu$ M ( $21.7 \pm 7.0$ ,  $71.8 \pm 7.5$  e  $6.5 \pm 5.0$  %) reduziram o percentual de viabilidade, aumentaram o percentual de apoptose e o de necrose, respectivamente (**Figura 15B**,  $P < 0.01$ ).

#### 4.4.7 Ativação de Caspases Efetoras -3/-7

Como demonstrado na **Figura 16** e semelhante ao encontrado com as caspases-8 e -9, ambas as moléculas Cas X e F reduziram o número de células viáveis e aumentaram o surgimento de células apoptóticas iniciais e tardias ( $P < 0.01$ ), embora esse aumento tenha ocorrido apenas na maior concentração da Cas F (1  $\mu$ M,  $12.6 \pm 2.9$  e  $17.6 \pm 3.7$  %) e na duas concentrações de Cas X (0.7  $\mu$ M,  $12.3 \pm 3.3$  e  $19.1 \pm 1.6$  %; 1.5  $\mu$ M,  $31.1 \pm 9.4$  e  $42.1 \pm 8.9$  %), indicando a ativação das caspases-3 e -7 em comparação ao controle negativo ( $2.1 \pm 0.2$  e  $1.1 \pm 0.3$  %), respectivamente. Apenas a Cas X aumentou o percentual de células necróticas (0.7  $\mu$ M,  $13.8 \pm 4.4$  %; 1.5  $\mu$ M,  $8.8 \pm 1.6$  %) ( $P < 0.01$ ). Dox (0.6  $\mu$ M) diminuiu a viabilidade celular ( $38.6 \pm 2.5$  %) e aumentou o percentual de células em apoptose inicial ( $38.4 \pm 6.0$  %) ( $P < 0.01$ ).



**Figura 15** – Ativação das caspases iniciadoras -8 (A) / -9 (B) analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevida F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

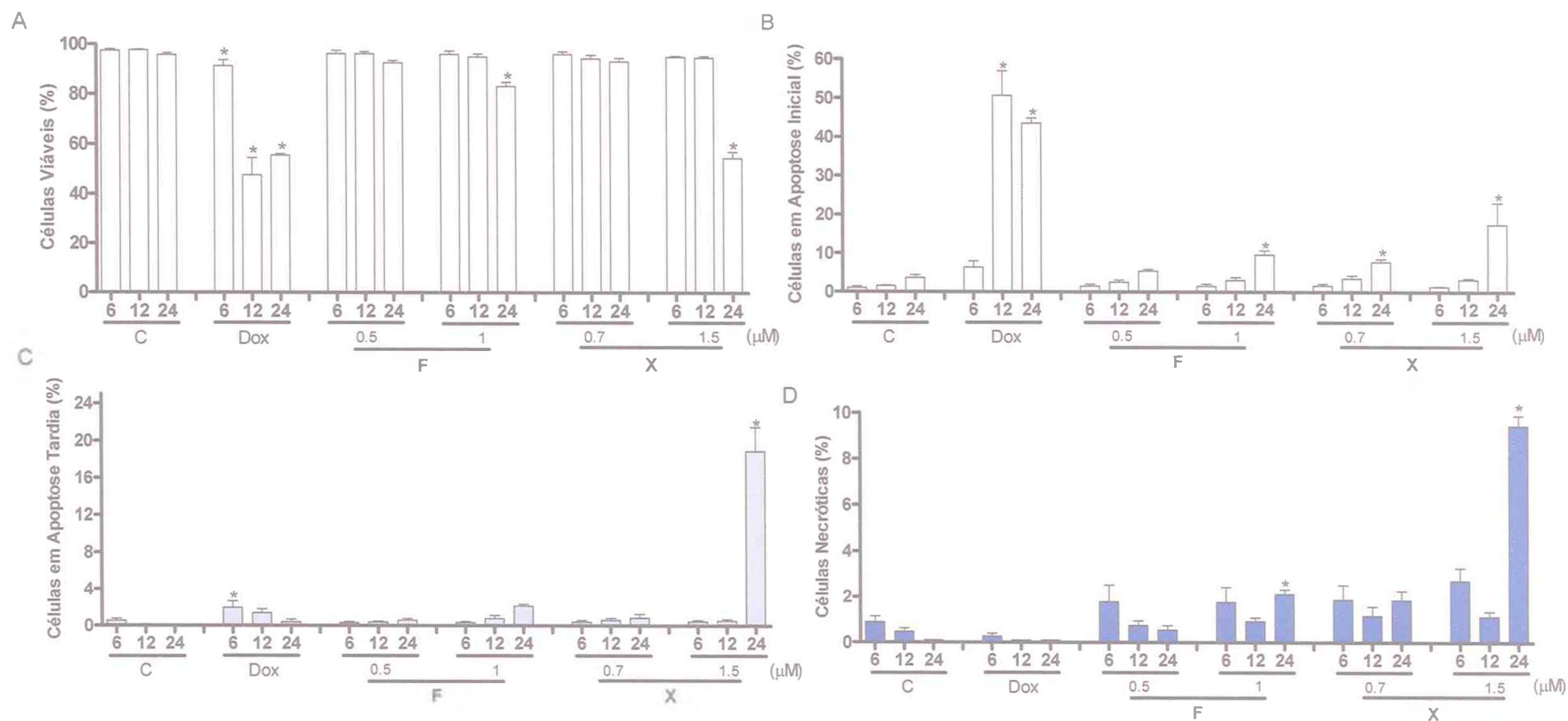


**Figura 16** – Ativação das caspases efetoras -3/-7 analisada por citometria de fluxo em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). \* P < 0.01 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.4.8 Externalização de Fosfatidilserina

Assim como com a ativação de caspases, a externalização de fosfatidilserina foi estudada apenas com Cas F e Cas X. Porém, nesse caso, foram analisadas possíveis alterações após 6, 12 e 24 h de exposição aos mesmos.

A Dox (0.6  $\mu$ M) diminuiu o percentual de células viáveis nos três intervalos de tempo estudados (6h,  $91.4 \pm 2.4$  %; 12 h,  $47.7 \pm 6.8$  %; 24 h,  $55.6 \pm 0.7$  %) e aumentou o de células em apoptose inicial após 12 h ( $50.8 \pm 6.3$  %) e 24 h ( $43.6 \pm 1.4$  %) enquanto os compostos Cas F e Cas X mostraram atividade somente após 24 de incubação. Assim, eles reduziram a quantidade de células viáveis na maior concentração testada (Cas F 1  $\mu$ M,  $83.5 \pm 1.7$  %; Cas X 1.5  $\mu$ M,  $54.7 \pm 2.5$  %) quando comparados ao controle ( $97.5 \pm 0.6$  %) (**Figura 17A**,  $P < 0.01$ ) e aumentaram o percentual de células em fase de apoptose inicial (**Figura 17B**,  $P < 0.01$ ) na maior concentração da Cas F (1  $\mu$ M,  $9.7 \pm 1.1$  %) e na duas concentrações de Cas X (0.7  $\mu$ M,  $7.9 \pm 0.7$  %; 1.5  $\mu$ M,  $17.6 \pm 5.6$  %). Níveis significantes de apoptose tardia foram encontrados após 6 h na presença de Dox ( $1.9 \pm 0.7$  %) e após 24 h na presença da Cas X 1.5  $\mu$ M ( $18.9 \pm 2.6$  %) (**Figura 17C**,  $P < 0.01$ ). A necrose também foi detectada somente após 24 h (Cas F 1  $\mu$ M,  $2.1 \pm 0.2$  %; Cas X 1.5  $\mu$ M,  $9.4 \pm 0.4$  %) (**Figura 17D**,  $P < 0.01$ ).

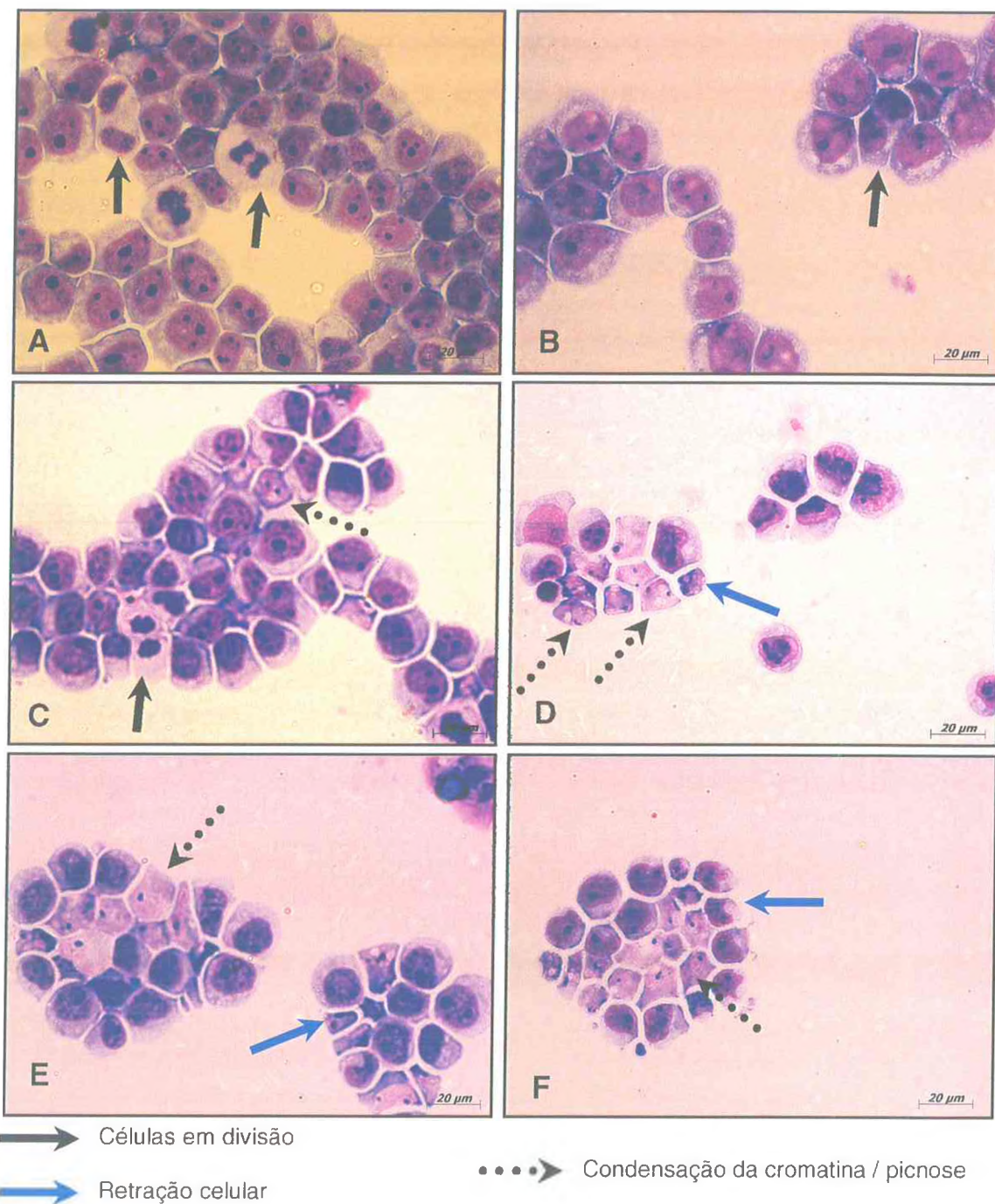


#### 4.5 Alterações morfológicas

A análise morfológica por microscopia óptica das células da linhagem leucêmica promielocítica humana HL-60 tratadas com crescentes concentrações de Cas F e Cas X ou não tratadas pode ser visualizada nas **Figuras 18, 19 e 20**. Como todas as substâncias causavam alterações morfológicamente semelhantes, os dois compostos mais ativos foram escolhidos para fins de análise e discussão.

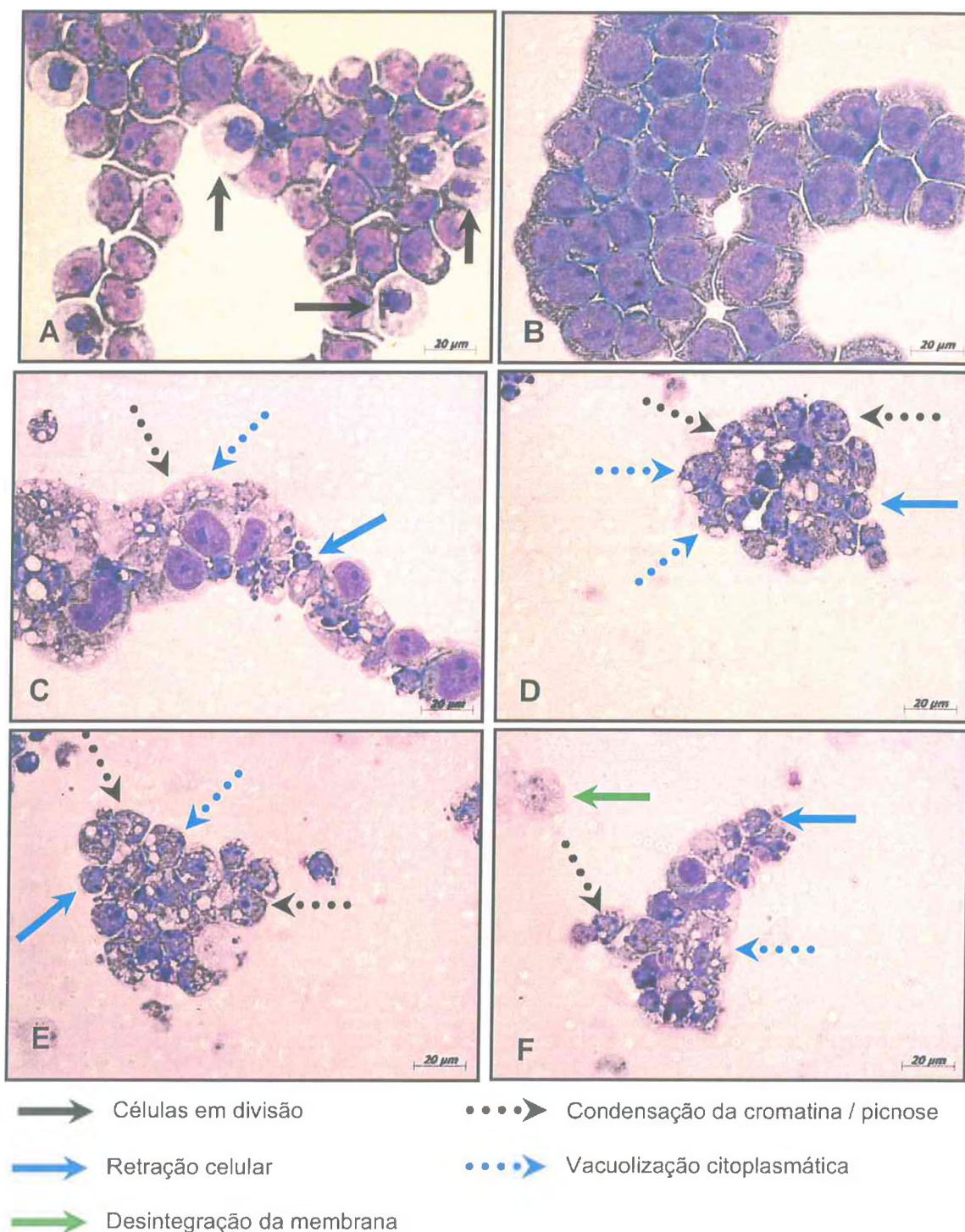
O controle negativo (**Figuras 18A, 19A e 20A**) apresentou características de células íntegras, com citoplasma homogêneo, presença de várias figuras mitóticas e visualização do limite da membrana plasmática celular. As células tratadas com Cas F (0.5 e 1  $\mu\text{M}$ ) e Cas X (0.7 e 1.5  $\mu\text{M}$ ) apresentaram características de morte celular por apoptose após 6 e 12 h de incubação em ambas as concentrações. Condensação cromatínica quase sempre seguida de picnose, fragmentação nuclear (cariorréxis), manutenção da integridade da membrana, rarefação e retração celulares foram vistas após 6 h (**Figuras 18C, 18D, 18E e 18F**) e 12 h (**Figuras 19C, 19D, 19E e 19F**). Curiosamente, após 12 h de incubação, as células tratadas por Cas F e Cas X também mostraram grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos nas duas concentrações testadas, além das características morfológicas supracitadas (**Figuras 19C e 19D, 19E e 19F**, respectivamente). Por outro lado, uma característica típica de necrose - desintegração da membrana - foi identificada após 12 h com Cas F 1  $\mu\text{M}$  (**Figura 19F**) e após 24 h de tratamento tanto com Cas F quanto com Cas X em ambas as concentrações (**Figuras 20C, 20D, 20E e 20F**).

As células tratadas com Dox revelaram alterações morfológicas visualizáveis por microscopia óptica somente após 24 h de exposição, onde foram observados condensação cromatínica, cariorréxis, rarefação e retração celulares (**Figura 20B**). Já as células tratadas com Dox por 6 e 12 h revelaram morfologia semelhante ao controle negativo, embora raras figuras mitóticas tenham sido encontradas (**Figuras 18B e 19B**).

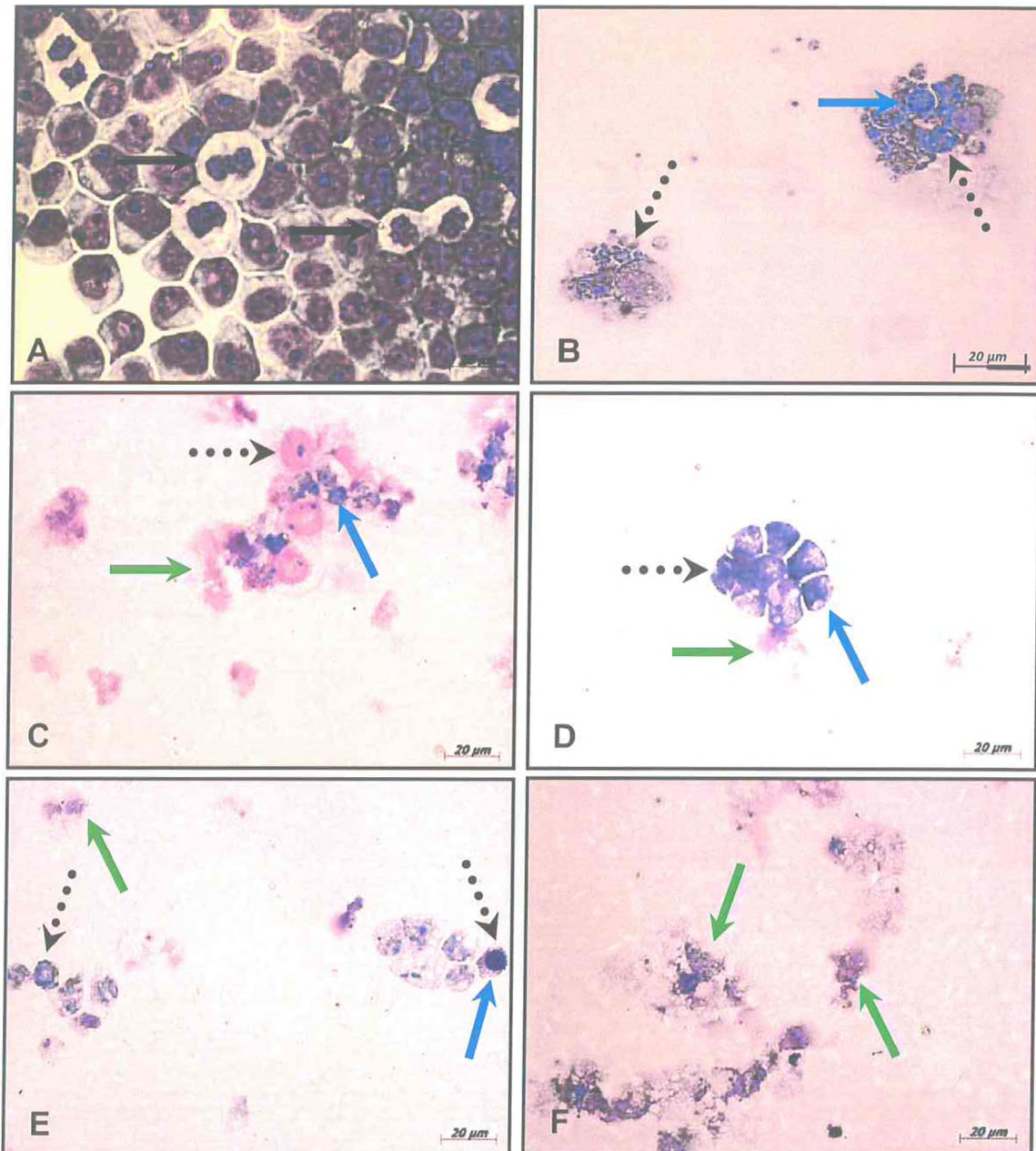


**Figura 18** – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 6 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevina F [0.5  $\mu\text{M}$  (C), 1  $\mu\text{M}$  (D)] e casearina X [0.7  $\mu\text{M}$  (E), 1.5  $\mu\text{M}$  (F)] isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo (B). Coloração por May-Grünwald-Giemsa, 400x.





**Figura 19** – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 12 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevin F [0.5  $\mu\text{M}$  (C), 1  $\mu\text{M}$  (D)] e casearina X [0.7  $\mu\text{M}$  (E), 1.5  $\mu\text{M}$  (F)] isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo (B). Coloração por May-Grünwald-Giemsa, 400x.



- Células em divisão
- Condensação da cromatina / picnose
- Retração celular
- Vacuolização citoplasmática
- Desintegração da membrana

**Figura 20** – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação com os diterpenos clerodânicos caseargrevin F [0.5  $\mu\text{M}$  (C), 1  $\mu\text{M}$  (D)] e casearina X [0.7  $\mu\text{M}$  (E), 1.5  $\mu\text{M}$  (F)] isolados das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0.6  $\mu\text{M}$ ) foi usado como controle positivo (B). Coloração por May-Grünwald-Giemsa, 400x.

#### 4.6 Atividade Antitumoral da Fração rica em Caseínas

A atividade antitumoral da FC foi analisada em camundongos transplantados com o tumor experimental Sarcoma 180 (**Tabela 7**).

O tratamento consistiu na administração da FC i.p. (10 e 25 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 8º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço, rins e estômago. Dentre as doses estudadas, a FC 10 e 25mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral foram capazes de reduzir o crescimento tumoral ( $1.3 \pm 0.2$ ,  $0.3 \pm 0.1$  e  $1.1 \pm 0.3$  g, respectivamente) de forma significativa ( $P < 0.01$ ) quando comparadas ao controle negativo DMSO 4 % (i.p.,  $1.9 \pm 0.2$  g; oral,  $2.4 \pm 0.3$  g), o mesmo acontecendo com o grupo tratado com 5-FU ( $0.3 \pm 0.1$  g). Assim, 5-FU, FC 10 e 25 mg/kg i.p. e FC 50 mg/kg oral revelaram taxas de inibição de crescimento tumoral de  $83.9 \pm 2.3$ ,  $35.8 \pm 8.9$ ,  $86.2 \pm 7.2$  e  $53.7 \pm 10.9$  %, respectivamente ( $P < 0.01$ ) (**Tabela 7**). A FC na dose oral de 25 mg/kg/dia não foi eficaz em reduzir a massa tumoral ( $1.8 \pm 0.3$  g) ( $P > 0.05$ ).

O peso relativo úmido dos órgãos dos animais submetidos ao protocolo de avaliação da atividade antitumoral revelou redução significativa do fígado ( $4.52 \pm 0.20$  g) e do baço ( $0.26 \pm 0.06$  g) dos animais tratados com FC 25 mg/kg/dia i.p. e aumento do estômago ( $1.02 \pm 0.11$  g) na dose de 50 mg/kg/dia ( $P < 0.01$ , **Tabela 7**). A involução esplênica também foi encontrada no grupo tratado com 5-FU 25 mg/kg/dia i.p. ( $0.22 \pm 0.01$  g) quando comparado ao controle ( $0.51 \pm 0.03$  g) ( $P < 0.01$ ). No que concerne ao peso dos animais no final do tratamento, apenas aqueles correspondentes aos grupos 5-FU e FC 25 mg/kg/dia i.p. mostraram diminuição do peso corpóreo ( $21.5 \pm 1.0$  e  $24.6 \pm 0.8$  g, respectivamente) quando comparados ao controle ( $38.0 \pm 1.2$  g,  $P < 0.01$ ).

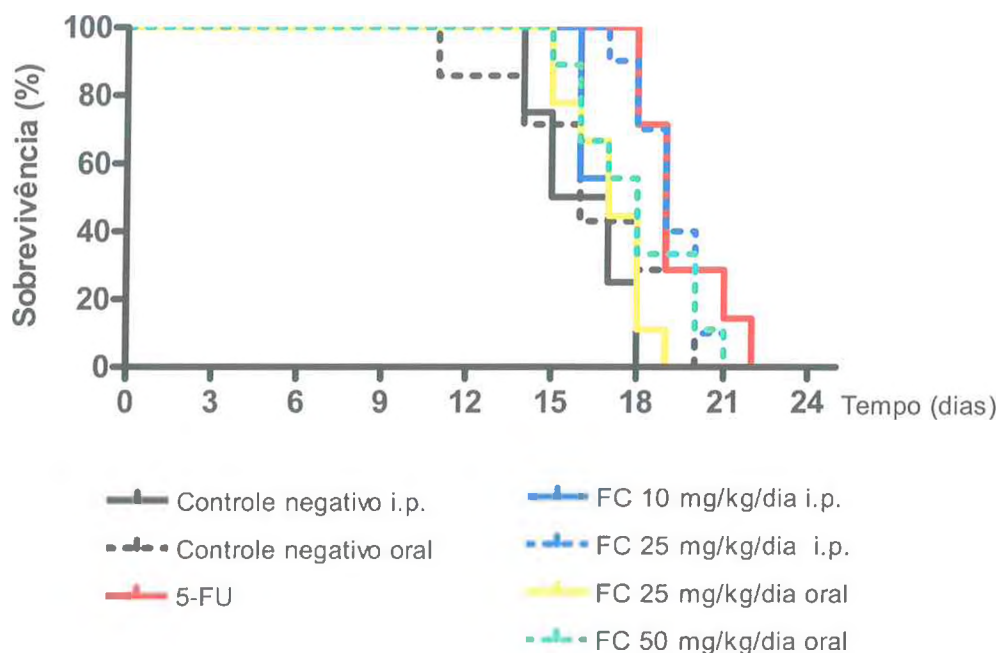
Em outra análise experimental, os animais inoculados com tumor foram submetidos ao mesmo protocolo de avaliação da atividade antitumoral. Porém, após 7 dias de tratamento, todos os grupos foram mantidos sob condições padrões e observados diariamente para a anotação do tempo de sobrevivência. Como visto na curva de sobrevivência (**Figura 21**), a média de sobrevivência dos animais variou entre 16 dias (grupos controles de DMSO 4 % i.p. e oral) até 19 dias nos grupos tratados com 5-FU e FC 25 mg/kg/dia i.p. No entanto, nenhuma das doses estudadas foi capaz de aumentar a média de sobrevivência ( $P > 0.05$ ).

**Tabela 7** – Atividade antitumoral da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* e seus efeitos sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos transplantados com Sarcoma 180 e tratados via intraperitoneal (10 e 25 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo.

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Peso Final (g)	Fígado	Rins	Baço	Estômago	Tumor (g)	Inibição Tumoral (%)
				Peso relativo (g/100g)					
Intraperitoneal	Controle	-	38.0 ± 1.2	5.31 ± 0.13	1.40 ± 0.04	0.51 ± 0.03	0.67 ± 0.07	1.9 ± 0.2	-
	5-FU	25	21.5 ± 1.0*	4.86 ± 0.27	1.28 ± 0.03	0.22 ± 0.01*	0.60 ± 0.04	0.3 ± 0.1*	83.9 ± 2.3*
	FC	10	36.3 ± 0.8	4.98 ± 0.15	1.37 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.59 ± 0.09	1.3 ± 0.2*	35.8 ± 8.9*
		25	24.6 ± 0.8*	4.52 ± 0.20*	1.43 ± 0.08	0.26 ± 0.06*	0.61 ± 0.05	0.3 ± 0.1*	86.2 ± 7.2*
Oral	Controle	-	36.2 ± 1.2	5.28 ± 0.18	1.35 ± 0.07	0.53 ± 0.02	0.69 ± 0.04	2.4 ± 0.3	-
	FC	25	35.0 ± 1.1	5.22 ± 0.16	1.34 ± 0.05	0.45 ± 0.03	0.83 ± 0.04	1.8 ± 0.3	24.9 ± 10.6
		50	31.3 ± 1.5	4.88 ± 0.22	1.44 ± 0.05	0.42 ± 0.03	1.02 ± 0.11*	1.1 ± 0.3*	53.7 ± 10.9*

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n=10 animais/grupo).

\* P < 0.01 comparado com o grupo controle (DMSO 4%), analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.



**Figura 21** – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos Swiss machos tratados com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* durante 7 dias consecutivos com doses de 10 e 25 mg/kg/dia via intraperitoneal ou 25 e 50 mg/kg/dia via oral por gavagem. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo. \* P < 0.05 comparado ao controle negativo por *Log-rank* (chi-quadrado).

#### 4.6.1 Leucograma

As modificações evidenciadas no leucograma do sangue periférico dos animais tratados correspondem tanto a uma diminuição no número total de leucócitos no grupo 5-FU ( $2.6 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ), um reflexo da redução do número de monócitos ( $0.1 \pm 0.01 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ), neutrófilos ( $0.1 \pm 0.002 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ) e linfócitos ( $2.4 \pm 0.2 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ), quanto ao aumento de neutrófilos ( $5.0 \pm 0.3 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ) e redução de linfócitos ( $2.0 \pm 0.1 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ) nos animais tratados com a FC 25 mg/kg/dia i.p. (**Tabela 8**, P < 0.01), sendo que neste último grupo não houve alteração nos leucócitos totais em comparação ao controle ( $8.8 \pm 0.6 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ) devido a uma compensação na contagem geral (P > 0.05).

**Tabela 8** – Alterações no leucograma do sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* durante 7 dias consecutivos nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia via intraperitoneal ou 25 e 50 mg/kg/dia via oral por gavagem. O controle negativo foi tratado com o veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia) foi usado como controle positivo.

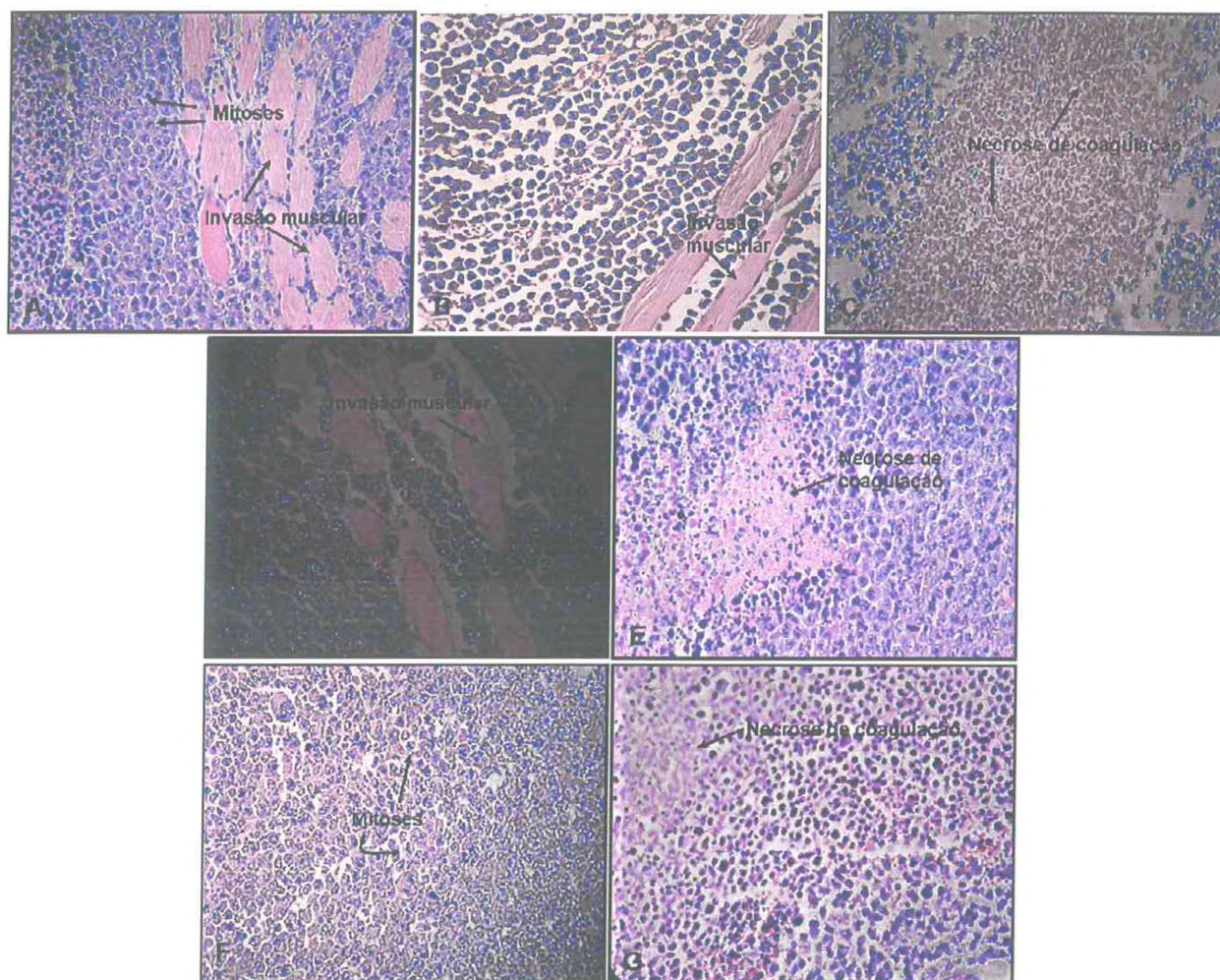
Substância	Dose (mg/kg/dia)	Leucócitos totais ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Contagem diferencial de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )				
			Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	
Intraperitoneal	Controle	-	$8.8 \pm 0.6$	$0.1 \pm 0.01$	$4.7 \pm 0.7$	$3.7 \pm 0.5$	$0.28 \pm 0.1$
	5-FU	25	$2.6 \pm 0.1^*$	$0.0 \pm 0.0$	$2.4 \pm 0.2^*$	$0.1 \pm 0.002^*$	$0.1 \pm 0.01^*$
	FC	10	$7.2 \pm 0.3$	$0.0 \pm 0.0$	$3.9 \pm 0.1$	$3.0 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.1$
		25	$7.3 \pm 0.7$	$0.1 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.1^*$	$5.0 \pm 0.3^*$	$0.3 \pm 0.1$
Oral	Controle	-	$6.5 \pm 0.9$	$0.1 \pm 0.1$	$3.7 \pm 0.9$	$2.5 \pm 0.4$	$0.2 \pm 0.1$
	FC	25	$8.4 \pm 0.8$	$0.2 \pm 0.1$	$4.1 \pm 0.4$	$3.7 \pm 0.5$	$0.4 \pm 0.1$
		50	$6.9 \pm 0.6$	$0.2 \pm 0.1$	$3.4 \pm 1.1$	$2.8 \pm 0.6$	$0.4 \pm 0.1$

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. (n=10 animais/grupo).

\*  $P < 0.01$  comparado com o grupo controle (DMSO 4%), analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.6.2 Morfologia Tumoral

Os tumores dos animais do grupo controle negativo (i.p. e oral, **Figuras 22A e 22B**) e dos grupos tratados com a FC 10 mg/kg/dia i.p. e 25 mg/kg/dia oral (**Figuras 22D e 22F**) mostraram características de neoplasia maligna constituída por células redondas e poliédricas com anisocariose, binucleação, freqüentes mitoses e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear, além de extensas áreas de invasão muscular e focos de necrose de coagulação. As análises da massa tumoral dos grupos que receberam 5-FU (**Figura 22C**) e FC 25 mg/kg/dia i.p. (**Figura 22E**) e 50 mg/kg/dia oral (**Figura 22G**) revelaram, como descrito acima, morfologia típica de células neoplásicas, embora tenham sido observadas raras mitoses e áreas de necrose de coagulação mais frequentes que nos outros grupos.



**Figura 22** – Morfologia de células da linhagem tumoral Sarcoma 180 extraídas de camundongos Swiss machos adultos após tratamento via intraperitoneal (10 e 25 mg/kg/dia, Figuras D e E, respectivamente) ou oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia, Figuras F e G, respectivamente) durante 7 dias consecutivos com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia, Figura C) foi usado como controle positivo. Coloração por Hematoxilina/Eosina. Microscopia óptica, 400x.

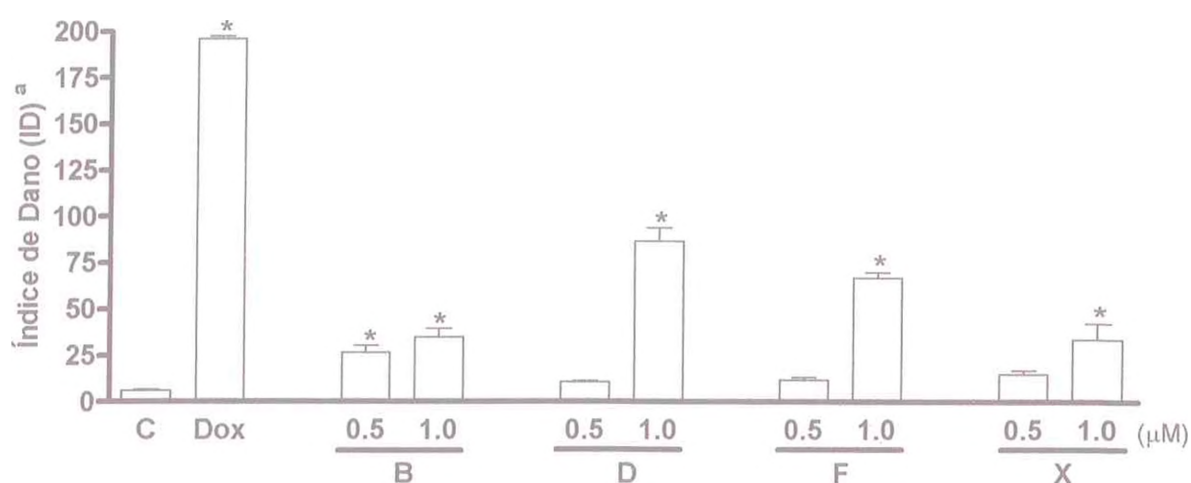
## 4.7 Toxicidade da Fração rica em Casearinas

### 4.7.1 Genotoxicidade *in vitro* em PBMC

O potencial genotóxico *in vitro* em PBMC após 24 h de exposição foi avaliado através do ensaio do Cometa Alcalino. Para fins de análise do grau de dano às moléculas de DNA, os resultados foram expressos em escores de ID, o qual foi calculado 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). Todas as substâncias analisadas *in vitro* induziram danos ao DNA das células mononucleares (**Figura 23**,  $P < 0.01$ ). Se por um lado a molécula Cas B

aumentou a migração do DNA, por conseguinte, elevou o ID desde a menor concentração estudada [0.5  $\mu$ M (26.5  $\pm$  4.0), 1  $\mu$ M (35.0  $\pm$  4.8)], não revelando, pois, dano dependente da concentração, por outro, as moléculas Cas D, Cas F e Cas X mostraram resultados significantes apenas na concentração de 1  $\mu$ M (87.1  $\pm$  7.1, 67.3  $\pm$  3.0 e 33.9  $\pm$  8.5), sendo a Cas X a substância que apresentou o menor potencial genotóxico ( $P < 0.01$ ).

Dox (0.6  $\mu$ M) mostrou ID duas vezes maior (196.3  $\pm$  1.3) que a Cas D 1  $\mu$ M, a molécula de maior potencial genotóxico *in vitro* dentre as amostras avaliadas. O controle negativo apresentou ID baixo (6.1  $\pm$  0.8).



**Figura 23** – Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do ensaio de Cometa Alcalino em células mononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) de voluntários humanos sadios. A cultura primária de PBMC foi tratada com casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F) e casearina X (Cas X) isoladas das folhas de *Casearia sylvestris* durante 24 h. O controle (C) recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 1.6 %). O quimioterápico doxorubicina (0.6  $\mu$ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores (n=2) correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes. \*  $P < 0.01$  comparado com o controle e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*. <sup>a</sup> Escores obtidos por 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).

#### 4.7.2 Toxicidade Aguda

Os animais foram observados durante 14 dias após uma administração única (i.p. ou oral) da FC (BRASIL, 2004b). Dos camundongos que receberam as maiores doses da FC, 3 dos 7 (100 mg/kg i.p.) e 4 dos 7 (400 mg/kg oral) estavam mortos ao final de 8 h após a administração. Todas as outras mortes aconteceram no intervalo de até 36 h após o tratamento. Os animais que morreram se apresentaram apáticos, embora outros sinais de

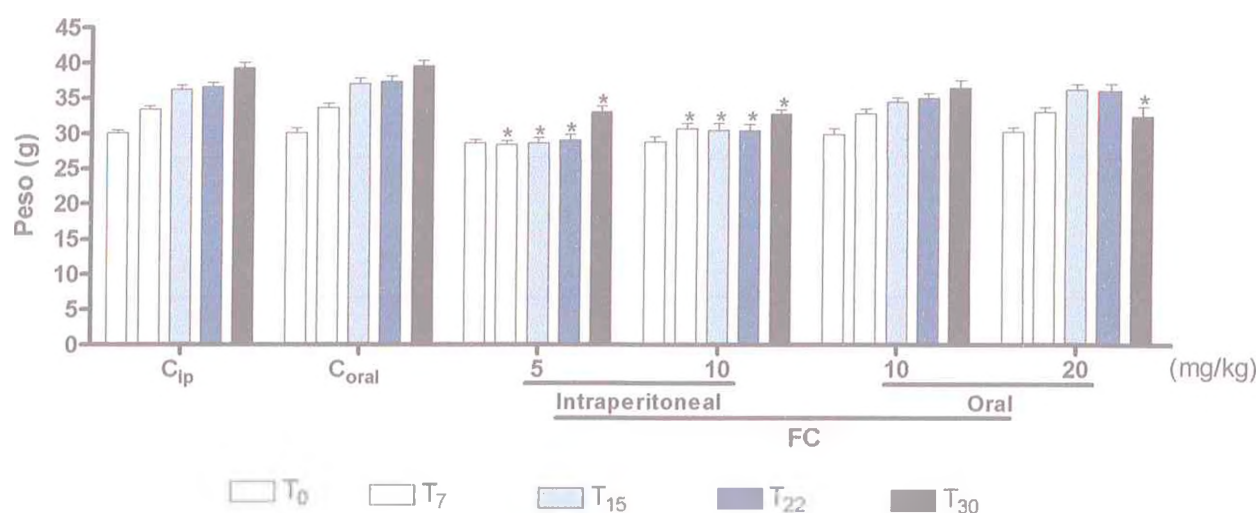


toxicidade antes da morte não tenham se tornado perceptíveis. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para a FC i.p. e oral, foram, respectivamente, 80.9 (65.9 - 97.9) e 267.1 (229.9 - 310.4) mg/kg de peso corpóreo.

### 4.7.3 Toxicidade Subcrônica

#### 4.7.3.1 Alterações Macroscópicas

O estudo da toxicidade subcrônica da FC foi realizada durante 30 dias consecutivos, período durante o qual os animais foram tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg/dia i.p. ou 10 e 20 mg/kg/dia via gavagem. A cada semana, todos os animais tratados foram pesados para verificação do ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle (DMOS 4 % i.p. ou oral). Logo após os primeiros sete dias (T<sub>7</sub>) de aplicação da FC na cavidade intraperitoneal dos animais, tanto a dose de 5 mg/kg/dia (28.4 ± 0.5 g) quanto a de 10 mg/kg/dia (30.6 ± 0.8 g) foram capazes de reduzir o crescimento dos animais quando comparados ao controle i.p. (C<sub>ip</sub>, 33.4 ± 0.4 g) (P < 0.01, **Figura 24**). Nos tempos seguintes (T<sub>15</sub>, T<sub>22</sub> e T<sub>30</sub>), o crescimento dos animais manteve-se estatisticamente menor (P < 0.01) até o fim do tratamento em ambas as doses administradas via i.p., fato esse que refletiu no menor ganho de peso corpóreo mensal pelos animais tratados com as doses de 5 mg/kg/dia (4.4 ± 0.4 g) e de 10 mg/kg/dia (3.9 ± 0.6 g), enquanto o controle ganhou 9.2 ± 0.4 g (**Tabela 9**). Achado semelhante ocorreu com a dose oral de 20 mg/kg/dia, a qual também diminuiu o ganho de peso (2.2 ± 0.8 g; controle ganhou 9.6 ± 0.7 g), embora o crescimento dos animais tenha sido prejudicado apenas na última semana de administração, uma vez que o peso médio do grupo T<sub>30</sub> foi de 32.4 ± 1.4 g e grupo controle oral (C<sub>oral</sub>=T<sub>30</sub>) pesou, em média, 39.6 ± 0.7 g (P < 0.01). Por outro lado, a dose oral de 10 mg/kg/dia não alterou nem o crescimento nem o ganho de peso dos animais (P > 0.05).



**Figura 24** – Avaliação do crescimento de camundongos Swiss machos adultos durante o tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) com a Fração rica em Caseínas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle (C) recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). Durante o tratamento, os animais foram pesados semanalmente. T<sub>0</sub>=Tempo 0 (início do tratamento); T<sub>7</sub>= sétimo dia; T<sub>15</sub>= décimo quinto dia; T<sub>22</sub>=vigésimo segundo dia; T<sub>30</sub>=trigésimo dia (fim do tratamento). Os valores correspondem à média ± E.P.M., n=10 animais/grupo. \* P < 0.01 comparado ao controle (DMSO 4%), analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

Após a dissecação dos animais, a análise do peso relativo úmido de seis órgãos (fígado, rins, baço, estômago, coração e pulmões) revelou que o fígado ( $4.73 \pm 0.31$  g) e o baço ( $0.57 \pm 0.10$  g) do grupo FC 10 mg/kg/dia i.p. aumentaram de maneira significativa enquanto o coração ( $0.36 \pm 0.01$  g) reduziu de tamanho em ambas as doses aplicadas intraperitonealmente (P < 0.01, **Tabela 9**). Em relação ao tratamento oral, ambas as doses (10 e 20 mg/kg/dia,  $1.30 \pm 0.06$  e  $1.11 \pm 0.11$ g, respectivamente) foram capazes de aumentar o peso relativo do estômago em comparação ao controle ( $0.73 \pm 0.07$  g, P < 0.01).

**Tabela 9** – Efeitos da Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos tratados via intraperitoneal (10 e 25 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos. O controle negativo recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %).

	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Ganho de Peso Corpóreo (g)	Figado	Rins	Baço	Estômago	Coração	Pulmões
				Peso relativo (g/100g)					
Intraperitonea	Controle	-	9.2 ± 0.4	4.02 ± 0.07	1.41 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.82 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.04
	Fração	5	4.4 ± 0.4*	3.95 ± 0.29	1.27 ± 0.06	0.40 ± 0.06	0.99 ± 0.12	0.36 ± 0.01*	0.39 ± 0.03
	Casearina (FC)	10	3.9 ± 0.6*	4.73 ± 0.31*	1.42 ± 0.10	0.57 ± 0.10*	0.98 ± 0.05	0.36 ± 0.01*	0.45 ± 0.05
Oral	Controle	-	9.6 ± 0.7	4.05 ± 0.16	1.36 ± 0,07	0.19 ± 0.02	0.73 ± 0.07	0.41 ± 0.02	0.47 ± 0.04
	Fração	10	6.6 ± 1.3	3.81 ± 0.12	1.30 ± 0.05	0.20 ± 0.02	1.30 ± 0.06*	0.35 ± 0.01	0.41 ± 0.03
	Casearina (FC)	20	2.2 ± 0.8*	3.73 ± 0.14	1.38 ± 0.05	0.19 ± 0.02	1.11 ± 0.11*	0.45 ± 0.04	0.51 ± 0.03

Os valores correspondem à média ± E.P.M., (n=10 animais/grupo).

\* P < 0.01 comparado com o grupo controle (DMSO 4%) e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

#### 4.7.3.2 Alterações Microscópicas – Histopatologia

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (i.p. ou oral) apresentaram sinais de baixa toxicidade: fígado com discreta tumefação celular de hepatócitos, leve congestão portal e da veia centrolobular, acúmulo de pigmentos de hemossiderina e leve hiperplasia das células de Kupffer (**Figuras 25A e 25B**); rins com discreta tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais e distais, hemorragia focal, glomerular e discreta por entre os túbulos (**Figuras 26A e 26B**); baço com folículos linfóides definidos, nítida visualização das polpas vermelha e branca, presença de pigmentos de hemossiderina e numerosos megacariócitos (**Figuras 27A e 27B**); corações com fibras musculares cardíacas transversais e longitudinais, sem alterações histológicas, visualização de discos intercalares e núcleos centrais (**Figuras 28A e 28B**); pulmões com bronquíolos e espaços alveolares visíveis, focos de vasos sanguíneos ectásicos e de hemorragia provavelmente associados ao procedimento de sacrifício (**Figuras 29A e 29B**). Com relação ao estômago, percebeu-se a ausência de estrias hemorrágicas, a região da cárdia com revestimento escamoso queratinizado e fácil visualização de células parietais e principais, com mucosa e submucosa normais (**Figuras 30A e 30B**).

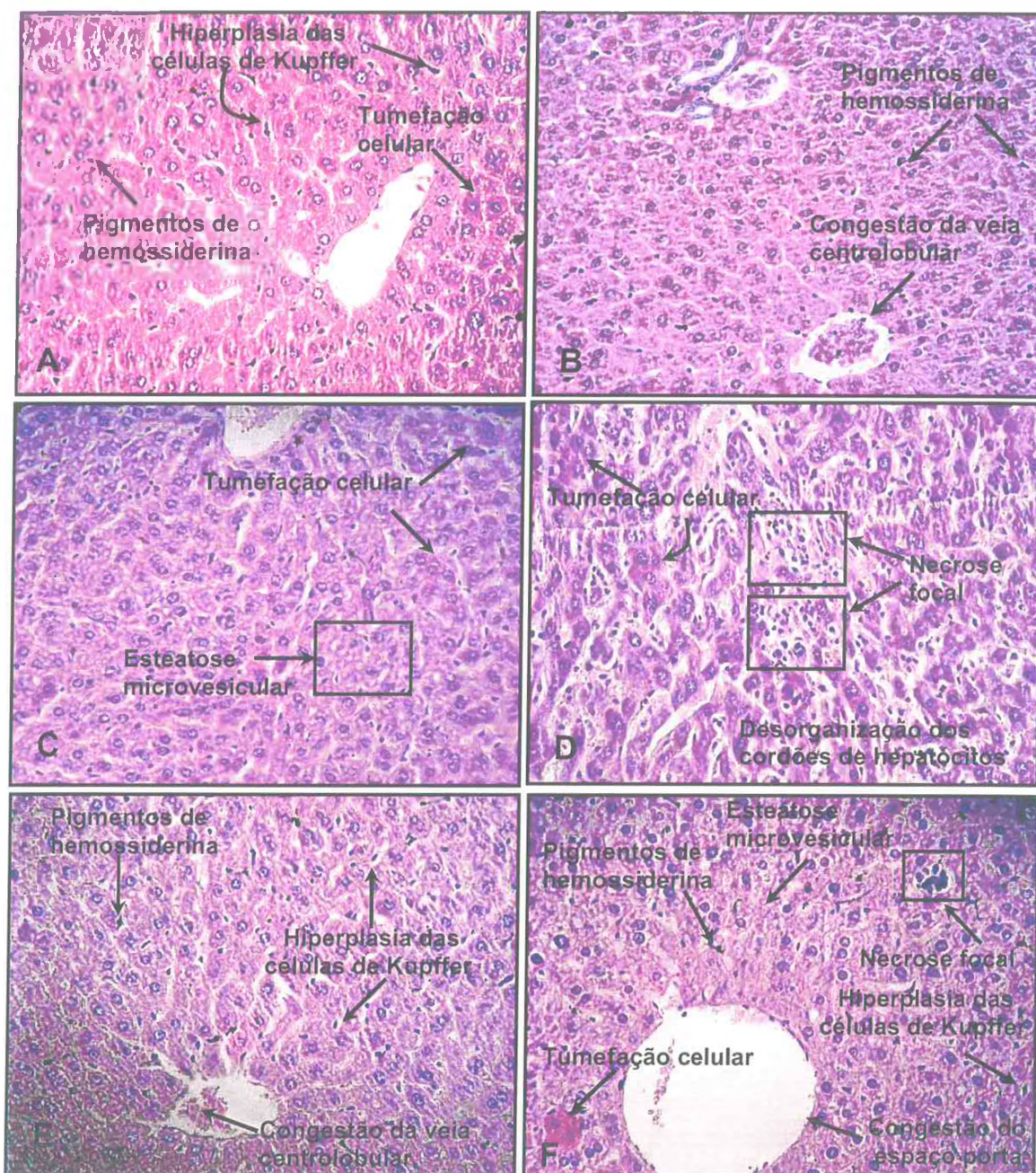
A análise microscópica do fígado dos animais tratados revelou desde uma moderada (5 mg/kg/dia i.p., **Figura 25C**) à intensa tumefação celular de hepatócitos (10 mg/kg/dia i.p.; 10 e 20 mg/kg/dia oral, **Figuras 25D, 25E e 25F**, respectivamente), congestão portal e da veia centrolobular, acúmulo de pigmentos de hemossiderina e hiperplasia das células de Kupffer (em todas as doses avaliadas). Com exceção da menor dose i.p. (5 mg/kg/dia), todas as outras doses causaram o surgimento de focos inflamatórios no parênquima ou estroma do tecido hepático, embora áreas de necrose focal com presença de granulócitos neutrófilos polimorfonucleares tenham sido encontradas apenas nas duas maiores doses (10 mg/kg/dia i.p. e 20 10 mg/kg/dia i.p. oral). Uma desorganização dos cordões de hepatócitos indicando morte celular seguida de regeneração foi extensivamente detectada na dose de 10 mg/kg/dia i.p. O acúmulo de pequenas gotículas de lipídios no citoplasma dos hepatócitos (esteatose microvesicular) foi encontrado nos grupos que receberam 5 mg/kg/dia i.p. e 20 mg/kg/dia oral da substância teste (**Figuras 25C e 25F**, respectivamente).

Todos os grupos tratados com a FC mostraram moderada (5 e 10mg/kg/dia i.p., **Figuras 26C e 26D**, respectivamente) à intensa tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais e distais dos rins (10 e 20mg/kg/dia oral, **Figuras 26E e 26F**, respectivamente), além de hemorragia tubular e glomerular e presença de cilindros hialinos. Extensas áreas de necrose com coleções de granulócitos neutrófilos polimorfonucleares consistentes com abscesso (5 mg/kg/dia i.p., **Figura 26C**) e focos de necrose nefrotóxica do epitélio tubular também foram encontrados (10 mg/kg/dia i.p e 20 mg/kg/dia oral, **Figura 26D e 26F**,

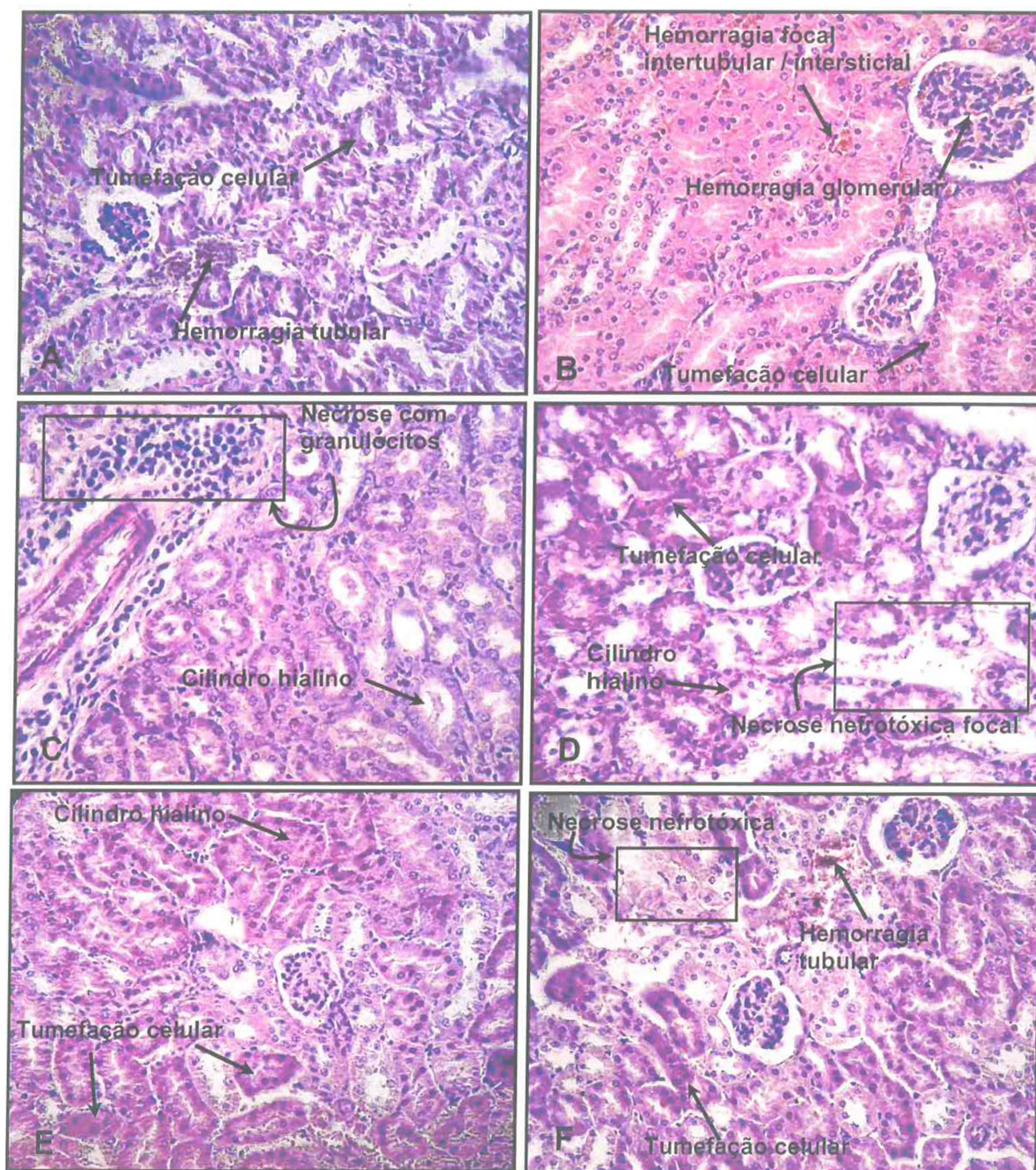
respectivamente). Os baços dos animais tratados não mostraram grandes alterações quando comparados ao grupo controle, embora todos os grupos tratados tenham revelado leve congestão da polpa vermelha e desorganização dos folículos linfóides, principalmente nas duas maiores doses estudadas (**Figura 27D e 27F**). Em relação ao coração, embora o tratamento i.p. tenha favorecido a diminuição do seu peso relativo, os exames microscópicos revelaram morfologia tecidual normal, muito semelhante ao respectivo controle e sem sinais de cardiotoxicidade (**Figuras 28C, 28D, 28E e 28F**).

Os pulmões de todos os tratados, assim como os controles, apresentaram sacos alveolares bem delimitados, integridade do epitélio dos bronquíolos do tipo pseudoestratificado colunar ciliado, alguns vasos sanguíneos dilatados e pequenos pontos hemorrágicos certamente associados às técnicas cirúrgicas do sacrifício (**Figuras 29C, 29D, 29E e 29F**). No entanto, os grupos administrados via i.p. (5 e 10 mg/kg/dia, **Figuras 29C e 29D**, respectivamente) exibiram alguns focos de coleções perivasculares de infiltrado inflamatório constituídos por granulócitos neutrófilos.

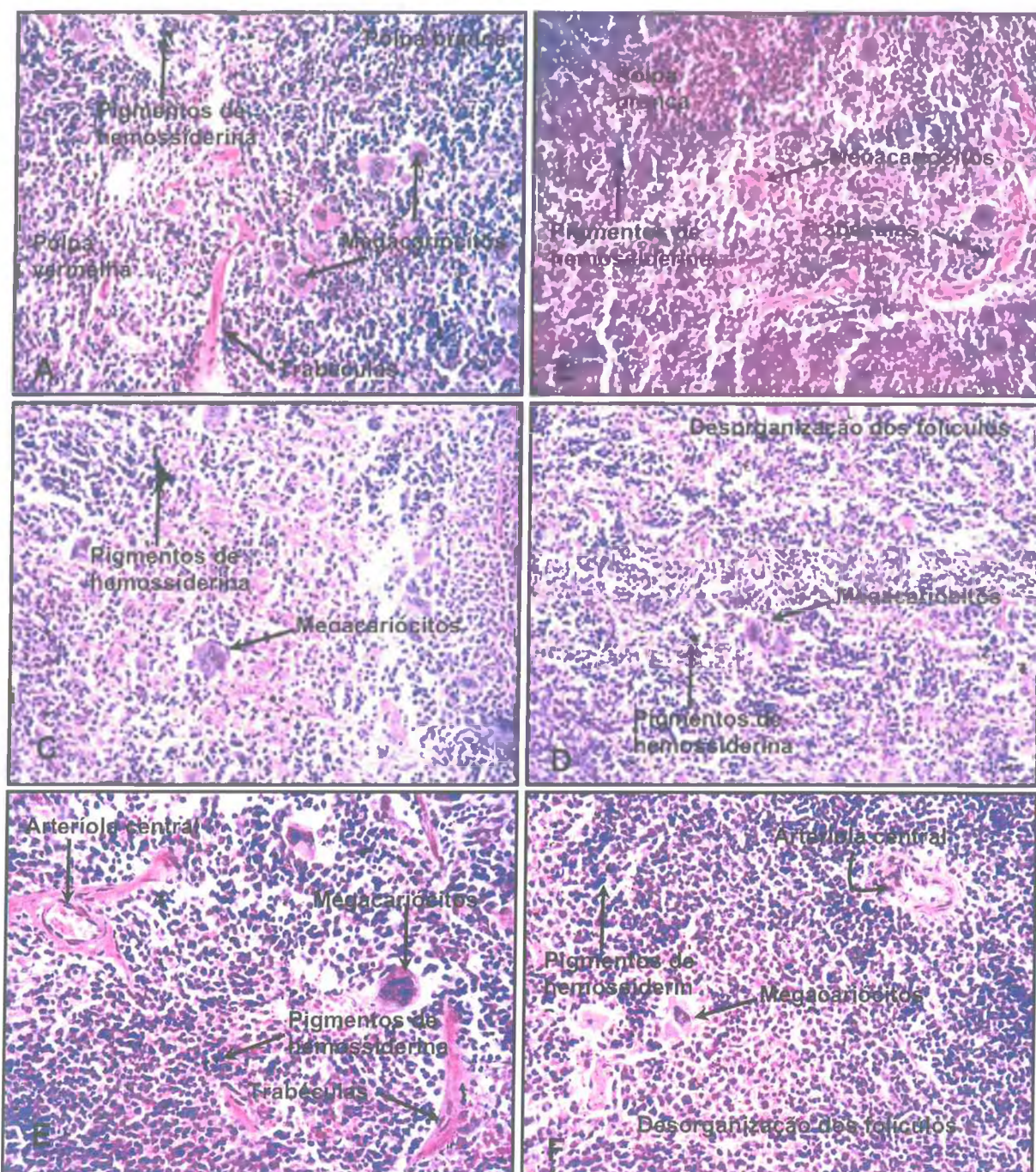
Os estômagos não mostraram alterações macro ou microscópicas em comparação aos seus respectivos controles negativos, todos exibindo uma mucosa pregueada, íntegra e sem focos hemorrágicos e/ou inflamatórios. Células parietais e principais morfologicamente normais estavam presentes no corpo, indicando que a função secretora estomacal de ácido clorídrico e pepsinogênio certamente não foi afetada pelo tratamento (**Figura 30**).



**Figura 25** – Análise histológica do fígado de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D, respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Caseínas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x.

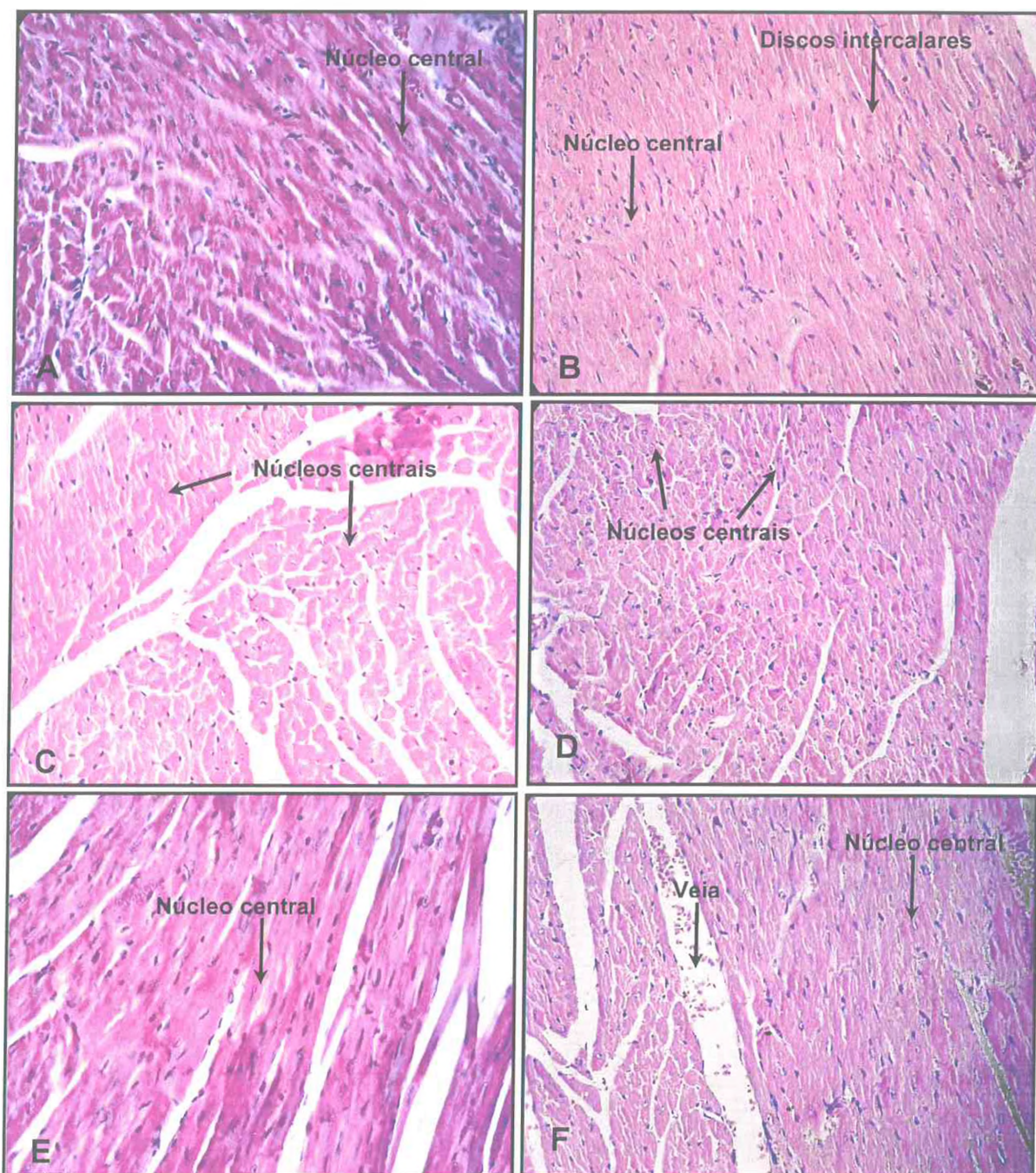


**Figura 26** – Análise histológica dos rins de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D, respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x.

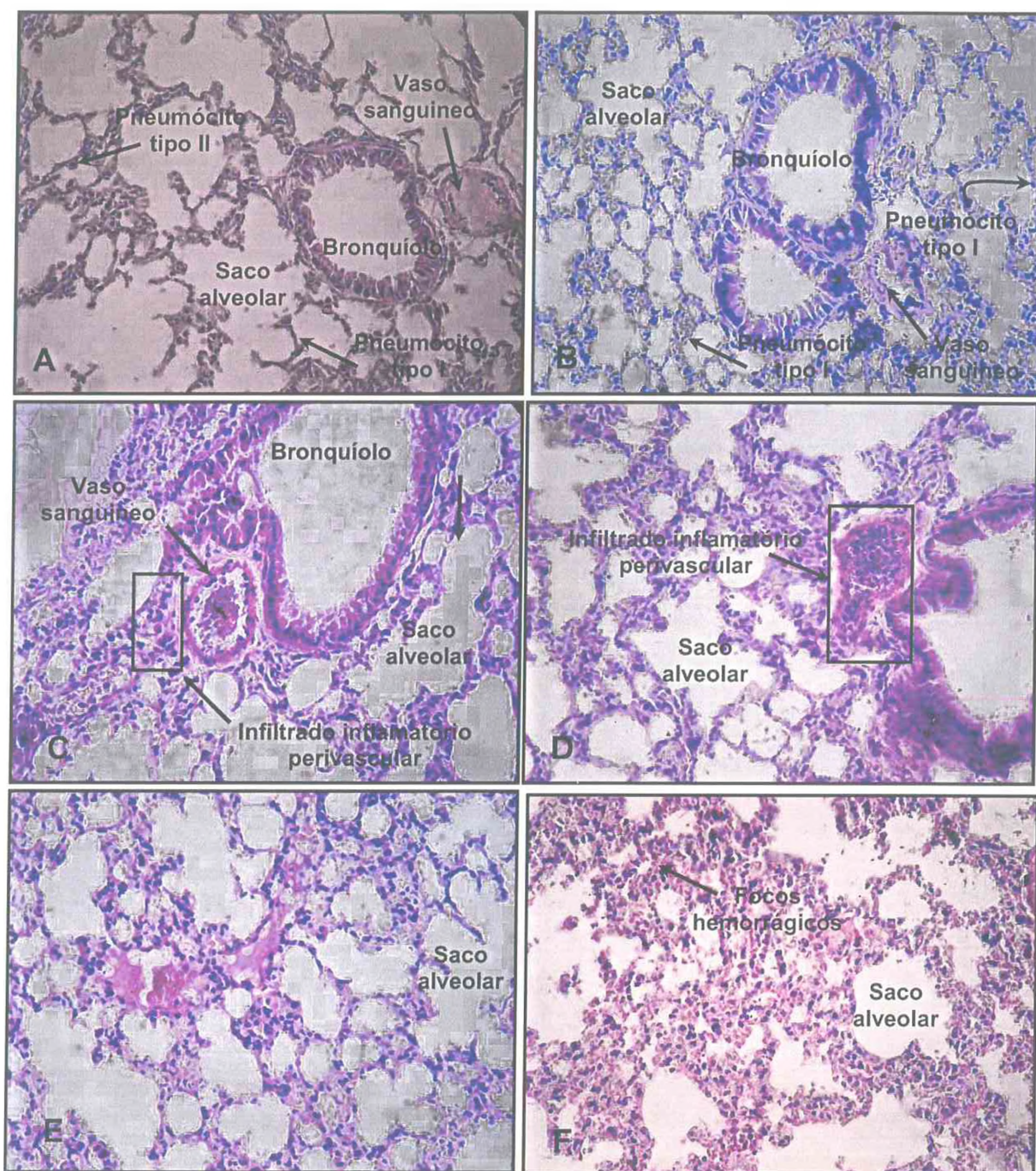


**Figura 27** – Análise histológica do baço de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D, respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x.

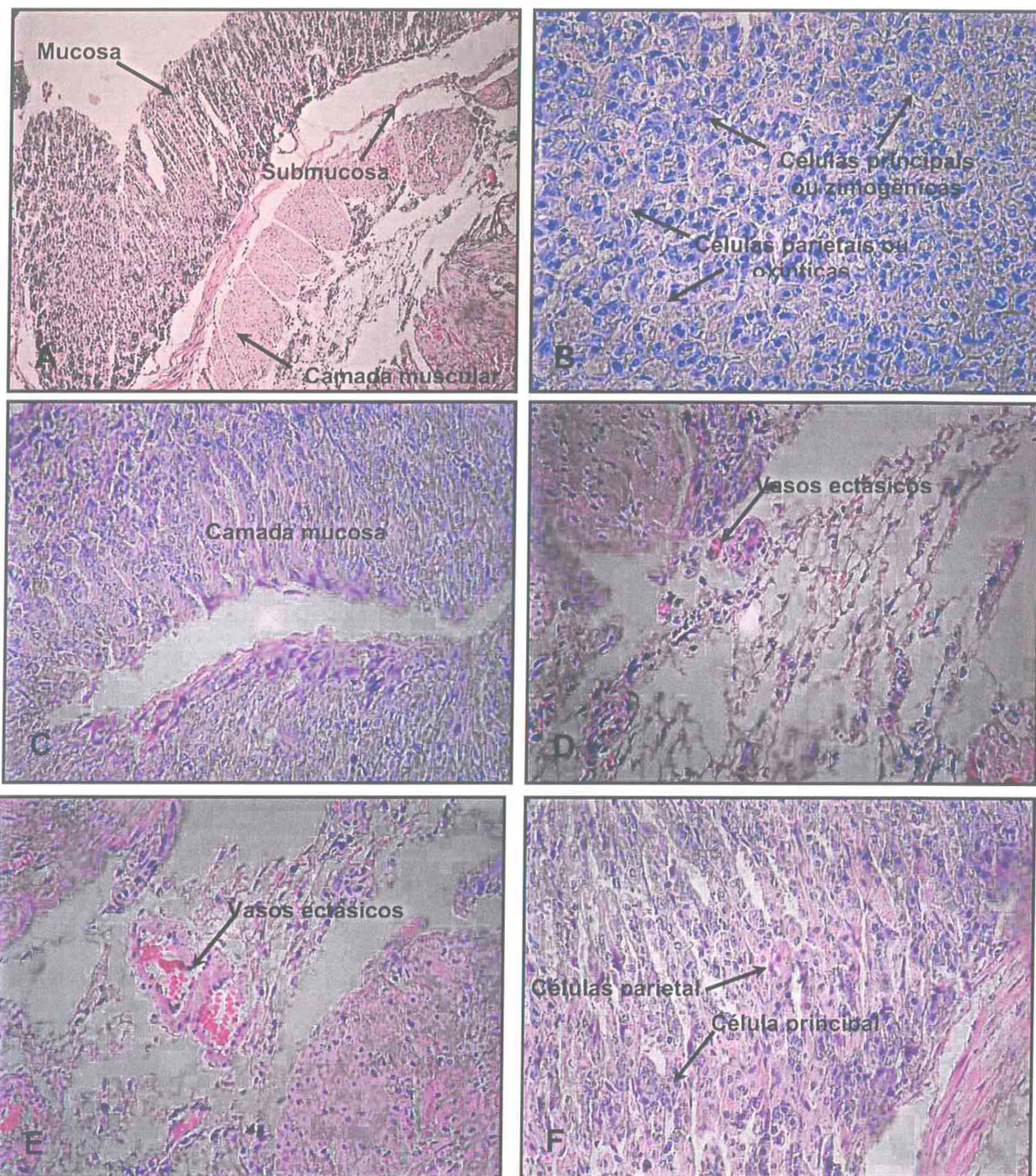




**Figura 28** – Análise histológica do coração de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x.



**Figura 29** – Análise histológica dos pulmões de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D, respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x.



**Figura 30** – Análise histológica do estômago de camundongos Swiss machos adultos após tratamento subcrônico de 30 dias via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia, Figuras C e D, respectivamente) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia, Figuras E e F, respectivamente) com a Fração rica em Caseínas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 % aplicado via i.p. e oral, Figuras A e B, respectivamente). Coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). Microscopia óptica, 400x; exceção para a letra A que representa uma fotografia com aumento de 100x.

#### 4.7.3.3 Alterações Funcionais Bioquímicas e Hematológicas

Os parâmetros bioquímicos séricos dos animais após tratamento de 4 semanas estão descritos na **Tabela 10**. Dentre os analitos avaliados, foi encontrado aumento significativo de ALT ( $73.0 \pm 14.0$  U/L) e queda dos níveis de albumina ( $1.57 \pm 0.1$  g/dL), fosfatase alcalina ( $34.2 \pm 4.3$  U/L), glicose ( $78.2 \pm 11.6$  mg/dL) somente no grupo tratado com FC 10 mg/kg/dia i.p. quando comparados ao controle ( $37.4 \pm 2.9$  U/L,  $1.78 \pm 0.1$  g/dL,  $63.8 \pm 4.5$  U/L e  $112.5 \pm 7.6$  mg/dL, respectivamente) ( $P < 0.01$ ). Por outro lado, o colesterol total diminuiu em ambas as doses i.p. testadas (5 e 10 mg/kg/dia,  $115.2 \pm 12.6$  e  $121.8 \pm 9.4$  mg/dL, respectivamente) ( $P < 0.01$ ). Os animais que receberam tratamento oral via gavagem com a FC mostraram somente redução da fosfatase alcalina sérica na dose de 20 mg/kg/dia ( $53.4 \pm 5.5$  U/L) em comparação ao controle ( $88.6 \pm 8.0$  U/L).

Semelhantemente às alterações encontradas no tratamento antitumoral de 7 dias, os exames hematológicos realizados a partir do sangue periférico detectaram mudanças significativas apenas nos animais tratados via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia,  $P < 0.01$ ). Ambas as doses da FC favoreceram a redução dos eritrócitos ( $7.8 \pm 0.2$  e  $7.7 \pm 0.2 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), do hematócrito ( $40.9 \pm 1.5$  e  $39.1 \pm 0.9$  %), da hemoglobina ( $11.6 \pm 0.3$  e  $11.6 \pm 0.6$  g/dL) e do percentual de linfócitos ( $56.8 \pm 2.1$  e  $37.8 \pm 2.5$  %) quando comparados ao controle que recebeu apenas DMSO 4 % ( $8.8 \pm 0.3 \times 10^6/\mu\text{L}$ ,  $49.2 \pm 2.2$  %,  $14.1 \pm 0.5$  g/dL e  $84.8 \pm 1.6$  %, respectivamente) (**Tabela 11**). Enquanto isso ocorreu elevação do número de leucócitos segmentados ( $38.4 \pm 2.1$  e  $56.2 \pm 4.1$  %) e do RDW ( $22.4 \pm 1.9$  e  $19.4 \pm 1.3$  %) quando comparados com o controle (leucócitos segmentados:  $12.2 \pm 0.9$  %; RDW:  $13.4 \pm 0.5$  %) após a administração de 5 e 10 mg/kg/dia, respectivamente.

**Tabela 10** – Perfil bioquímico sérico do sangue periférico de camundongos Swiss machos adultos tratados com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos. O controle foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %).

Parâmetros Bioquímicos	Tratamento intraperitoneal			Tratamento oral		
	Controle	FC		Controle	FC	
		5 mg/kg	10 mg/kg		10 mg/kg	20 mg/kg
Albumina (g/dL)	1.78 ± 0.1	1.75 ± 0.1	1.57 ± 0.1*	1.95 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1
AST (U/L)	140.4 ± 5.3	177.6 ± 7.7	170.2 ± 17.1	126.0 ± 5.0	145.8 ± 6.9	140.2 ± 10.7
ALT (U/L)	37.4 ± 2.9	67.0 ± 6.4	73.0 ± 14.0*	43.0 ± 6.4	47.8 ± 4.4	43.8 ± 2.1
Fosfatase Alcalina (U/L)	63.8 ± 4.5	50.4 ± 5.9	34.2 ± 4.3*	88.6 ± 8.0	88.6 ± 5.1	53.4 ± 5.5*
Colesterol Total (mg/dL)	162.6 ± 10.7	115.2 ± 12.6*	121.8 ± 9.4*	194.3 ± 9.9	177.6 ± 17.0	171.3 ± 11.8
Triglicérides (mg/dL)	161.6 ± 18.9	142.0 ± 27.8	149.8 ± 15.2	156.5 ± 11.0	176.5 ± 23.9	136.4 ± 38.7
BUN (mg/dL)	37.0 ± 3.9	37.8 ± 5.4	32.6 ± 4.7	49.7 ± 6.9	43.6 ± 5.6	38.6 ± 5.9
Creatinina (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Glicose (mg/dL)	112.5 ± 7.6	96.9 ± 8.5	78.2 ± 11.6*	133.3 ± 9.2	145.6 ± 9.4	111.7 ± 12.5
Amilase (U/dL)	619.2 ± 4.8	628.8 ± 23.3	643.9 ± 22.2	619.2 ± 15.1	582.5 ± 11.4	589.4 ± 10.0

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n=10 animais/grupo).

\* P < 0.01 comparado ao controle (DMSO 4%) e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

AST, aspartato aminotransferase, também conhecida como TGO, transaminase glutâmico-oxaloacética; ALT, alanina aminotransferase, também conhecida como TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; BUN, uréia nitrogenada sanguínea (*Blood Urea Nitrogen*).

**Tabela 11** – Perfil hematológico do sangue periférico de camundongos albinos Swiss machos adultos tratados com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris* via intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos. O controle foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %).

Parâmetros Hematológicos	Tratamento intraperitoneal			Tratamento oral		
	Controle	FC		Controle	FC	
		5 mg/kg	10 mg/kg		10 mg/kg	20 mg/kg
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.8 $\pm$ 0.3	7.8 $\pm$ 0.2*	7.7 $\pm$ 0.2*	9.3 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.5
Hematócrito (%)	49.2 $\pm$ 2.2	40.9 $\pm$ 1.5*	39.1 $\pm$ 0.9*	50.0 $\pm$ 0.7	50.6 $\pm$ 0.8	50.4 $\pm$ 3.4
Hemoglobina (g/dL)	14.1 $\pm$ 0.5	11.6 $\pm$ 0.3*	11.6 $\pm$ 0.6*	14.3 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.2	15.1 $\pm$ 0.9
VCM (fL)	55.9 $\pm$ 1.7	52.5 $\pm$ 0.5	54.4 $\pm$ 2.3	53.6 $\pm$ 0.4	54.9 $\pm$ 0.3	55.8 $\pm$ 1.2
HCM (pg)	16.0 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.1	14.7 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 0.3	15.9 $\pm$ 0.2	15.9 $\pm$ 0.1
CHCM (g/dL)	28.7 $\pm$ 0.4	28.5 $\pm$ 0.5	27.9 $\pm$ 0.7	28.5 $\pm$ 0.4	29.0 $\pm$ 0.3	28.5 $\pm$ 0.5
Plaquetas ( $\mu\text{L}$ )	1.313 $\pm$ 44.7	1.200 $\pm$ 59.5	1.102 $\pm$ 66.3	1.261 $\pm$ 73.2	1.138 $\pm$ 95.7	1.241 $\pm$ 167.2
Leucócitos totais ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.7 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 1.2	6.6 $\pm$ 1.5	4.2 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 1.0
Segmentados (%)	12.2 $\pm$ 0.9	38.4 $\pm$ 2.1*	56.2 $\pm$ 4.1*	21.8 $\pm$ 2.2	17.0 $\pm$ 1.6	25.0 $\pm$ 2.9
Linfócitos (%)	84.8 $\pm$ 1.6	56.8 $\pm$ 2.1*	37.8 $\pm$ 2.5*	75.4 $\pm$ 1.9	79.2 $\pm$ 1.5	73.4 $\pm$ 3.5
Monócitos (%)	2.8 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.7	3.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 0.7
Eosinófilos (%)	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
RDW (%)	13.4 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 1.9*	19.4 $\pm$ 1.3*	17.3 $\pm$ 2.1	13.7 $\pm$ 1.0	14.6 $\pm$ 1.2

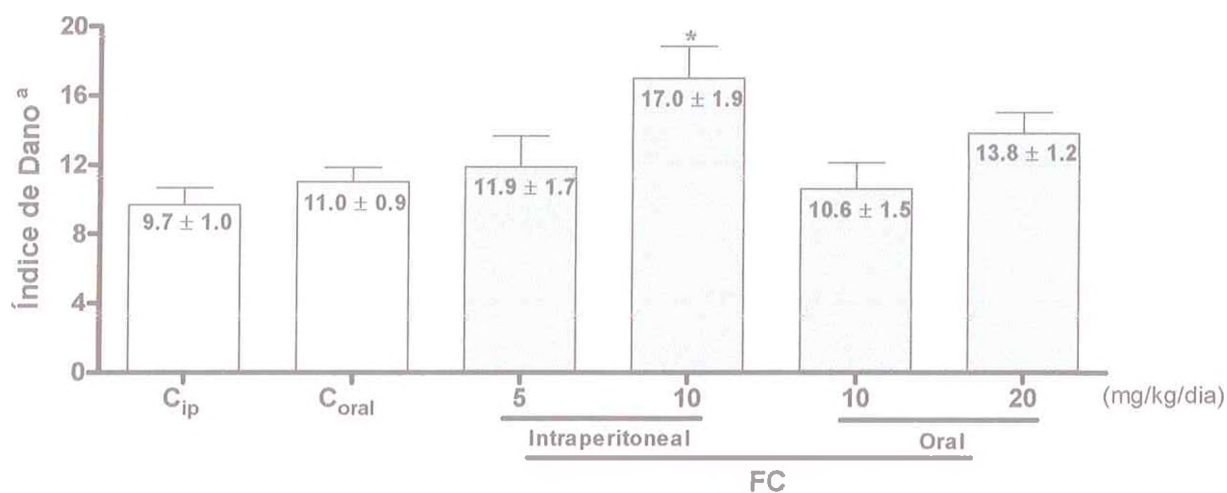
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. (n=10 animais/grupo).

\* P < 0.01 comparado ao controle (DMSO 4%) e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.

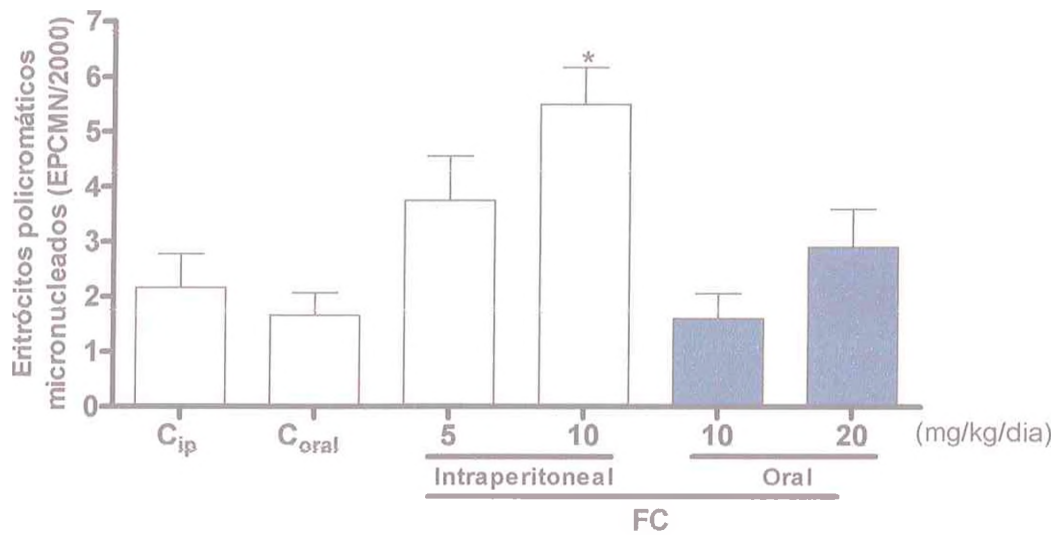
VCM, Volume Corpuscular Médio; HCM, Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW, variação da distribuição do tamanho eritrocitário (*Red cell Distribution Width*).

#### 4.7.3.4 Genotoxicidade *in vivo* e Danos Cromossômicos

O sangue coletado dos animais tratados com a FC também foi submetido ao ensaio do cometa com o objetivo de detectar quebras das moléculas de DNA de PBMC. Como mostrado na **figura 31**, apenas a dose de 10 mg/kg/dia aplicada na cavidade peritoneal foi capaz de aumentar significativamente o ID ( $17.0 \pm 1.9$ ) quando comparada ao controle i.p. ( $9.7 \pm 1.0$ ) ( $P < 0.05$ ). Semelhantemente, alterações cromossômicas representadas na forma de MNs foram encontradas nas hemácias isoladas da medula óssea de camundongos tratados com FC 10 mg/kg/dia i.p. ( $5.5 \pm 0.7$  EPCMN/2000 células) em comparação ao controle ( $2.2 \pm 0.6$  EPCMN/2000 células) ( $P < 0.01$ , **Figura 32**).

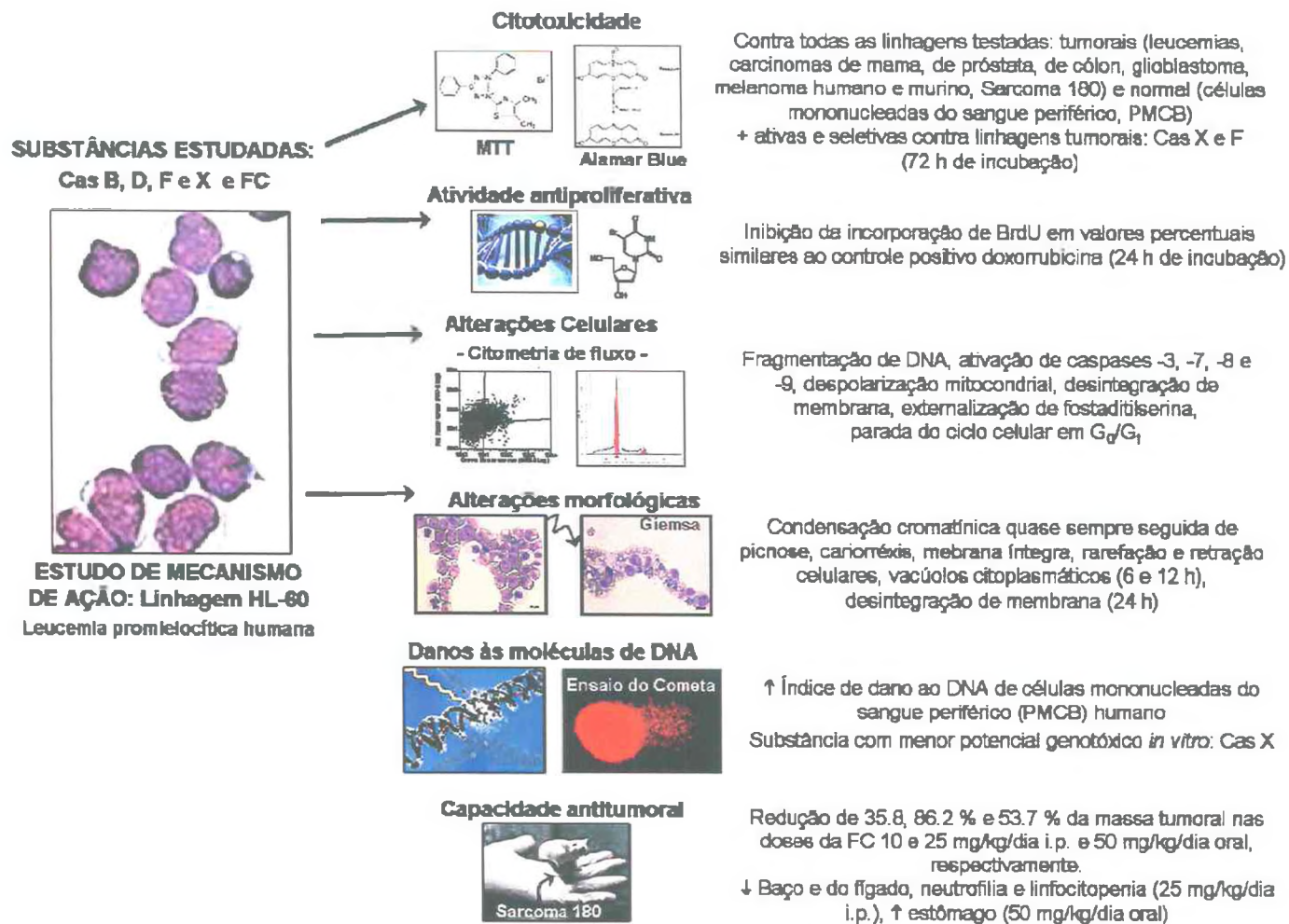


**Figura 31** – Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do ensaio de cometa alcalino em células mononucleares isoladas do sangue periférico (PBMC) de camundongos Swiss machos adultos (n=10 animais/grupo) após tratamento intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle (C) recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). \*  $P < 0.05$  comparado com o controle (DMSO 4%) e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*. <sup>a</sup> 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).

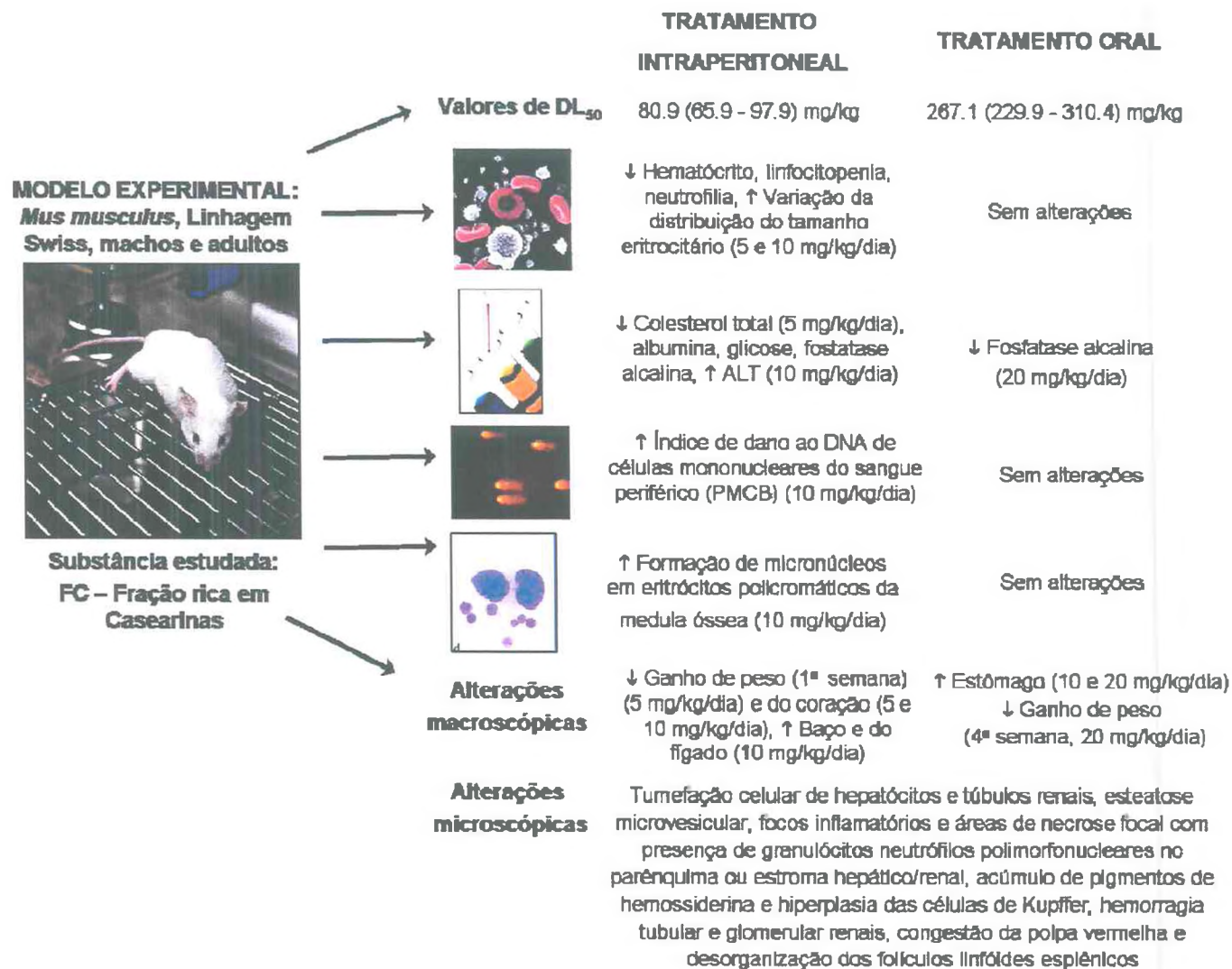


**Figura 32** – Números de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN/2000 células) observados na medula óssea de camundongos Swiss machos adultos (n=10 animais/grupo) após tratamento intraperitoneal (5 e 10 mg/kg/dia) ou oral por gavagem (10 e 20 mg/kg/dia) durante 30 dias consecutivos com a Fração rica em Casearinas (FC) isolada das folhas de *Casearia sylvestris*. O controle (C) recebeu veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). \* P < 0.01 comparado com o controle (DMSO 4%) e analisado por ANOVA seguido por *Student Newman-Keuls*.





**Figura 33** – Resumo dos resultados dos estudos de avaliação da atividade citotóxica e antitumoral dos diterpenos clerodânicos casearina B (Cas B), casearina D (Cas D), caseargrevina F (Cas F), casearina X (Cas X) e da Fração rica em Casearinas (FC) isolados das folhas da planta *Casearia sylvestris*.



**Figura 34** – Resumo dos resultados dos estudos de toxicidade aguda e subcrônica (30 dias de tratamento) da Fração rica em Casearinas (FC) obtida das folhas da planta *Casearia sylvestris* em camundongos Swiss.

# DISCUSSÃO

---

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade Citotóxica e Antitumoral

No último século, o desenvolvimento de agentes citotóxicos revolucionou a terapia anticâncer, pois o tratamento adjuvante com esses agentes tem demonstrado uma vantagem incontestável quando comparado ao tratamento tradicionalmente baseado na cirurgia e monoquimioterapia, tornando possível a cura de neoplasias como leucemia aguda infantil, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e tumores de células germinativas. O (SOUZA et al., 2007; ISMAEL et al., 2008). Porém, apesar destes avanços e do desenvolvimento da química combinatória, da modelagem molecular e de outras técnicas químicas de síntese usadas pelas indústrias farmacêuticas e instituições de pesquisa, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora e a mortalidade proveniente das várias formas de câncer continua inaceitavelmente alta, uma vez que do total de 7,9 milhões de mortes em 2007, 13 % foram ocasionadas por doenças neoplásicas (BUTLER, 2004; WHO, 2009). Neste cenário, as plantas têm oferecido a oportunidade da descoberta de compostos com propriedades citotóxicas e antitumorais contra diferentes tipos histológicos de câncer, estando, inclusive, vários destes compostos, além de outros já aprovados para o tratamento, em estudos de fase clínica para a avaliação e compreensão de sua eficácia terapêutica, do seu mecanismo de ação e dos efeitos adversos (NEWMAN et al., 2003; CRAGG & NEWMAN, 2005).

Sabendo da importância farmacológica e popular da planta *Casearia sylvestris* e de que células de mamíferos em cultura são ferramentas muito utilizadas para avaliar a citotoxicidade de novos compostos (COSTA et al., 2008; BURIOL et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010), o presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade citotóxica por MTT de quatro diterpenos e de uma fração rica em casearinas (FC) isolados a partir das folhas da *C. sylvestris* frente a um painel de 14 linhagens tumorais.

Dentre as substâncias testadas, as casearinas B, D e X, caseargrevina F e a FC, destacou-se a Cas F, com valores de  $CI_{50}$  menores que 1  $\mu M$  contra todas as linhagens tumorais avaliadas e a atividade antileucêmica da Cas X ( $CI_{50} < 0.40 \mu M$ ), embora esta última tenha mostrado ser menos citotóxica contra a linhagem K-562 (8.93  $\mu M$ ), uma leucemia mielóide crônica resistente aos fármacos utilizados na clínica devido a uma alteração citogenética específica conhecida como cromossomo *Philadelphia* resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Esta translocação  $t(9;22)(q34;q11)$  justapõe o oncogene *ABL* (*Abelson Leukemia Virus*, cromossomo 9) ao gene *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*, cromossomo 22) (MELO et al., 2003). A proteína quimérica resultante da fusão gênica *BCR-ABL* apresenta uma atividade tirosina-quinase elevada, responsável pela transformação da célula progenitora hematopoética normal em

maligna e pela elevada resistência à morte celular independentemente do agente indutor graças à expressão da proteína tirosina-quinase BCR-ABL e a sua capacidade antiapoptótica pelo aumento da expressão da proteína Bcl-xL-49 e pela diminuição do Fas nas células malignas precursoras (DEININGER et al., 2000).

Nos últimos anos, houve um constante aumento do número de diterpenos clerodânicos isolados de plantas do gênero *Casearia* graças a estudos de fracionamento bioguiado, mostrando que muitos deles, especialmente os ricos em oxigênio, possuem propriedades contra diferentes tipos de células e microrganismos, sejam bactérias, fungos (CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; DA SILVA et al., 2008a), promastigotas de *Leishmania donovani* (MESQUITA et al., 2005), amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (ESPÍNDOLA et al., 2004; MESQUITA et al., 2005), cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina (MESQUITA et al., 2007) e linhagens humanas transformadas como colon (HCT-116), leucemias (HL-60, MOLT-4), ovário (A2780), próstata (PC-3), melanoma (MDA/MB-435) e glioblastoma (SF-295) (OBERLIES et al., 2002; HUANG et al., 2004; SHEN et al., 2004; VIEIRA-JUNIOR et al., 2009; WILLIAMS et al., 2007; SANTOS et al., 2010). A ação sobre células cancerosas também foi encontrada no óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* (DA SILVA et al., 2008c), cuja composição exhibe a presença de dois sesquiterpenos reconhecidamente citotóxicos:  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno (TATMAN & MO 2002; ESTEVES et al., 2005; SYLVESTRE et al., 2005).

A comparação estrutural das casearinas revela que as principais diferenças da atividade biológica envolvem substituições nas posições C-2, C-6, C-7, C-18 e C-19 do esqueleto diterpenóide ou hidroxilação ou O-metilação na posição 2. Além disso, a substituição mostra que o grupamento acila na posição 6 reduz marcadamente a capacidade citotóxica dos derivados (MORITA et al., 1991), indicando que o peso molecular do substituinte nesta posição é importante para a bioatividade. A atividade citotóxica da maioria dos diterpenos clerodânicos parece depender da formação de um anel diacetálico oxigenado pelos carbonos C-18 e C-19, o qual se constitui num arranjo de funcionalidade pouco visto em moléculas naturais e pode ser considerado como um dialdeído protegido (SANTOS et al., 2007). A hidrólise ácida ou outros fatores que causem a abertura do anel diacetálico oxigenado constituído pelos carbonos C-18 e C-19 levam à instabilidade molecular e perda da bioatividade dos clerodanos diterpênicos (WILLIAMS et al., 2007), como visto com a forma degradada da Cas X (Casearina X dialdeído), uma molécula que se mostrou incapaz de inibir a proliferação celular (SANTOS et al., 2010). O ácido hardviquíco, um clerodano sem anel diacetálico e com baixo potencial citotóxico, foi um dos primeiros diterpenos descobertos na planta *C. sylvestris* sem uma estrutura tipicamente oxigenada (SANTOS et al., 2007, 2010), sugerindo que o padrão de oxigenação estrutural também possa influenciar na ação citotóxica.

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 de todas as substâncias utilizando como modelo a linhagem HL-60, uma leucemia promielocítica aguda humana com predominância de neutrófilos muito utilizada como ferramenta farmacológica na pesquisa por moléculas com capacidade antiproliferativa (MILITÃO et al., 2006; COSTA et al., 2008; MARINHO-FILHO et al., 2010). Leucemias são a quinta maior causa de morte para homens e a sexta para mulheres, sendo o tipo de neoplasma mais mortal em pessoas com até 20 anos de idade. Embora muitas das atuais formas de tratamento tenham se revelado relativamente eficazes em alcançar a cura, a grande maioria dos fármacos usados no tratamento das leucemias apresentam graves efeitos colaterais (ACS, 2008).

Posteriormente, a fim de determinar o mecanismo responsável pelo efeito citotóxico determinado pelo ensaio do MTT, avaliou-se a habilidade das substâncias em inibir a síntese de DNA através do ensaio de BrdU após 24 h de incubação usando as concentrações correspondentes aos valores de  $CI_{50}$ . Todas as amostras avaliadas inibiram a incorporação de BrdU, reduzindo, no caso da Cas F e Cas X, a multiplicação celular em valores percentualmente semelhantes ao controle positivo Dox, corroborando, portanto, os resultados obtidos com o MTT. A incorporação celular do BrdU, um análogo da timidina, durante a fase S do ciclo celular, tem sido extensivamente aplicada nas pesquisas biomédicas para a identificação de fármacos com atividade antiproliferativa, uma vez que é um método *in vitro* não radioativo, imunocitoquímico e confiavelmente capaz de determinar o percentual de divisão celular (RIBEIRO et al., 2003; MILITÃO et al., 2006; COSTA et al., 2008).

Subseqüentemente ao estudo de inibição de síntese de DNA, alterações bioquímicas e morfológicas foram investigadas usando a citometria de fluxo e coloração por May-Grünwald-Giemsa com o intuito de determinar que tipo de morte celular estaria relacionado com a citotoxicidade das substâncias. Para esse fim, a citometria de fluxo utiliza um sistema para observar células individuais obtidas a partir de uma suspensão celular. Assim, uma população de células passa ao longo de tubos capilares, onde um sistema óptico registra o parâmetro que se deseja medir e alimenta um computador com os dados obtidos. Corantes fluorescentes específicos são utilizados para os componentes celulares que se deseja observar, permitindo o uso do citômetro de fluxo no diagnóstico das neoplasias e como uma poderosa ferramenta para a compreensão das alterações celulares causadas por compostos biologicamente ativos (SHAPIRO et al., 1995; MARINHO-FILHO et al., 2010).

Em geral, quando a morte é acionada por uma das possíveis vias de apoptose, diferentes fatores podem agir como desencadeadores, entre eles a ligação de moléculas a

receptores de membrana, fato que geralmente leva à ativação da via extrínseca da apoptose ou agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, proteínas mal enoveladas, privação de fatores de crescimento, baixas quantidades de nutrientes e níveis aumentados de EROS, os quais costumemente deflagram a via intrínseca (KUMAR et al., 2004; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004; RICCI & ZONG, 2006). Neste caso, as células apresentam, concomitantemente, integridade de membrana e elevadas taxas de fragmentação de DNA (DENECKER et al., 2001), tal como visto após tratamento das células HL-60 com as substâncias testes. Todos os clerodanos, além da FC, causaram fragmentação de DNA, quase sempre de maneira linear à concentração, embora a integridade de membrana tenha sofrido redução significativa apenas nas maiores concentrações testadas e após 12 ou 24 h de tratamento. A manutenção da integridade de membrana corrobora os resultados de Santos et al. (2010), que mostraram que a ação citotóxica da Cas B, D, F e X não se relaciona a danos na membrana celular, uma vez que nenhuma dessas moléculas lisou eritrócitos de camundongos até a concentração de 200 µg/mL. A ação farmacológica evidenciada pela fragmentação confirma os resultados obtidos por Carvalho et al. (1998), quando demonstraram que as casearinas G, S e T causaram danos ao genoma eucariote de cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* por acetilação das moléculas de DNA.

Como característica típica da apoptose, a fragmentação internucleossomal de DNA é, costumemente, atribuída às caspases, enzimas pertencentes à família das cisteínas proteases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que tem a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (STRASSER et al., 2000). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases-3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose. De acordo com seu papel na apoptose, as caspases podem ser classificadas em iniciadoras (-8, -9, -10) ou efetoras (-3, -6, -7) (BOATRIGT & SALVESEN, 2003). Foi verificado que ambas as moléculas Cas F e X, assim como o controle Dox reduziram o número de células viáveis, confirmando, assim os resultados obtidos após avaliação da integridade de membrana e aumentaram o surgimento de células apoptóticas iniciais e tardias, mostrando uma intensa ativação catalítica das caspases iniciadoras -8 e -9 e das caspases efetoras -3 e -7, além de interferirem no potencial transmembrânico mitocondrial, reduzindo-o. HUANG et al. (2004), ao avaliar a citotoxicidade de outros clerodanos diterpênicos, as caseamembrinas (A a F), em células PC-3, revelaram que a caseamembrina C é a mais ativa entre os seis diterpenos ( $\text{CI}_{50}$  de 0.5 µM), sendo esse composto capaz de ativar as caspases-8 e 9, indicando, como encontrado no presente estudo, o envolvimento das vias intrínseca e extrínseca no processo de morte celular e a convergência na ativação da caspase-3. A redução do potencial mitocondrial vista após a exposição aos diterpenos clerodânicos e a FC possivelmente sugere permeabilização da

membrana mitocondrial e liberação de citocromo c, o qual se liga a Apaf-1 para originar a forma cataliticamente ativa da caspase-9, que ativa a caspase-3, a mais importante caspase efetora (KUMAR et al., 2004; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004), uma DNase eficaz em clivar o DNA genômico entre nucleossomos, gerando fragmentos de 180-200 pares de base (pb) e de degradar as proteínas do aparelho mitótico nuclear e a laminina, o que determina a diminuição do núcleo e a picnose (HENGARTNER, 2000). Assim, através da citometria de fluxo, conseguiu-se quantificar o DNA hipodiplóide com a adição de PI às células permeabilizadas com triton X-100, onde o PI intercalou-se com o DNA e permitiu determinar o tamanho dos fragmentos de DNA como uma maneira de discriminar entre morte celular por apoptose (visualizado como sub-G1) e necrose (manutenção do conteúdo de DNA nuclear) (KRYSKO et al., 2008).

A fim de confirmar o tipo de morte celular, avaliou-se a externalização de PS, teste considerado padrão-ouro para a confirmação de apoptose. Células sanguíneas normais exibem assimetria fosfolipídica, com predominância de fosfatidilcolina e esfingomiéline na parte externa da membrana plasmática e fosfatidiletanolamina e PS na parte interna (KUMAR et al., 2004). Células apoptóticas mostram perda dessa assimetria aumentando a externalização de PS, como visto após o tratamento de células HL-60 com a Cas F e Cas X, embora, neste caso, tenha ocorrido somente após 24 h de incubação. Então, a PS pode ser detectada usando anexina V, uma proteína ligante de  $Ca^{2+}$  de 35 kDa com grande afinidade pela PS (VERMES et al., 1995).

Durante a apoptose, há um espaço separando a positividade para a PS e para o 7-AAD enquanto ambos os eventos coincidem nas células necróticas, fato visto nos gráficos tipo *dotplot* após tratamento com as casearinas F e X (dados não mostrados). Além desses achados, alterações morfológicas indicativas de morte celular por apoptose (cariorréxis, rarefação e retração nucleares e extensa formação de vacúolos no citoplasma) foram facilmente visualizadas por microscopia óptica nas células HL-60 tratadas com as substâncias testes, especialmente após 12 h de exposição. Já a desintegração da membrana plasmática foi uma particularidade tipicamente encontrada após 24 h de incubação, corroborando os resultados encontrados por citometria de fluxo após marcação com PI ou 7-AAD, sugerindo efeitos dose-dependentes condizentes com apoptose tardia ou necrose secundária. O PI ou 7-AAD entram nas células somente após a membrana plasmática se tornar permeável e nos estágios finais de morte nenhuma das caspases efetoras (-3, -6 e -7) costuma ser encontrada na sua forma ativa, sendo, portanto, muito comum medir a integridade de membrana e a ação catalítica das caspases para diferenciar entre necrose primária e secundária (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; DENECKER et al., 2001; KRYSKO et al., 2008).



Os efeitos observados nas doses mais baixas dos compostos ou nos menores tempos de exposição foram, portanto, a fragmentação de DNA, despolarização mitocondrial, ativação de caspases e externalização de PS na ausência de desintegração de membrana, todas características típicas de apoptose (VERMES et al., 1995; MACFARLANE & WILLIAMS, 2004; ZIEGLER & GROSCRURTH, 2004). Com o aumento da concentração, alterações sugestivas de necrose como perda da integridade de membrana, excessiva ativação de caspases e aumento de fluorescência no vermelho, correspondendo a um maior aumento da entrada de PI ou 7-AAD nas células e sua ligação às bases do DNA tornaram-se evidentes (KRYSKO et al., 2008). O achado de formas de morte celular com características de necrose e apoptose, como foi visto, principalmente, no maior tempo de incubação com as substâncias, 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 (KRYSKO et al., 2008). Assim, dependendo da concentração estipulada, diferentes processos podem ser influenciados e/ou alterados, mostrando que a regulação dose-dependente dos processos celulares reflete a sinalização ativada por moléculas bioativas, como visto em COSTA et al. (2008).

A necrose secundária ocorre quando as células apoptóticas perdem a capacidade em manter a produção de ATP ou em controlar o estresse oxidativo (SCHEINICHEN et al., 2003; KRYSKO et al., 2008). Vários fármacos utilizados na clínica como as antraciclinas, epipodofilotoxinas, agentes alquilantes e camptotecinas e a terapia por radiação geram EROs seguido da despolarização da membrana mitocondrial (CONKLIN, 2004). Com esse propósito, as células HL-60 foram incubadas com as substâncias testes para determinar o potencial de indução das mesmas na formação de EROs, revelando incapacidade para tanto e excluindo o papel de radicais livres como uma das vias responsáveis pela morte celular.

Apesar da vantagem fisiológica que os fármacos antineoplásicos possuem em matar as células tumorais por apoptose, devido ao reconhecimento específico graças à externalização de PS e remoção macrofágica, prevenindo eventuais danos teciduais resultantes da lise celular *in situ*, (VERMES et al., 1995; GRIMSLEY & RAVICHANDRAM et al., 2003), a maior parte dos agentes quimioterápicos em uso e em estudos de fase clínica interferem com a replicação e a formação do fuso mitótico (FISCHER et al., 2004; CRAGG & NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA et al., 2005). Dentre todas as substâncias estudadas, apenas a Cas X e a FC foram capazes de interferir na progressão do ciclo e favorecer o acúmulo de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> após 24 h de incubação. ZHANG et al. (2005) demonstrou que alguns diterpenos caurânicos promovem toxicidade celular pelo aumento do número de células na fase G<sub>1</sub> e, conseqüentemente, uma redução significativa na proporção de células

nas fases S e G<sub>2</sub> (semelhante aos resultados encontrados com a Cas X e a FC), o que indica que esses diterpenos inibem a replicação do DNA na fase de transição G<sub>1</sub>/S.

É sabido que a duração do ciclo varia muito de acordo com o tipo celular. As células de mamífero em cultivo, por exemplo, apresentam a fase G<sub>1</sub> (*Gap*) com duração de, aproximadamente, 5 h, a fase S ocorre em 7 h, enquanto as fases G<sub>2</sub> e M ocorrem em 3 e 1 h, respectivamente. Os períodos S, G<sub>2</sub> e M são relativamente constantes para a maioria dos tipos celulares, sendo G<sub>1</sub> o período que mais varia, podendo durar dias, meses ou anos dependendo da dormência em G<sub>0</sub> (REHEN, 2007). O fato do ciclo celular durar, em média, 16 h pode ser uma das razões plausíveis para a parada do ciclo causado pela Cas X e pela FC ter sido detectada somente após 24 h e não mostrar diferença significativa nos períodos mais curtos (6 e 12 h). Por outro lado, a Dox causou acúmulo na fase de síntese do DNA já nas 12 h de exposição. O mecanismo de ação da Dox (Adriamycin®, Rubex®, Doxil®) não está completamente elucidado, mas é bem conhecida sua capacidade de intercalação entre dois pares de bases do DNA, bloqueando a replicação e sua atividade inibitória sobre a topoisomerase II, uma enzima importante para o desenrolamento da DNA antes da transcrição gênica (MOMPARLER et al., 1976; FORNARI et al., 1994), atividades estas que explicam o seu uso clínico no tratamento de cânceres hematológicos, de bexiga, estômago, fígado, testículo, ovário e mama (WEISS, 1992). Testes de ensaio de relaxamento do DNA mostraram que o mecanismo antiproliferativo da Cas X não parece depender de uma ação inibitória sobre a enzima topoisomerase I, uma vez que não houve alterações no estado topológico do DNA após incubação de células HL-60 em concentrações até cinco vezes maior (7.5 µM) que o valor da CI<sub>50</sub> (FERREIRA, 2007)

A progressão apropriada ao longo do ciclo celular é monitorada por pontos de checagem (*checkpoints*) que correspondem às etapas de transição G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M para detectar defeitos durante a síntese de DNA e a segregação cromossômica, respectivamente (MALUMBRES & BARBACID, 2009). Assim, o dano celular pode causar a parada do ciclo na fase G<sub>1</sub> para permitir que o sistema de reparo atue antes da passagem para a próxima fase. Essa passagem (G<sub>1</sub> → S) é regulada pela fosforilação da proteína Retinoblastoma (Rb) por quinases dependentes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDKs), principalmente, após a formação dos complexos ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6. Em seu estado hipofosforilado, a Rb liga-se com e inibe a transcrição do fator de transcrição E2F. O complexo de ciclina D-CDK fosforila a Rb, a qual libera o E2F, permitindo ao mesmo atuar na ativação de genes e expressão de proteínas (ciclina E) necessários para entrar na fase S (HARBOUR et al., 1999; MALUMBRES & BARBACID, 2009). Assim, é provável que a parada do ciclo celular causada pela Cas X e FC esteja relacionada à presença de possíveis alterações percebidas na síntese de DNA pela maquinaria de reparo, uma vez que agentes exógenos e endógenos (como produtos químicos, radiação ionizante, compostos resultantes

do metabolismo celular e terapia) causam parada do ciclo e inibição de CDKs devido à ação genotóxica que possuem. Certamente, a atuação do maquinário enzimático de reparo não conseguiu corrigir o excessivo dano ao DNA ou os defeitos cromossômicos, levando às células leucêmicas à morte por apoptose.

Fundamentado no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* da FC foi avaliada usando camundongos Swiss transplantados com o tumor S-180. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos, uma vez que a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos foi fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Esses organismos são modelos acessíveis, prolíferos, com período de gestação curto, de fácil domesticação e manutenção e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos. Logo, o camundongo se tornou o mamífero mais usado na experimentação animal (ANDRADE et al., 2002; RANGARAJAN & WEINBERG, 2003).

O Sarcoma 180 é um tumor murino e uma das linhagens celulares mais usadas na pesquisa por produtos naturais com atividade antineoplásica (ITOKAWA et al., 1990; BEZERRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010). 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. Baseando-se nesse achados, optou-se pelo início do tratamento com a FC 24 h após a administração do inóculo de células cancerosas. Como determinado pelos ensaios *in vitro* usando o método do Alamar Blue®, através do qual se mostrou a atividade citotóxica *in vitro* da FC e das moléculas diterpênicas sobre a cultura primária de S-180, os estudos *in vivo* também revelaram potencial antiproliferativo da FC nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia oral, com taxas de redução do crescimento tumoral de 35.8, 86.2 e 53.7 %, respectivamente. Resultados muito semelhantes foram obtidos com o composto Cas X previamente isolado da FC, o qual foi capaz de diminuir o tumor experimental em cerca de 90 % quando aplicado na dose de 25 mg/kg/dia i.p. durante 8 dias (FERREIRA, 2007). A regressão total de tumores nos animais, a redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto e/ou o 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).

Diante desses achados, é notória a maior atividade antitumoral via i.p. da FC. Parâmetros farmacocinéticos podem alterar a ação da FC quando administrada oralmente, já que a absorção de substâncias é governada por diversos fatores como a área de superfície absorptiva, tempo de trânsito, fluxo sanguíneo e pelo pH gástrico e intestinal (barreiras de absorção), além do metabolismo hepático pelo qual normalmente toda

substância exógena sofre ao entrar na corrente sanguínea (efeitos de primeira passagem) (UNDEVIA et al., 2005). É possível que a acidez estomacal cause hidrólise ácida e consequente abertura do anel diacetálico, levando à mudanças estruturais dos clerodanos diterpênicos (WILLIAMS et al., 2007), um indício razoável para explicar a diminuição ou perda da atividade biológica da FC via oral. Embora um vasto número de fármacos citotóxicos, como o 5-FU e a Dox, sejam extensivamente usados intravenosamente, o tratamento se torna muito caro devido aos custos com hospitalização. Portanto, o desenvolvimento de novos e efetivos agentes citotóxicos orais são objetos de enorme interesse sócio-econômico (ISMAEL et al., 2008).

Investigações prévias com o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* na dose de 100 mg/kg/dia revelaram uma potente atividade antitumoral em camundongos transplantados com S-180, com inibição de 87 % ou até de 98 % do crescimento tumoral quando a atividade biológica responsável foi concentrada no extrato (ITOKAWA et al., 1990), valores esses bem próximos aos obtidos no presente trabalho. O estudo bioguiado de ITOKAWA et al. (1990) culminou na purificação de seis novos clerodanos diterpênicos para a época (casearinas A, B, C, D, E e F), os quais confirmaram a excelente bioatividade quando testadas na dose de 15 mg/kg/dia, sendo a casearina C a de maior potencialidade antitumoral. Subsequentemente, Almeida (2000) mostrou que o extrato alcoólico das folhas de *C. sylvestris* era capaz de inibir o crescimento do tumor experimental Erlich e agir como um antiinflamatório quando administrado na dose de 300 mg/kg/dia. Mais recentemente, DA SILVA et al. (2009) publicaram um artigo que relata sobre o potencial quimioterápico de dois compostos derivados do ácido gálico extraídos das folhas, o 3,5-dimetóxi-galato de isobutila (*Isobutyl Gallate-3,5-Dimethyl Ether* - IGDE) e o 3,5-dimetóxi-galato de metila (*Methyl Gallate-3,5-Dimethyl Ether* - MGDE), os quais diminuíram o volume tumoral em, aproximadamente, 80 e 60 %, respectivamente, em camundongos transplantados com células tumorais de Lewis (neoplasma sólido de origem pulmonar) e ambos aumentaram a sobrevivência em torno de 90 % no grupo inoculado com o sarcoma ascítico de Ehrlich, embora o derivado IGDE tenha apresentado uma atividade quimioterápica mais eficaz que o MGDE ao prolongar a vida média dos animais em doses mais baixas. Durante o crescimento desse sarcoma, o nível da atividade das células *natural killer* esplênicas diminuiu drasticamente, um fator importante para a proliferação e estabelecimento do câncer, já que elas em conjunto com a produção de citocinas (interleucina-2 e interferon- $\gamma$ ) inibem o crescimento desse modelo murino (VALADARES et al., 2003). Além disso, o interferon- $\gamma$  regula a resposta imune do hospedeiro favorecendo a fagocitose das células tumorais pelos macrófagos (YAMAMOTO et al., 1995). O potencial anticâncer desses dois derivados gálicos parece estar relacionado justamente à ativação do sistema imunológico como resultado da elevação

da atividade das células *natural killer* nos camundongos transplantados com o sarcoma de Ehrlich.

Animais transplantados com S-180 morrem, geralmente, por desnutrição, toxemia e septicemia a partir do 15º dia após a implantação (PEREIRA & CHAVES, 1983). De fato, ambos os controles apresentaram uma média de 16 dias de vida e o grupo FC 25 mg/kg/dia i.p., de 19 dias, mas o aumento de 3 dias não foi significativo. Vários fatores podem ser responsáveis pela incapacidade de uma substância em prolongar a vida dos animais. Um dos mais relatados é o aparecimento de metástases, sendo bem estabelecido que o tumor S-180 pode metastatizar para os pulmões quando ele está entre a terceira e a quarta semanas de evolução (SCHABEL et al., 1977), favorecendo, então, o surgimento de tumores secundários que debilitam ainda mais o organismo e interferem radicalmente na eficácia terapêutica. Outro parâmetro que deve ser levado em consideração quando se fala em reincidência tumoral é o fato de que as células tumorais frequentemente se multiplicam mais rápido que as células formadoras dos novos capilares sanguíneos, reduzindo a densidade vascular, um processo que fica exacerbado pela desorganização da vasculatura, irregularidade da circulação e compressão dos vasos sanguíneos e linfáticos pelo tumor (HARRIS et al., 2002; PADERA et al., 2004). Estas alterações microambientais nos tumores sólidos dificultam, por sua vez, a chegada de oxigênio, nutrientes e dos agentes antitumorais às células mais distantes, justamente às células-tronco tumorais responsáveis pela regeneração do tumor que, por estarem mais distantes dos vasos são, evidentemente, expostas a concentrações decrescentes da substância (TANNOCK & ROTIN, 1989; KUMAR et al., 2004). Além disso, existem outras razões que interferem na quimioterapia convencional:

a) A maioria dos fármacos anticâncer age sobre células cancerosas que estão em alguma fase do ciclo celular. Inclusive a Cas X e a FC foram capazes de favorecer o acúmulo na fase  $G_0/G_1$ . Assim, células que não estão proliferando ou que o fazem de forma muito lenta escapam da ação farmacológica de compostos bioativos;

b) Alguns fármacos se mostram menos ativos em microambientes com privação de nutrientes ou naqueles mais ácidos ou hipóxicos (TANNOCK & ROTIN, 1989). Tanto a acidez estomacal como aquela de regiões do tumor devido à baixa quantidade de oxigênio e nutrientes, podem ter favorecido a degradação local da FC. Está estabelecido que áreas hipóxicas estimulam o desenvolvimento de resistência celular à radioterapia (HARRIS et al., 2002).

c) As propriedades físico-químicas, como o peso molecular, a forma, carga e a solubilidade em água são fatores determinantes para a taxa de difusão das substâncias bioativas. Logo, as moléculas hidrossolúveis são mais eficientemente difundidas na matriz

extracelular do que as lipossolúveis, sendo os compostos diterpênicos exemplos destas últimas (CONNOLLY e HILL, 1991; COLEY et al., 1993).

O processo típico para a descoberta de novas moléculas naturais costuma passar por etapas tradicionalmente conhecidas desde a produção de extratos (possuindo geralmente entre 10 - 100 componentes), concentração e fracionamento até a purificação de uma molécula. Uma alternativa eficaz para diminuir o tempo necessário para o isolamento do princípio ativo é a seleção de amostras fracionadas a partir do extrato (LAM, 2007). Assim, com base em estudos anteriores (ITOKAWA et al., 1990; FERREIRA, 2007), após a determinação do potencial antiproliferativo *in vitro* e *in vivo* da FC (rica em diferentes diterpenos clerodânicos), foi demonstrado a manutenção da sua bioatividade, o aumento do potencial citotóxico contra diferentes linhagens tumorais, inclusive contra aquelas que se mostraram mais resistentes aos compostos clerodânicos isolados (como a linhagem K-562), a melhora do efeito antitumoral via i.p. e oral quando comparado com a Cas X isolada (FERREIRA, 2007) e eliminação das etapas finais de isolamento e caracterização estrutural dos compostos presentes na FC. As plantas contêm inúmeros constituintes que podem apresentar efeitos sinérgicos devido à presença de diferentes princípios ativos contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985), um fator que pode explicar o excelente potencial citotóxico e antitumoral da FC. A exemplo da FC, a presença de compostos naturais na forma de complexos, como *Ivermectin*®, é um grande desafio para o desenvolvimento de um medicamento. A ivermectina é um fármaco composto, originalmente, por um grupo de lactonas macrocíclicas (avermectinas A e B) isoladas de *Streptomyces avermectilis* e muito usada como antiparasitário em animais domésticos como um complexo porque não foi possível purificar seus componentes individuais em larga escala (CHABALA et al., 1980; BLOOMQUIST, 1996).

A análise histológica dos tumores revelou áreas de necrose de coagulação alternada com células pleomórficas em todos os grupos examinados, embora a necrose, confirmada pela frequência de campos acidófilos, tenha sido mais visualizada nos grupos tratados com 5-FU e FC 25 mg/kg/dia i.p. e FC 50 mg/kg/dia oral, provavelmente, como resultado da ação antitumoral das substâncias administradas. Apesar da maioria dos tumores de S-180 desenvolver necrose a partir da 3ª semana de implante (PEREIRA & CHAVES, 1983), apenas uma semana de crescimento tumoral foi o bastante para o surgimento de necroses até mesmo nos grupos controle. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a forma sólida do S-180 caracteriza-se por um rápido crescimento, atingindo uma média de 18 x 14 x 10 mm por volta de sete dias de transplante (SCHABEL et al., 1977), sendo, portanto, a capacidade de oxigenação dos vasos sanguíneos locais e daqueles em formação (angiogênese) ultrapassada pelo aumento da massa neoplásica (PADERA et al., 2004). A necrose de coagulação que ocorre principalmente nas áreas centrais do tumor é

determinada pela desnaturação da maioria das proteínas celulares (inclusive as lisossômicas) devido à queda acentuada no pH celular durante o processo de lesão por hipóxia ou isquemia. Nestes casos, o citoplasma celular se torna bastante eosinofílico e como a maioria das enzimas autolíticas foram desnaturadas, a arquitetura tecidual é mantida por alguns dias até digestão e remoção do tecido necrótico por leucócitos (KUMAR et al., 2004).

## 5.2 Toxicidade

O consumo de fitoterápicos tem aumentado tanto em países pobres como em países de alto nível sócio-econômico como uma forma complementar de tratamento e prevenção de doenças, especialmente daquelas consideradas crônicas, como as cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças auto-imunes e cânceres (WHO, 2003; BALUNAS & KINGHORN, 2005; FERREIRA et al., 2008). Aproximadamente, 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e quase 85% dessa tradição envolve o uso de plantas medicinais e seus princípios ativos (WHO, 2003). Mesmo assim, a toxicidade dos vegetais ainda é quase sempre negligenciada a um segundo plano (JUNIOR & PINTO, 2005). Uma vez que a maioria dos compostos vegetais com atividade farmacológica é relativamente pouco estudada em relação ao potencial toxicológico (JUNIOR & PINTO, 2005) e a planta *C. sylvestris* e extratos oriundos de suas diferentes partes são cada vez mais usados pela população (MAISTRO et al., 2004; ESTEVES et al., 2005), considerou-se importante avaliar o potencial genotóxico de todos os diterpenos clerodânicos através do ensaio do cometa *in vitro* e da FC usando o teste do cometa e do micronúcleo nos estudos *in vivo*.

Nos estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas PBMC como modelo experimental pelo fato de serem indicadores sensíveis aos agentes genotóxicos, apresentarem uma vida relativamente longa, circularem por todos os tecidos e serem de fácil obtenção (ALBERTINI et al., 2000). As concentrações escolhidas (0.5 e 1  $\mu$ M) se fundamentaram nos achados de que o teste do cometa deve ser realizado em condições mínimas de toxicidade celular, visto que a ação citotóxica leva, inevitavelmente, à formação de quebras das fitas de DNA (RIBEIRO et al., 2003).

A classe de dano sofrido pelo DNA passou das classes 0 ou 1, as quais foram extensamente mais vistas no controle negativo e na concentração de 0.5  $\mu$ M com todos os clerodanos, para as classes 2 e 3 nas células tratadas pela Dox e pelos compostos na concentração de 1  $\mu$ M. Porém, dano de nível 4 foi causado pela Cas D, F e X apenas na concentração de 1  $\mu$ M. Essa ocorrência de cometas sem cabeça e com mais de 90% do DNA presente na cauda (cometas da classe 4) após a eletroforese é uma provável indicação de efeito citotóxico, sendo o aspecto mais indicativo de células apoptóticas dentro dos

parâmetros do teste do cometa (HARTMANN & SPEIT, 1997; BACSÓ et al., 2000). Assim, é provável que os diterpenos estudados atuem vias de morte semelhante em linhagens celulares distintas como PBMC e HL-60, embora todas as substâncias tenham revelado seletividade citotóxica para a linhagem tumoral HL-60, possuindo a Cas F um índice de seletividade superior ao da Dox (53.4 e 44.5, respectivamente). Por outro lado, MAISTRO et al. (2004) relataram que o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* não é genotóxico para a linhagem normal V-79 ou para hepatoma murino HCT quando testado até a concentração de 2 mg/mL. Essa ausência de genotoxicidade desse extrato, comparada aos resultados encontrados no presente trabalho, certamente está ligada a dois fatores de base metodológica: primeiro, a ação genotóxica foi testada com o extrato etanólico, onde o princípio ativo é, costumeiramente, diluído e quase sempre associado a outros compostos que podem interferir ou bloquear sua bioatividade (WATTENBERG, 1985); segundo, MAISTRO et al. (2004) incubaram as células com o extrato somente por 2 h, tempo esse talvez curto para causar danos ao genoma, uma vez que foi encontrada fragmentação de DNA por citometria de fluxo somente após 6 h de incubação.

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro importante quando se pretende verificar a sua aplicabilidade farmacológica (ANAZETTI et al., 2003). Assim, com base na RE nº 90 da ANVISA (BRASIL, 2004b), avaliou-se o potencial genotóxico e clastogênico da FC em PBMC do sangue periférico e em hemácias da medula óssea através do ensaio do cometa e do micronúcleo, respectivamente, isolados de camundongos após 30 dias consecutivos de tratamento. Os ensaios mostraram que a dose de 10 mg/kg/dia i.p. foi a única que apresentou potencialidade genotóxica *in vivo* dentre todas as doses testadas.

Recentemente, OLIVEIRA et al. (2009) publicaram um trabalho no qual eles sugerem que o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* possui atividade antimutagênica (nas doses de 6.25 e 12.5 mg/kg/dia) e antigenotóxica (3.13, 25 e 12.5 mg/kg/dia) contra a ciclofosfamida. Da mesma forma, os autores relatam a proteção ao DNA de PBMC favorecida pela Cas F nas doses de 0.63, 1.3 e 2.5 mg/kg/dia após 14 dias seguidos de tratamento, embora nenhum dos tratamentos tenha revelado redução dos danos ao DNA de volta ao nível basal, enquanto em doses mais altas (50 e 75 mg/kg/dia do extrato etanólico; 3.8 mg/kg/dia da Cas F) o potencial genotóxico e clastogênico ficou evidente. Quando se leva em consideração os perfis cromatográficos do extrato etanólico e da FC, eles são semelhantes e com picos de retenção maiores correspondentes às casearinas F e X, mostrando que a FC e o extrato etanólico possuem um conteúdo similar de clerodanos diterpênicos.

A soma dos estudos toxicogenéticos demonstra a ação genotóxica e clastogênica da FC, uma vez que as quebras de fita dupla representam umas das mais severas lesões ao



DNA, devido à perda da continuidade cromossômica e à geração de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômero) que comprometem a segregação cromossômica durante a mitose (KAYE et al., 2004). Esse fato pode estar relacionado à formação de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea dos camundongos do grupo FC 10 mg/kg/dia i.p. Os MNs representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, gerando fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo principal durante a telófase da mitose (FENECH, 2007). No entanto, nem todo agente genotóxico é, necessariamente, mutagênico, pelo fato das lesões geradas no DNA poderem ser reparadas. Adicionalmente, esses danos não podem ser extrapolados a todas as células somáticas e germinativas do ser humano, pois não está claro se injúrias encontradas em células da linhagem branca do sangue refletem, fielmente, aquelas ocorridas em órgãos-alvo (ALBERTINI et al., 2000; ANAZETTI et al., 2003; MATTIOLI et al., 2006). Logo, o dano ao DNA é somente a primeira etapa do processo carcinogênico, não fornecendo nenhuma informação sobre a potência dos clerodanos diterpênicos e da FC como carcinógenos (MATTIOLI et al., 2006).

Agentes antineoplásicos usados atualmente na clínica são indutores de quebras nas fitas do DNA de células de mamíferos, como visto com os inibidores de topoisomerase I (camptotecina) e topoisomerase II (etoposídeo) (SORTIBRÁN et al., 2006) e com o 5-FU. Este último, por exemplo, é um antimetabólito muito usado para tratar adenocarcinoma de mama e cânceres do trato gastrointestinal, de cabeça e pescoço graças a sua ação inibidora sobre a enzima timidilato sintase, entre outros mecanismos, apesar de sua atividade clastogênica *in vivo* (GREM, 1997; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2003; NOORDHUIS et al., 2004). Os diterpenos ácido caurenóico (CAVALCANTI et al., 2006) e paclitaxel (BRANHAM et al., 2004) também apresentam positividade para testes genotóxicos (Cometa e Micronúcleo) realizados com células sanguíneas de série branca de humanos. Assim, é bastante provável que a indução de danos ao DNA visto com todas as substâncias estudadas (Cas B, D, F, X e FC) seja um indício do mecanismo de ação da citotoxicidade tumoral.

Os testes para avaliação de toxicidade das substâncias químicas estão bem detalhados segundo os protocolos sugeridos pela OECD (1996). No Brasil, a Resolução RDC n.48 e a Resolução - RE n. 90, publicadas em 16 de março de 2004, tratam do registro dos medicamentos fitoterápicos e apresentam um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, respectivamente (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b). Fundamentando-se nas recomendações da RE n. 90, a qual foi elaborada em conformidade com as normas da Organização Mundial de Saúde, estudos de toxicidade aguda e de doses

repetidas foram desenvolvidos para avaliar a toxicidade sistêmica da FC através do surgimento de alterações hematológicas, bioquímicas e histológicas em órgãos-chave.

Para que uma planta apontada como responsável pela intoxicação venha a ser classificada como espécie tóxica, sua toxicidade deve ser comprovada experimentalmente. Esta reprodução experimental deve ser realizada na mesma espécie animal naturalmente afetada ou mais próxima a ela no caso da toxicidade em seres humanos, uma vez que há muitas diferenças na susceptibilidade aos efeitos das plantas tóxicas entre as espécies (CHEEKE, 1998; TOKARNIA et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002). Nos experimentos de avaliação toxicológica da FC, foram usados camundongos *Mus musculus*, uma espécie muito aplicada em estudos de toxicidade pré-clínica para a validação do uso tradicional de substâncias provenientes de plantas medicinais (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

Assim, com base nos valores de DL<sub>50</sub> de 80.9 e 267.1 mg/kg de peso corpóreo (i.p. e oral, respectivamente) da FC em camundongos, foram escolhidas as doses de 5 e 10 mg/kg/dia i.p. e 10 e 20 mg/kg/dia oral para o tratamento subcrônico dos animais por um período de 30 dias consecutivos. Os valores da DL<sub>50</sub> estão bem abaixo dos encontrados por Basile et al. (1990) e Esteves et al. (2005) com o extrato etanólico (> 1.842 mg/kg) e com o óleo essencial (1.100 mg/kg) das folhas de *C. sylvestris*, respectivamente, mostrando que a FC pode ser considerada moderadamente tóxica, de acordo com as categorias de toxicidade estabelecidas por Hodge & Sterner (1944), baseadas para prováveis DL<sub>50</sub> para o homem e que permanecem até os dias atuais.

Após o tratamento subcrônico com a FC, os animais anestesiados foram submetidos à coleta de amostras de sangue periférico a partir do plexo orbital. Depois de processados, os dados hematológicos revelaram que as doses i.p. causaram desde anemia severa devido à diminuição no número de hemácias, do hematócrito e da hemoglobina até uma intensa neutrofilia (aumento de 3.1 e 4.6) e linfocitopenia (redução de 1.5 e 2.2) (5 e 10 mg/kg/dia, respectivamente). Acrescentado a isso, a dose i.p. de 25 mg/kg/dia aplicada por 7 dias também causou neutrofilia e linfocitopenia, ao contrário do 5-FU que, além da linfocitopenia, levou à monocitopenia e drástica neutropenia. Um quadro de leucocitose com neutrofilia, pode ocorrer diante de infecções, inflamação imunomediada, necrose tissular e severa hemólise (KUMAR et al., 2004). Sendo o baço o principal órgão responsável pela renovação do sangue periférico, ele tem grande capacidade de reter e armazenar células sanguíneas, fato que costumeiramente aumenta seu volume (FREITAS et al., 1999). Porém, caso o potencial dos macrófagos esplênicos seja ultrapassado pela demanda, o parênquima hepático e suas células de Kupper são também se envolvem na renovação sanguínea (SACHER & McPHERSON, 2000; KUMAR et al., 2004). Assim, é provável que o aumento no peso relativo do baço e do fígado, a hiperplasia das células de Kupffer e a visualização

de pigmentos de hemossiderina nos hemossiderófagos após a administração subcrônica i.p. da FC sejam achados diretamente relacionados à intensa renovação celular hematológica, e que esta hepatoesplenomegalia esteja associada ao hiperesplenismo, condição em que coexistem a anemia, leucopenia e trombocitopenia (KUMAR et al., 2004), embora não tenha sido detectada diminuição das plaquetas após a administração da FC. Em suma, o baço dos animais tratados com as maiores doses não demonstraram grandes alterações morfológicas, mas ficou evidente a congestão da polpa vermelha com acentuada dilatação dos vasos sanguíneos, uma característica que aponta para a involução da polpa branca e dos seus nódulos linfáticos (FREITAS et al., 1999), corroborando a linfocitopenia periférica e a desorganização dos folículos linfóides observada no parênquima esplênico. Semelhante ao encontrado no presente trabalho, vários fármacos anticâncer causam supressão hematológica e imunológica, como observado com o docetaxel (RINGEL & HORWITZ, 1991), metotrexato (KATZUNG et al., 2003) e o 5-FU (BEZERRA et al., 2008).

O exame dos analitos séricos revelou diversas mudanças significativas principalmente na dose de 10 mg/kg/dia i.p. da FC, representadas pelo aumento da ALT e diminuição da albumina, fosfatase alcalina, glicose e do colesterol total, este último decrescendo em ambas as doses i.p. testadas (5 e 10 mg/kg/dia), todos parâmetros plasmáticos direta ou indiretamente interligados ao metabolismo hepático. 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. Logo, hepatotoxicidade constitui a manifestação tóxica mais comum (CULLEN & MILLER, 2006). As alterações nos parâmetros sanguíneos geralmente surgem somente após significativa perda da função sintética do fígado (acima de 70 a 80 %) uma vez que ele possui grande capacidade de reserva de síntese (RAMAIAH, 2007).

O fígado humano normal, origem da maioria das proteínas presentes no plasma, produz 12 g/dia de albumina. Além de outras proteínas plasmáticas, os níveis de albumina declinam regularmente quando o dano hepatocelular tem duração superior a 3 semanas (o protocolo experimental adotado foi de 4 semanas de exposição), depois da albumina do sangue ter sido substancialmente eliminada do organismo, já que sua meia-vida é de 14 a 20 dias. A capacidade de agir como um reservatório de aminoácidos torna a albumina um bom indicador do estado nutricional, além da sua função primordial de manter a pressão oncótica (SACHER e McPHERSON, 2000). Provavelmente, a FC na dose de 10 mg/kg/dia i.p. causou dano a ponto de interferir na capacidade sintética do fígado embora outros fatores não hepáticos também possam causar hipoalbuminemia, tais como a resposta inflamatória aguda (evidenciada pelo aumento dos leucócitos segmentados circulantes e também no parênquima hepático e renal), má nutrição (refletida na diminuição do peso corpóreo dos animais) e perda de albumina pela urina e pelo trato gastrointestinal.

As enzimas AST e ALT estão amplamente distribuídas no corpo, sendo mais abundantes no fígado devido ao papel fundamental deste órgão na síntese protéica. Porém, apenas a ALT é considerada específica para danos hepatocelulares, apesar de ser encontrada em quantidades menores nos rins, coração e músculos esqueléticos (SACHER e McPHERSON, 2000). Assim, a elevação (magnitude de 2x) apenas dos níveis séricos da ALT após administração da FC 10 mg/kg/dia i.p. certamente corrobora os danos hepáticos e descarta a hemólise como fator responsável pela diminuição dos eritrócitos e do hematócrito do sangue periférico, pois apesar da AST ocorrer no fígado, ela é mais abundante no coração, nos músculos esqueléticos e eritrócitos (SACHER e McPHERSON, 2000).

Embora seja perceptível que danos e/ou traumas musculares resultem na elevação de ambas as aminotransferases, sabe-se que a ALT aumenta menos que AST após injeções intramusculares repetidas por vários dias (como estabelecido no protocolo experimental) e retenção severa durante o manuseio e que em roedores, a AST mitocondrial é a isoforma mais abundante (80 %, citoplasmática – 20 %), o que exige formas mais severas de dano hepático, como a necrose, para que AST se eleve de forma comparável à ALT (RAMAIAH, 2007). Inclusive, as análises histopatológicas revelaram a presença desde uma tumefação celular até áreas de necrose focal com presença de granulócitos neutrófilos polimorfonucleares principalmente nas duas maiores doses subcrônicas estabelecidas (10 mg/kg/dia i.p. e 20 10 mg/kg/dia i.p. oral) e mesmo apesar destas alterações morfológicas, às vezes, associada à desorganização dos cordões de hepatócitos, o que indica morte celular seguida de regeneração, a manutenção dos níveis normais de AST sugere um dano hepático moderado.

No presente estudo foi verificado que ambas as doses da FC aplicadas intraperitonealmente (5 e 10 mg/kg/dia) foram capazes de diminuir a concentração sérica de colesterol (29,2 e 25,1%, respectivamente) e o nível de glicemia (10 mg/kg/dia, redução de 30.2 %). Do ponto vista terapêutico, a hipocolesterolemia sanguínea associada à diminuição dos níveis de glicose é um achado desejável, sugerindo um possível papel na redução da incidência de arteriosclerose, diabetes e de complicações relacionadas à síndrome metabólica (MONTEIRO & CONDE, 1999; SANTOS et al., 2006). Recentemente, estudos relataram que tanto o tratamento agudo com o extrato metanólico (SCHOENFELDER et al., 2008) quanto o tratamento subcrônico via oral por 28 dias com o extrato hidroalcolico (WERLE et al., 2009) das folhas de *C. sylvestris* foi capaz de reduzir a concentração sérica de triglicerídeos. Uma vez que o colesterol é sintetizado principalmente no fígado a partir de acetil-CoA é mais provável que a redução dos níveis séricos de colesterol seja mais um indicio da hepatotoxicidade causada pela FC (RAMAIAH, 2007), como evidenciado pela redução de albumina, o aumento de ALT e as alterações microscópicas (esteatose microvesicular, tumefação celular, focos inflamatórios, necrose focal). Embora a glicemia

seja diretamente influenciada pelos níveis de insulina liberados das células  $\beta$  pancreáticas, o metabolismo de carboidratos (principalmente do glicogênio) é grandemente controlado pelo fígado. Assim, nos casos de dano hepático, como encontrado após administração da FC, a hipoglicemia pode resultar da incapacidade dos hepatócitos remanescentes em gerar glicose por glicogenólise (SACHER & McPHERSON, 2000).

Um dos principais mecanismos envolvidos com a esteatose é a inibição da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, como acontece quando há intenso dano hepático (ORTIZ DE MONTELLANO E DE VOSS, 2002; WILLIAMS et al., 2002). Por outro lado, metabólitos formados a partir do metabolismo hepático podem evocar resposta inflamatória (KUMAR et al., 2004), tal qual como vista no fígado dos animais tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg/dia i.p. e 20 mg/kg/dia oral, sugerindo a ativação do sistema imunológico e regeneração tecidual. Assim, a ação combinada da inibição da  $\beta$ -oxidação e aumento da geração de EROS liberadas por neutrófilos e macrófagos resultam em peroxidação lipídica e representam um importante mecanismo de hepatotoxicidade. 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, lóbulos hepáticos inteiros podem se regenerar (KUMAR et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2010).

Uma vez que houve queda dos níveis séricos de albumina no grupo FC 10 mg/kg/dia i.p., seria possível uma diminuição da BUN como resultado da hipoalbuminemia e perda de peso. A BUN dos grupos experimentais se manteve semelhante ao controle provavelmente por haver menor excreção renal de uréia naqueles grupos, conservando, assim, os níveis séricos de uréia dentro de valores normais. Embora diversos sinais de toxicidade renal tenham sido encontrados nos animais tratados (extensas áreas de necrose com coleções de granulócitos neutrófilos polimorfonucleares consistentes com abscesso, focos de necrose do epitélio tubular e tumefação celular do epitélio dos túbulos proximais e distais), as determinações de BUN realizadas simultaneamente com as de creatinina reforçaram que a ação nefrotóxica da FC é moderada e não afeta a funcionalidade normal da capacidade excretora renal. A insuficiência renal é a causa mais comum de uremia, resultando em comprometimento da excreção devido à ação de compostos nefrotóxicos. A uréia retida na urina pode se difundir por refluxo para a corrente sanguínea (SACHER & McPHERSON, 2000). No entanto, muitos néfrons podem ser perdidos sem que os rins percam sua capacidade de excretar os debris nitrogenados devido à grande margem de segurança do mesmo. Se a perda ocorre lentamente, os rins podem hipertrofiar e contrabalançar a perda

de até 2/3 do total de néfrons (KUMAR et al., 2004). Mas isso não ocorreu, já que não houve aumento do peso relativo dos rins dos animais pertencentes aos grupos experimentais.

Outros sinais de toxicidade sistêmica são observados a partir da redução na massa corporal dos animais do grupo experimental (BARDOCZ et al., 1996). Os animais tratados com a FC 5 e 10 mg/kg/dia i.p. (estudos de toxicidade subcrônica) apresentaram diminuição no ganho de peso após 7 dias de tratamento assim como visto na dose de 25 mg/kg/dia usada no tratamento antitumoral e na análise de sobrevivência, com o controle positivo 5-FU e com a dose subcrônica de 20 mg/kg/dia via oral. Embora a redução da massa tumoral associada com a perda mínima de peso após 2 semanas de tratamento (não mais que 10 %) sejam indicativos de uma janela terapêutica aceitável para fármacos anticâncer em humanos (KAMB, 2005), compostos que apresentam toxicidade sistêmica severa e que favorecerem intensa redução do peso, como o 5-FU, são, costumeiramente, utilizados na clínica (ZÚÑIGA-GONZÁLEZ et al., 2003). A perda de peso é um dos efeitos colaterais mais comuns após algumas sessões de quimioterapia, uma vez que as células da mucosa intestinal também são alvos inespecíficos do fármaco antineoplásico, favorecendo o surgimento vômito e diarreia (KATZUNG et al., 2003), esta última percebida após a administração i.p. da FC 25 mg/kg/dia (a partir da 3ª aplicação) e 10 mg/kg/dia (a partir do 6ª dose). É bem conhecido que a mucosa do trato gastrointestinal possui (por grama de tecido) maior quantidade de fosfatase alcalina que o fígado. Assim, o consumo de comida deve ser levado em consideração na interpretação dos valores da fosfatase alcalina (RAMAIAH, 2007), especialmente porque os estudos toxicológicos evidenciaram diminuição qualitativa na ingestão de água e ração e no peso corpóreo dos animais concomitante com a redução sérica de fosfatase alcalina nas duas maiores doses utilizadas, sugerindo que o conjunto de achados sintomáticos e laboratoriais (diarreia, diminuição dos níveis séricos de fosfatase alcalina e do peso, aumento do estômago) indica certa toxicidade também para o aparelho digestivo, principalmente quando se leva em consideração que os terpenos em geral são moléculas pequenas rapidamente absorvidas pelo epitélio intestinal devido à alta lipossolubilidade (CONNOLLY & HILL, 1991), podendo levar à redução na ingestão de alimentos (DZIBA et al., 2006) ao agirem como fatores antinutricionais (BARDOCZ et al., 1996).

O aumento do estômago dos animais tratados via oral por gavagem, tanto nos experimentos da avaliação antitumoral (50 mg/kg/dia) quanto da toxicidade subcrônica (10 e 20 mg/kg/dia) não teve representatividade traduzida em alterações microscópicas, fato até certo ponto esperado, pois análises mostram a presença de terpenos envolvidos na atividade protetora da mucosa estomacal (SERTIÉ et al., 2000). Mais recentemente, comprovou-se que a FC (15.5 mg/kg/dia) e as casearinas B, D, O e X (1.68 mg/kg/dia) estão diretamente envolvidas nessa propriedade de proteção da mucosa (FAPESP-UNESP-USP,

2003), confirmando estudos anteriores sobre o potencial antiulcerogênico das folhas de *C. sylvestris* e a baixa toxicidade do extrato etanólico das mesmas, quando observou-se que doses 2.5 vezes maiores (143.9 mg/kg/dia de peso corpóreo) que a dose efetiva como antiulcerogênica (57.5 mg/kg) não alteraram parâmetros fisiológicos importantes (consumo de água e ração, o ganho de peso corpóreo e o peso relativo de órgãos-chave) após 30 dias consecutivos de administração oral do extrato (BASILE et al., 1990).

Além das alterações hematológicas e bioquímicas e da redução do desenvolvimento ponderal, a toxicidade sistêmica se manifestou através das alterações de comportamento, como apatia e redução nos consumos de água e ração e do peso relativo dos órgãos, mais presentes nos grupos tratados via i.p. Está bem estabelecido que o consumo de substâncias que contenham componentes tóxicos pode refletir em alterações no peso relativo dos diferentes órgãos através do aumento ou involução dos mesmos (BARDOCZ et al., 1996; FERREIRA et al., 2007, 2009; MAGALHÃES et al., 2010). Dos órgãos dissecados a partir dos animais do estudo subcrônico, o único órgão que apresentou involução foi o coração. A cardiotoxicidade evidenciada pela redução do coração não foi corroborada pelas análises histológicas, uma vez que o coração dos animais tratados apresentou detalhes histológicos muito similares ao controle. As alterações cardíacas histológicas e ultra-estruturais causadas por antineoplásicos incluem reação inflamatória, necrose de miócitos, fibrose intersticial, perda de miofibrilas, edema mitocondrial e vacuolização, como visto após tratamento de leucemia linfóide aguda (LLA) com antraciclina (daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina e epirubicina) (WEISS, 1992). Apesar da mucosite e mielossupressão consistirem nos efeitos colaterais mais relatados do 5-FU, ele também causa cardiotoxicidade e eventos cardiovasculares súbitos, incluindo isquemia miocárdica, arritmias ventriculares e morte súbita (McLACHLAN et al., 1994; BEZERRA et al., 2008).

A toxicidade induzida pelos fármacos ou as reações adversas são as principais causas da retirada de medicamentos do mercado. Entre 1975 e 1999, 16 das 45 drogas aprovadas foram retiradas do mercado por razões de segurança e 22 % (10 das 45) foram hepatotóxicas (LASSER et al., 2002). Olson et al. (2002) mostraram que 72% dos sintomas e/ou sinais de toxicidade de drogas em humanos podem ser delineados e visualizados em animais de laboratório. As correlações entre homem-animal de laboratório se mostraram mais altas para o sistema cardiovascular, gastrointestinal e para alterações hematológicas. Por outro lado, a hipersensibilidade, as reações cutâneas e a hepatotoxicidade apresentaram os menores índices de correlação. Diferenças qualitativas e quantitativas entre as espécies na regulação e expressão de atividade funcional dos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), particularmente o metabolismo mediado pelas enzimas P-450 monooxigenases de função mista, dificultam a extrapolação ao seres humanos dos dados obtidos com animais. Assim, as injúrias

hepáticas são a causa mais comum da retirada de drogas do mercado, uma vez que a maioria destas injúrias são pouco previsíveis e compreendidas (WILLIAMS et .al., 2002).



# CONCLUSÃO

---

## 6 – CONCLUSÃO

Dentre as substâncias estudadas (Cas B, D, F e X e a FC), a Caseargrevina F e a Casearina X apresentaram maior atividade antiproliferativa *in vitro*, indução de morte celular ativada por vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose e maior seletividade citotóxica para células tumorais. A FC, cuja composição majoritária é representada pela Cas X, inibiu consideravelmente o crescimento tumoral *in vivo* quando aplicada via i.p. (86.2 %) e oral (53.7 %) e exibiu toxicidade reversivelmente moderada representada por mielossupressão, genotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-GONZAGA, W., WEBER, A. D., GIACOMELLI, S. R., SIMIONATTO, E., DALCOL, I. I., DESSOY, E. C., MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med.**, 69: 773-775, 2003.
- 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**. 2000. 97f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.
- ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., LOPES, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, 28: 118-129, 2005.
- ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 388p.
- American Cancer Society (ACS). **Cancer facts and figures**. Disponível em: <[http://www.cancer.org/docroot/STT/stt\\_0\\_2008.asp?sitearea=STT&level](http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_2008.asp?sitearea=STT&level)>. Acesso em: 20 ago. 2009.
- ANAZETTI, M. C., MELO, P. S., DURAN, N., HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicol.**, 188, 261-274, 2003.
- BACSÓ, Z., EVERSON, R. B., ELIASON, J. F. The DNA of Annexin V-binding Apoptotic Cells Is Highly Fragmented. **Cancer Res.** 60: 4623-4628, 2000.
- BALUNAS, M. J., KINGNORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, 78: 431-441, 2005.
- 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, D. P., CASTRO, F. O., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., ELMIRO, F. J. M., ALENCAR, N. M. N., MESQUITA, R. O., LIMA, M. W., COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, 28: 156-163, 2008.

BLANCO, R. A. Guaçatonga (*Casearia sylvestris*). Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A34guacatonga.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2008.

BLOOMQUIST, J. R. Ion channels as targets for insecticides. **Annu. Rev. Entomol.**, 41: 163-190, 1996.

BOATRIGT, K. M., SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, 15: 725-731, 2003.

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 A<sub>2</sub>. **Comp. Biochem. Physiol.**, 127: 21-30, 2000.

BORGES, M. H., SOARES, A. M., RODRIGUES, V. M., OLIVEIRA, F., FRANSHECHI, A. M., RUCAVADO, A., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia Sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** 39: 1863-1869, 2001.

BRANHAM, M. T., NADIN, S. B., VARGAS-ROIG, L. M., CIOCCA, D. R. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, 560: 11-17, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004a. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 29 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RE n. 90 de 16 de março de 2004b. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 29 jun. 2009.

BRENDLER-SCHWAAB, S., HARTMANN, A., PFUHLER, S., SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and *status* in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, 20: 245-54, 2005.

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

CAMARGO, F. G., GOMES, E., PANNUNZIO, E., BUENO, V. S. Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de estomatite herpética. **Brag. Pta.**, 1: 121-127, 1993.

CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM (CRUK). CancerStats. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>>. Acesso em: 29 out. 2008.

CARVALHO, P., TIRNAUER, J. S., PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biol.**, 5: 229-237, 2003.

CARVALHO, P. R. F., FURLAN, M., YOUNG, M. C. M., KINGSTON, D. G. I., BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochem.**, 49: 1659-1662, 1998.

CAVALCANTE, W. L. G., CAMPOSA, T. O., PAI-SILVA, M. D., PEREIRA, O. S., OLIVEIRA, C. Z., SOARES, A. M., GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J. Ethnopharmacol.**, 112: 490-497, 2007.

CAVALCANTI, B. C., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., BURBANO, R. R., SILVEIRA, E. R., CUNHA, K. M. A., RAO, V. S. N., MOURA, D. J., ROSA, R. M., HENRIQUES, J. A. P., PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in copaíba oil. **Food Chem. Toxicol.**, 44, 388-392, 2006.

CHABALA, J. C., MROZIK, H., TOLMAN, R. L., ESKOLA, P., LUSI, A., PETERSON, L. H., WOODS, M. F., FISHER, M. H., CAMPBELL, W. C., EGERTON, J. R., OSLIND, D. A. Ivermectin, a new broadspectrum antiparasitic agent. **J. Med. Chem.**, 23: 1134-1136, 1980.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.

CHIAPPETA, A. D. A., DE MELLO, J. F., MACIEL, G. M. Higher plants with biological activity - Plants of Pernambuco. **Rev. Inst. Antibiot.**, 21: 43-50, 1983.

COLEY, H. M., AMOS, W. B., TWENTYMAN, P. R., WORKMAN, P. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. **Br. J. Cancer**, 67: 1316-1323, 1993.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr. Cancer Ther.**, 3: 294-300, 2004.

COLDITZ, G. A., DEJONG, D., HUNTER, D. J., TRICHOPOULOS, D., WILLETT, W. C. Harvard report on cancer prevention. Volume 1. Causes of human cancer. **Cancer Causes Control**, 7: 1-59, 1996.

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

CONNOLLY J. D., HILL, R. A. **Dictionary of Terpenoids**. 1ed. London: Chapman & Hall/CRC, 1991. 2156p.

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

CULLEN, J. M., MILLER, R. T. The role of pathology in the identification of drug-induced hepatic toxicity. **Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.**, 2: 241-247, 2006.

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

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

DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P., TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, 13: 795-808, 1992.

DA SILVA, A. C., BALZ, D., DE SOUZA, J. B. D., MORSC, V. M., CORRÊA, M. C., ZANETTI, G. D., MANFRON, M. P., SCHETINGER, M. R. C. Inhibition of NTPDase, 50-nucleotidase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomed.**, 13: 509-514, 2006.

DA SILVA, S. L., CHAAR, J. S., DAMICO, D. C. S., FIGUEIREDO, P. M. S., YANO T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharm. Biol.**, 46: 347-351, 2008a.

DA SILVA, S. L., CALGAROTTO, A. K., CHAAR, J. S., MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Sw. aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, 52: 655-666, 2008b.

DA SILVA, S. L., CHAAR, J. S., FIGUEIREDO, P. M. S., YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, 38: 107-112, 2008c.

DA SILVA, S. L., CHAAR, J. S., YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Facourtiaceae). **Eur. J. Pharmacol.**, 608: 76-83, 2009.

DEININGER, M. W. N., GOLDMAN, J. M., MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, 96: 3343-56, 2000.

DENECKER, G., VERCAMMEN, D., STEEMANS, M., VANDEN BERGHE, T., BROUCKAERT, G., VAN LOO, G., ZHIVOTOVSKY, B., FIERS, W., GROOTEN, J., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. **Cell Death and Differentiation**, 8: 829-840, 2001.

DEWICK, P. M. **Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. Trease and Evans' pharmacognosy.** Londres: Saunders, 1996. p. 409-425.

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

DOLL, R., PETO, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. **J. Natl. Cancer Inst.**, 66:1191-308, 1981.

DZIBA L.E., HALL J.O., PROVENZA F.D. Feeding behavior of the lambs in relation to kinetics of 1.8-ceneole dosed intravenously or into the rumen. **J. Chem. Ecol.**, 32: 391-408, 2006.

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



EEC DIRECTIVE OF 1986. Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC).

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

ESPINDOLA, L. S., VASCONCELOS-JUNIOR, J. R., DE MESQUITA, M. L., MARQUIE, P., DE PAULA, J. E., MAMBU, L., SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Med.**, 70: 1093-1095, 2004.

ESSERS, J., VERMEULEN, W., HOUTSMULLER, A. B. DNA damage repair: anytime, anywhere? **Curr. Opin. Cell Biol.**, 18: 240-246, 2006.

ESTEVES, I., SOUZA, R. I., RODRIGUES, M., CARDOSO, L. G. V., SANTOS, L. S., SERTIE, J. A. A., PERAZZO, F. F., LIMA, L. M., SCHEEDORF, J. M., BASTOS, J. K., CARVALHO, J. C. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **J. Ethnopharmacol.**, 101: 191-196, 2005.

FAPESP-UNESP-USP. FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (São Paulo, SP), UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (Araraquara, SP) e UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (São Paulo, SP). Jayme Antônio Aboim Sertié, Ricardo Gomide Woisky do Rio, Alberto José Cavalheiro, Vanderlan da Silva Bolzani, André Gonzada dos Santos, Aristeu Gomes Tininis. Processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, processos de obtenção de frações ativas, extratos, frações ativas, uso de extratos e frações ativas, composição, unidade de dosagem, método para prevenir, tratar, combater ou suspender distúrbios gastrointestinais, medicamento e princípio ativo. BR n. PI 0306167-1, 18 dez. 2003.

FEHER, M., SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, 43: 218-227, 2003.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protocols**, 2: 1084 – 1104, 2007.

FERREIRA-MACHADO, S. C., RODRIGUES, M. P., NUNES, A. P. M., DANTAS, F. J. S., MATTOS, J. C. P., SILVA, C. R., MOURA, E. G., BEZERRA, R. J. A. C., CALDEIRA-ARAÚJO, A. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicol. Lett.**, 151, 481-487, 2004.

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.** 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

FERREIRA, P. M. P., CARVALHO, A. F. F. U, SOUSA, D. F., MAGALHÃES, J. F., MARTINS, A. R., MARTINS, M. A. C., QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **REPM**, 1: 45-57, 2007.

FERREIRA, P. M. P., CARVALHO, A. F. F. U., FARIAS, D. F., CARIOLANO, N. G., MELO, V. M. M., QUEIROZ, M. G. R., MARTINS, A. M. C., MACHADO-NETO, J. G. 2009. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 81: 207-216.

FERREIRA, P. M. P., FARIAS, D. F., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U. *Moringa oleifera*: Bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutr.**, 21: 431-437, 2008.

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

FORNARI, F. A., RANDOLPH, J. K., YALOWICH, J. C., RITKE, M. K., GEWIRTZ, D. A. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. **Mol. Pharmacol.**, 45: 649-656, 1994.

FREITAS, S. H., SÉBE, A. A., CAMARGO, L. M., SIMÕES, M. J. Alterações esplênicas em ratos após o clampeamento do pedículo hepático. **Arq. Inst. Biol.**, 66: 61, 1999.

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: 441-459, 2004.

GREM, J. L. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Semin. Radiat. Oncol.**, 7:249-259, 1997.

GRIMSLEY, C., RAVICHANDRAM, K. S. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't-eat-me and come-get-me-signals. **Trends Cell Biol.**, 13: 648-656, 2003.

HACK, C., LONGHI, S. J., BOLIGON, A. A., MURARI, A. B., PAULESKI, D. T. Análise fitossociológica de uma fragmento de floresta estacional decidual no município de Jaguari, RS. **Cienc. Rural**, 35: 1083-1091, 2005.

- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for calculation of EC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> values in bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, 7: 114-119, 1979.
- HARBOUR, J. W., LUO, R. X., DEI SANTI, A., POSTIGO, A. A., DEAN, D. C. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. **Cell**, 98: 859-869, 1999.
- HARTMANN, A., SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol. Lett.**, 90: 183-188, 1997.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAD, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A.R., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet 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: 3782-3784, 2003.
- HARRIS, A. L. Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. **Nature Rev. Cancer**, 2: 38-47, 2002.
- HEDDLE, J. A. A rapid *in vitro* test for chromosome damage. **Mutat. Res.**, 18, 187-190, 1973.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-76, 2000.
- HODGE, H. C., STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **Am. Ind. Hyg. Assoc.**, 10: 93-96, 1949.
- HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. 355p.
- HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A., NAKAMURA, C. V., FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 97: 1027-1031, 2002.
- HOUTGRAAF, J. H., VERSMISSEN, J., VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Revasc. Med.**, 7: 165-172, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2010. 100p.

ISMAEL, G. F. V., ROSA, D. D., MANO, M. S., AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Can. Trat. Rev.**, 34: 81-91, 2008.

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: 3384-3388, 1990.

JUNIOR, V. F. V., PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, 28(3): 519-528, 2005.

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

KARALLIEDDE, L. D., EDWARDS, P., MARRIS, T. C. Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. **Food Chem. Toxicol.**, 41: 1-13, 2003.

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

KAYE, J. A., MELO, J. A., CHEUNG, S. K., VAZE, M. B., HABER, J. E., TOCZYSKI, D. P. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. **Curr. Biol.**, 14, 2096-2106, 2004.

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

KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., EICHENLAUB-RITTER, U., DECODIER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol. Lett.**, 140-141: 63-74, 2003.

KRYSKO, D.V., BERGHE, T. V., D'HERDE, K., VANDENABEEL, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, 44: 205-221, 2008.

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

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiol.**, 15: 279-289, 2007.

LASSER, K. E., ALLEN, P. D., WOOLHANDLER, S. J., HIMMELSTEIN, D. U., WOLFE, S. M., BOR D. H. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. **JAMA**, 287: 2215-2220, 2002.

LEBEL, C. P., ISCHIROPOULOS, H., BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, 5: 227-231, 1992.

LI, H., ZHU, H., XU, C. J., YUAN, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, 94: 491-501, 1998.

LIOTTA, L. A., KOHN, E. C. The microenvironment of the tumourhost interface. **Nature**, 411: 375-379, 2001.

LITTLE, E. L., WADSWORTH, F. L. **Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands**. Washington: Department of Agriculture, 1964. 548p.

LOCKSHIN, R. A., WILLIAMS, C. M. Programmed cell death. The cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. **J. Insect. Physiol.**, 11: 123-133, 1965.

LUO, X., BUDIARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C., WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, 94: 481-490, 1998.

LYONS, A. S., PETRUCCELLI, R. J. **Medicine: an illustrated history**. Nova Iorque: Harry Adams, 1978. 511p.

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

McLACHLAN, S. A., MILLWARD, M. J., TONER, G. C., GUINEY, M. J., BISHOP, J. F. The spectrum of 5-fluorouracil cardiotoxicity. **Med. J. Australia**, 161:207-209, 1994.

MAGALHÃES, H. I. F., FERREIRA, P. M. P., MOURA, E. S., TORRES, M. R., ALVES, A. P. N. N., PESSOA, O. D. L., COSTA-LOTUFO, L. V., MORAES, M. O., PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 82: 407-416, 2010.

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. Vitro**, 18: 337-342, 2004.

MALUMBRES, M., BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Rev. Cancer**, 9: 153-166, 2009.

MARINHO-FILHO, J. D. B., BEZERRA, D. P., ARAÚJO, A. J., MONTENEGRO, R. C., PESSOA, C., DINIZ, J. C., VIANA, F. A., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, 183: 369-379, 2010.

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.

MATTOS, E. S, FREDERICO, M. J. S., COLLE, T. D., PIERI, D. V., PETERS, R. R., PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **J. Ethnopharmacol.**, 112: 1-6, 2007.

MELO, J. V., HUGHES, T. P., APPERLEY, J. F. Chronic Myeloid Leukemia. **Hematol.**, 2003;132-52.

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

MESQUITA, M. L., DESRIVOT, J., BORIES, C., FOURNET, A., PAULA, J. E., GRELLIER, P., ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 100: 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L., GRELLIER, P., MAMBU, L., DE PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, 110: 165-170, 2007.

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.**, 78:2409-2417, 2006.

MONTEIRO, C. A., CONDE, W. L. A tendência secular da obesidade segundo estratos sociais: nordeste e sudeste do Brasil, 1975-1989-1997. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, 43: 186-194, 1999.

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., ANBURY, 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.

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.

NOORDHUIS, P., HOLWERDA, U., VAN DER WILT, C. L., VAN GROENINGEN, C. J., SMID, K., MEIJER, S., PINEDO, H. M., PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Ann. Oncol.**, 15: 1025-1032, 2004

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.

O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T., POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, 267: 5421-5426, 2000.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guidelines for testing of chemicals**. Paris: OECD, 1996.

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: 3022-3032, 1998.

OLIVEIRA, A. M., SANTOS, A. G., SANTOS, R. A., CSIPAK, A. R., OLIVATO, C., SILVA, I. C., FREITAS, M. B., BASSI, C. L., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. S., SILVA, D. H. S., SAKAMOTO-HOJO, E. T., TAKAHASHI, C. S., SOARES, C. P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, 24: 501-506, 2009.

OLSON, H., BETTON, G., ROBINSON, D., THOMAS, K., MONRO, A., KOLAJA, G., LILLY, P., SANDERS, J., SIPES, G., BRACKEN, W., DORATO, M., VAN DEUN, K., SMITH, P., BERGER, B.,

HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, 32: 56-67, 2000.

ORTIZ DE MONTELLANO, P. R., DE VOSS, J. J. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. **Nat. Prod. Rep.**, 19: 477-493, 2002.

PADERA, T. P., STOLL, B. R., TOOREDMAN, J. B., CAPEN, D., DI TOMASO, E., JAIN, R. K. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. **Nature**, 427: 695, 2004.

PAES-LEME, A. A., MOTTA, E. S., MATTOS, J. C. P., DANTAS, F. J. S., BEZERRA, R. J. A. C., CALDEIRA-ARAÚJO, A. Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. **J. Ethnopharmacol.**, 102, 197-201.

PEREIRA, F. B. C., CHAVES, F. B. Evolution of Sarcoma 180 in mice treated with hyperchlorinated water. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78: 209-214, 1983.

PETER, A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, 54: 801-840, 1997.

RANGARAJAN, A., WEINBERG, R. A. Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice. **Nature Rev. Cancer**, 3: 952-959, 2003.

RALPHS, M. H., GARDNER, D. R., PFISTER, J. A. A functional explanation for patterns of norditerpenoid alkaloid levels in tall larkspur (*Delphinium barbeyi*). **J. Chem. Ecol.**, 26: 1595-1607, 2000.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food Chem. Toxicol.**, 45: 1551-1557, 2007.

RAMIREZ, A., SALDANHA, P. H. Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas. **Genet. Mol. Res.**, 1: 246-260, 2002.

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.

REHEN, S. K. Ciclo Celular in: CARVALHO, H. F., RECCO-PIMENTEL, S. M. (Org.). **A célula**. Barueri: Manole, 2007.p. 304-308.



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

RICCI, M. S., ZONG, W. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The Oncologist**, 11: 342-357, 2006.

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

RODRIGUES, A. M. S., DE PAULA, J. E., DEGALLIER, N., MOLEZ, J. F., ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, 22: 314-317, 2006.

ROYCE, M. E., ROWINSKY, E. K., HOFF, P. M., COYLE, J., DE JAGER, R., PAZDUR, R., SALTZ, L. B. A phase II study of intravenous exatecan mesylate (DX-8951f) administered daily for five days every three weeks to patients with metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. **Investigat. New Drugs**, 22: 53-61, 2004.

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. Osw. Cruz**, 86: 203-235, 1991.

SACHER, R. A., McPHERSON, R. A. **Widmann's clinical interpretation of laboratory tests**. Washington: Davis Company, 2000. 1090p.

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

SANTOS, A. G., PEREZ, C. C., TININIS, A. G., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Quim. Nova**, 30: 1100-1103, 2007.

SANTOS, C. R. B., PORTELLA, E. S., ÁVILA, S. S., SOARES, E. A. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Rev. Nutr.**, 19: 389-401, 2006.

SARTO, F., FINOTTO, S., GIACOMELLI, L., MAZZOTTI, D., TOMANIN, R., LEVIS, A. G. The Micronucleus Assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, 2: 11-17, 1987.

SASAKI, Y. F., SEKIHASHI, K., IZUMIYAMA, F., NISHIDATE, E., SAGA, A., ISHIDA, K., TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemical selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Crit. Rev. Toxicol.**, 30: 629-799, 2000.

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: 637-641, 2004.

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

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

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

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

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutat. Res.**, 31: 9-15, 1975.

SCHOENFELDER, T., PICH, C. T., GEREMIAS, R., ÁVILA, S., DAMINELLI, E. M., PEDROSA, R. C., BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia** 79: 465-467, 2008.

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.

SHAPIRO, H. M. Overture. In: SHAPIRO, H. M. (Org.). **Practical Flow Cytometry**. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.p. 1-32.

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: 108-110, 2004.

SINGH, M. P., MCCOY, M., TICE, R. R., SCHINEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Exp. Cell Res.**, 175: 184-191, 1988.

SIMÕES, C. M. O., AMOROS, M., GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomed.**, 6: 205-214, 1999.

SORTIBRÁN, A. N. C., TÉLLEZ, M. G. O., RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. R. Gentotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss somatic eye assay of *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, 604: 83-90, 2006.

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

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Nova Odessa - Instituto Plantarum, 640p. 2005.

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, J. 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.

SYLVESTRE, M., LEGAULT, J., DUFOUR, D., PICHETTE, A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomed.**, 12: 299-304, 2005.

TANNOCK, I. F., ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Res.**, 49: 4373-4384, 1989.

TATMAN, D., MO, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Lett.**, 175: 129-139, 2002.

TICE, R.R., AGUERRÍ, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for in Vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, 35, 206-221, 2000.

TOKARNIA, C. H., DOBEREINER, H., PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, 40: 1635–1660, 2002.

TOLBERT, P. E., SHY, C. M., ALLEN, J. W. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears: Methods development. **Mutat. Res.**, 271: 69-77, 1992.

TORRES, R. B., YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Rev. Bras. Bot.** 9: 239-258, 1986.

TRAPP, S. C., CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications, **Genetics**, 158: 811-832, 2001.

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.

VALADARES, M. C., KLEIN, S. I., GUARALDO, A. M. A., QUEIROZ, M. L. S. Enhancement of natural killer cell function by titanocenesin mice bearing Ehrlich ascites tumor. **Eur. J. Pharmacol.**, 473: 191-196, 2003.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immun. Meth.**, 184: 39-51, 1995.

VIEIRA-JUNIOR, G. M., GONÇALVES, T. O., REGASINI, L. O., FERREIRA, P. M. P., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L. V., TORRES, R. B., BORALLE, N., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. **J. Nat. Prod.**, 72: 1847-1850, 2009.

YAMAMOTO, N., ZOU, J. P., LI, X. F., TAKENAKA, H., NODA, S., FUJII, T., ONO, S., KOBAYASHI, Y., MUKAIDA, N., MATSUSHIMA, K., FUJIWARA, H., HAMAOKA, T. Regulatory mechanisms for production of IFN-g and TNF by antitumor T-cells or macrophages in the tumor-bearing state. **J. Immunol.**, 154: 228-2290, 1995.

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 Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, 88:3888-3890, 1966.

WANG, W., ZHAO, J., WANG, Y-H., SMILLIE, T. A., LI, X-C., KHAN, I. A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med.**, 75: 1436-1441, 2009a.

WANG, W., ALI, Z., LI, X-C., SMILLIE, T. A., GUO, D-A., KHAN, I. A. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, 80: 404-407, 2009b.

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

WAYNFORTH, B. H. **Injection Techniques: Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980. 61 p.

WEISS, R. B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Seminars Oncol.**, 19: 670-686, 1992.

WERLE, A. L., B., ZANETTI, G. D., CERON, C, S., MANFRON, M. P. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz. (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 19: 400-402, 2009.

WILLIAMS, D. P., KITTINGHAM, N. R., NAISBITT, D. J., PIRMOHAMED, M., SMITH, D. A., PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Curr. Drug Metab.**, 3: 351-366, 2002.

WILLIAMS, R. B., NORRIS, A., MILLER, J. S., BIRKINSHAW, C., RATOVOSON, F., ANDRIANTSIFERANA, R., RASAMISON, V. E., KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. **J. Nat. Prod.**, 70: 206-209, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional Medicine, Fact sheet No. 134, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quick Cancer Facts. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso: 15 abr. 2009.

ZHANG, Y., LIU, J., JIA, W., ZHAO, A., LI, T. Distinct immunosuppressive effect by *Isodon* extracts. **Int. Immunopharmacol.**, 5: 1957-1965, 2005.

ZIEGLER U, GROSCURTH, P. Morphological features of Cell Death. **News Physiol. Sci.**, 19: 124-128, 2004.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M., TORRES-BUGARÍN, O., ZAMORA-PEREZ, A. L., GÓMEZ-MEDA, B. C., RAMOS-IBARRA, M. L., GALLEGOS-ARREOLA, P., FLORES-GARCÍA, A., LÓPEZ-URIBE, A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-fluorouracil. **Arch. Med. Res.**, 34: 141-144, 2003.

**ANEXO A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA - UFC).**



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa Animal - CEPA  
Campus Parnaíba - Av. Fátima, 112 - Parnaíba - Ceará  
Cep: 63000-070 Parnaíba - CE  
Tel: (88) 3344-2000 Fax: (88) 3344-2000

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 2008 sobre o projeto intitulado "Extração de células Anticósmicas de vírus compostos isolados na clareira causada por ventos fortes", de responsabilidade de Paulo Michel Pereira Ferreira, está em acordo com os Preceitos Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Legislação Animal (COLBRA).

Dichlorodiphenyl dimethyl urea (DDP) foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 7h de junho de 2008.

Parnaíba, 25 de junho de 2008.

  
Profa. Dra. Geanete Matos de Andrade Cunha  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

## Casearin X, Its Degradation Product and Other Clerodane Diterpenes from Leaves of *Casearia sylvestris*: Evaluation of Cytotoxicity against Normal and Tumor Human Cells

by André Gonzaga dos Santos<sup>a)</sup>, Paulo Michel Pinheiro Ferreira<sup>b)</sup>, Gerardo Magela Vieira Júnior<sup>a)</sup>, Carla Cristina Perez<sup>a)</sup>, Aristeu Gomes Tininis<sup>a)</sup>, Geraldo Humberto Silva<sup>b)</sup>, Vanderlan da Silva Bolzani<sup>a)</sup>, Leticia Veras Costa-Lotuf<sup>c)</sup>, Cláudia do O Pessoa<sup>c)</sup>, and Alberto José Cavaleiro<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Instituto de Química, São Paulo State University, CP 355, 14800-900, Araraquara-SP, Brazil  
(phone: +55-16-33016667; fax: +55-16-33016692; e-mail: albjcava@iq.unesp.br)

<sup>b)</sup> Centro de Ciências da Saúde, *Campus* Senador Helvécio Nunes de Barros (CSHNB), Universidade Federal do Piauí, 64600-000, Picos-PI, Brazil

<sup>c)</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, CP 3157, 60430-270, Fortaleza-CE, Brazil

An EtOH extract of the leaves of *Casearia sylvestris* afforded new clerodane diterpene, casearin X, together with the known compounds casearins B, D, L, and O, and caseargrewiin F. Casearin X degraded to the corresponding dialdehyde when stored in CDCl<sub>3</sub>. The diterpenes isolated were cytotoxic to human cancer cell lines, with caseargrewiin F being the most active and the new clerodane, casearin X, the second active compound with *IC*<sub>50</sub> values comparable to the positive control doxorubicin. All isolated diterpenes showed lower activities against normal human cells than against cancer cell lines, which might indicate a possible selective action on cancer cells. Casearin X dialdehyde was not cytotoxic to cancer cells indicating that the occurrence of these CO groups at C(18) and C(19) is incompatible with the cytotoxic activity.

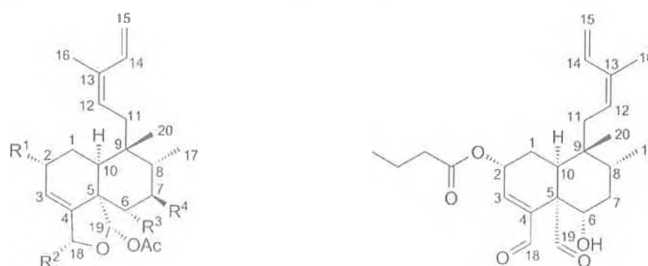
**Introduction.** – *Casearia sylvestris* SWARTZ. (*Salicaceae*), commonly known as guaçatonga, is widely distributed in the form of a shrub or tree throughout South America, but especially within the Atlantic and Amazon forests and the Cerrado biomes of Brazil [1]. The plant is of considerable scientific interest by virtue of its extensive use in popular and traditional medicine for the treatment of snake bites and in wound healing, and also as an anti-ulcer, anti-pyretic, and topical antiseptic [2][3]. Pharmacological studies on leaf extracts of *C. sylvestris* have confirmed anti-ulcerogenic [4][5], anti-inflammatory [6], antivenom [7][8], and cytotoxic activities [9][10]. Additionally, no significant toxicological effects have been observed following oral administration of EtOH extracts of *C. sylvestris* leaves to animals [4], and no genotoxicity was detected when such extracts were assayed against hepatoma tissue culture (HTC) and lung fibroblast V-79 cells [11].

Phytochemical investigations of various species of *Casearia* have revealed the presence of a series of oxygenated tricyclic *cis*-clerodane diterpenes in which the tetrahydrofuran ring bears two acyloxy groups at C(18) and C(19) [12–21]. Such compounds are reportedly unstable under acidic conditions and readily degrade to form the corresponding dialdehyde [16]. The casearins A–T, isolated from the leaves



of *C. sylvestris*, represent a group of diterpenes of this type that are cytotoxic to V-79 cells in transgenic Chinese hamsters, 180A sarcoma cells implanted into rats, and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* [9][10][17]. A number of related diterpenes, the casearvestrins A–C, have been isolated from the leaves and branches of *C. sylvestris* and found to exhibit anti-fungal activity against *Aspergillus niger* and cytotoxicity against human oral epidermoid carcinoma KB cell lines [18], whilst the roots of the same plant contain a similar type of diterpene with trypanosomicidal properties [19]. Moreover, less complex clerodane diterpenes, such as (+)-15-hydroxy-3-cleroden-2-one and (–)-hardwickiic acid [20], have been identified in the leaves of *C. sylvestris*. These compounds differ from the casearins with respect to the pattern of oxygenation and also in the configuration of the A/B ring junction, and between the Me(17) and Me(20) groups. It thus appears that *C. sylvestris* can biosynthesize both *cis*- and *trans*-clerodane diterpenoids, a characteristic that is common to various other species including *Adelanthus lindenbergianus* (Adelantaceae) and *Grangea maderaspata* (Asteraceae) [22][23].

In the present article, we report on the isolation of five casearins (including the new casearin X (1)) and of caseargrewiin F (6) from the EtOH extracts of the leaves of *C. sylvestris*, and on the formation of the degradation product of casearin X, 7. The structures of the compounds were determined from spectrometric data and by comparison with spectral information available in the literature. The cytotoxicities of these compounds against human cancer and normal cell lines are also reported.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
Casearin X (1) <sup>1)</sup>	PrCO <sub>2</sub>	PrCO <sub>2</sub>	OH	H
Casearin B (2) <sup>1)</sup>	MeO	AcO	AcO	PrCO <sub>2</sub>
Casearin D (3) <sup>1)</sup>	OH	PrCO <sub>2</sub>	OH	PrCO <sub>2</sub>
Casearin L (4) <sup>1)</sup>	MeO	PrCO <sub>2</sub>	AcO	OH
Casearin O (5) <sup>1)</sup>	MeO	PrCO <sub>2</sub>	AcO	PrCO <sub>2</sub>
Caseargrewiin F (6) <sup>1)</sup>	PrCO <sub>2</sub>	AcO	OH	H

7<sup>1)</sup>

**Results and Discussion.** – *Isolation and Structure Determination.* Fractionation of the EtOH extract of the leaves of *C. sylvestris* by solid-phase extraction (SPE) from silica gel/activated charcoal, followed by normal-phase low pressure column chromatography (LPCC) over silica gel and preparative reversed-phase (*C*<sub>18</sub>) HPLC, allowed the purification of a new clerodane diterpene (1) together with the known compounds 2–6 [9][10][21].

<sup>1)</sup> Arbitrary numbering. For systematic names, see *Exper. Part*.

Compound **1**, obtained as a white powder, was submitted to high-resolution time-of-flight-electrospray ionization mass spectrometry (HR-TOF-ESI-MS) in the positive-ion mode and exhibited  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  ions with masses 555.2931 and 571.2659, respectively, that were consistent with the values 555.2928 and 571.2668, respectively, calculated on the basis of an empirical formula of  $C_{30}H_{44}O_8$  for the molecular ion. The  $^{13}C$ -NMR of **1** presented 30 signals that were similar to those reported for other casearins [9][10][17][20]. A broad band in the IR at  $3490\text{ cm}^{-1}$ , together with  $^{13}C$ - and  $^1H$ -NMR signals at  $\delta(C)$  72.9 (C(6 $^{13}$ )) and  $\delta(H)$  4.16 (*dd*,  $J=11.0, 5.0$ ; H-C(6)), respectively, indicated the presence of a HO-CH group in the molecule. Similarly, an IR absorbance at  $1752\text{ cm}^{-1}$  and  $^{13}C$  signals at  $\delta(C)$  170.0, 173.3, and 173.4 suggested the presence of one AcO and two butanoate ester groups, respectively (Table 1). The absorption band at 235 nm in the UV spectrum is characteristic of a conjugated diene in the side chain of the casearins [9][10][17][20], the presence of which was confirmed from signals observed in the olefinic region of the  $^1H$ -NMR showing *cis/trans* coupling of the  $CH_2$  H-atoms of a terminal monosubstituted C=C bond ( $\delta(H)$  5.11 (*d*,  $J=11.0$ , H<sub>a</sub>-C(15 $^{13}$ )), 5.24 (*d*,  $J=17.0$ , H<sub>b</sub>-C(15 $^{13}$ ))) with the vicinal H-atom ( $\delta(H)$  6.79 (*dd*,  $J=17.0, 11.0$ , H-C(14 $^{13}$ ))), and a signal at  $\delta(H)$  5.62 (*d*,  $J=9.0$ , H-C(12 $^{13}$ )) which could be attributed to the H-atom attached to a trisubstituted C=C bond of a conjugated diene. The partial structure formed by the side chain linked at C(9) was confirmed from the observed HMBC correlations between H-C(11) and C(12), H-C(12) and C(13)/C(16), H-C(14) and C(16), H-C(15) and C(13), and Me(16) and C(13), together with the COSY correlations shown in the Figure. The (*Z*)-configuration of the C=C bond at C(12) was determined on the basis of the nuclear Overhauser (NOESY) effect observed between Me(16) and H-C(12).

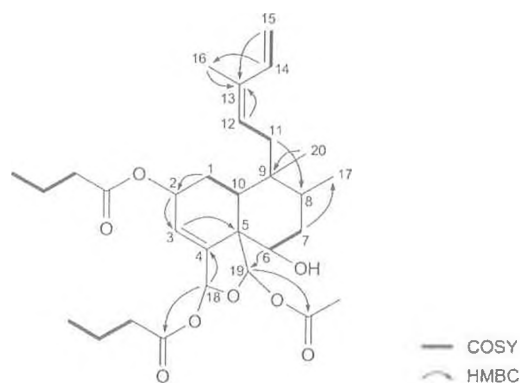


Figure. Selected HMBC and COSY correlations observed for **1**)

The signals of the O-bearing CH groups at  $\delta(C)$  97.3 (C(18)) and 99.2 (C(19)), and of the two H-atoms at  $\delta(H)$  7.14 (*s*, H-C(19)) and 7.43 (*t*,  $J=1.5$ , H-C(18)) indicated the existence of a diacetal system in the C ring. Moreover, HMBCs (Figure) between H-C(18) and the CO group of one butanoate group ( $\delta(C)$  173.4), and between

Table 1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Data for Compounds 1 and 7<sup>a)</sup>

	Casearin X (1) <sup>a)</sup>		Casearin X dialdehyde (7) <sup>b)</sup>	
	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$ (multiplicity, $J$ [Hz])	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$ (multiplicity, $J$ [Hz])
1	27.6 ( <i>t</i> )	2.04–2.08 ( <i>m</i> ), 2.10–2.14 ( <i>m</i> )	26.8 ( <i>t</i> )	n.d. <sup>c)</sup>
2	67.4 ( <i>d</i> )	5.71 ( <i>t</i> , $J=4.5$ )	64.9 ( <i>d</i> )	5.05–5.19 ( <i>m</i> )
3	121.6 ( <i>d</i> )	6.32 ( <i>d</i> , $J=4.5$ )	123.7 ( <i>d</i> )	6.95–6.97 ( <i>m</i> )
4	147.8 ( <i>s</i> )		147.4 ( <i>s</i> )	
5	54.8 ( <i>s</i> )		56.2 ( <i>s</i> )	
6	72.9 ( <i>d</i> )	4.16 ( <i>dd</i> , $J=11.0, 5.0$ )	72.3 ( <i>d</i> )	3.74 ( <i>dd</i> , $J=11.5, 5.5$ )
7	38.1 ( <i>t</i> )	1.86–1.94 ( <i>m</i> )	37.0 ( <i>t</i> )	n.d.
8	37.0 ( <i>d</i> )	n.d.	39.9 ( <i>d</i> )	n.d.
9	38.6 ( <i>s</i> )		38.3 ( <i>s</i> )	
10	37.7 ( <i>d</i> )	2.74 ( <i>dd</i> , $J=13.5, 3.5$ )	36.4 ( <i>d</i> )	2.31–2.34 ( <i>m</i> )
11	30.0 ( <i>t</i> )	1.88–1.94 ( <i>m</i> ), 2.47 ( <i>dd</i> , $J=16.0, 9.0$ )	30.1 ( <i>t</i> )	1.59–1.64 ( <i>m</i> )
12	128.4 ( <i>d</i> )	5.62 ( <i>d</i> , $J=9.0$ )	124.3 ( <i>d</i> )	5.46–5.49 ( <i>m</i> )
13	134.0 ( <i>s</i> )		135.1 ( <i>s</i> )	
14	134.4 ( <i>d</i> )	6.79 ( <i>dd</i> , $J=17.0, 11.0$ )	133.5 ( <i>d</i> )	6.59 ( <i>dd</i> , $J=17.0, 11.0$ )
15	114.6 ( <i>t</i> )	5.11 ( <i>d</i> , $J=11.0$ ), 5.24 ( <i>d</i> , $J=17.0$ )	114.4 ( <i>t</i> )	5.07 ( <i>d</i> , $J=11.0$ ), 5.16 ( <i>d</i> , $J=17.0$ )
16	20.7 ( <i>q</i> )	1.82 ( <i>s</i> )	20.3 ( <i>q</i> )	1.77 ( <i>s</i> )
17	16.1 ( <i>q</i> )	0.86 ( <i>d</i> , $J=7.5$ )	15.8 ( <i>q</i> )	0.90 ( <i>d</i> , $J=7.5$ )
18	97.3 ( <i>d</i> )	7.43 ( <i>t</i> , $J=1.5$ )	195.7 ( <i>d</i> )	9.92 ( <i>d</i> , $J=2.0$ )
19	99.2 ( <i>d</i> )	7.14 ( <i>s</i> )	202.6 ( <i>d</i> )	9.38 ( <i>s</i> )
20	25.5 ( <i>q</i> )	0.85 ( <i>s</i> )	25.6 ( <i>q</i> )	0.84 ( <i>s</i> )
MeCO <sub>2</sub> -C(19)	22.0 ( <i>q</i> )	2.03 ( <i>s</i> )		
	170.0 ( <i>s</i> )			
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> -C(18)	13.8 ( <i>q</i> )	0.82 ( <i>t</i> , $J=7.5$ )	13.6 ( <i>q</i> )	0.92 ( <i>t</i> , $J=7.0$ )
	18.9 ( <i>t</i> )	1.55–1.64 ( <i>m</i> )	18.2 ( <i>t</i> )	1.58–1.62 ( <i>m</i> )
	36.7 ( <i>t</i> )	2.28–2.32 ( <i>m</i> )	36.2 ( <i>t</i> )	2.26 ( <i>t</i> , $J=7.0$ )
	173.4 ( <i>s</i> )		176.6 ( <i>s</i> )	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub> -C(2)	14.0 ( <i>q</i> )	0.87 ( <i>t</i> , $J=7.4$ )		
	19.2 ( <i>t</i> )	1.55–1.64 ( <i>m</i> )		
	36.7 ( <i>t</i> )	2.16–2.20 ( <i>m</i> )		
	173.3 ( <i>s</i> )			

<sup>a)</sup> Spectra were collected in (D<sub>5</sub>)pyridine. <sup>b)</sup> Spectra were collected in CDCl<sub>3</sub>. <sup>c)</sup> n.d. = not determined.

H–C(19) and the CO group of an AcO group ( $\delta(\text{C})$  170.0) defined the positions of these substituents. The second butanoate group was attached to the C-atom displaying a signal at  $\delta(\text{C})$  67.4 (C(2)).

The relative configurations at the eight stereogenic centers were determined from  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data,  $^1\text{H}$ -NMR coupling constants, and the results of NOE and NOESY experiments. The *cis*-configuration of the A/B ring junction was deduced from the chemical shift ( $\delta(\text{C})$  25.5) of the Me(20) group in accordance with previous reports [15][24][25]. The chemical shifts of C(5) and C(10) ( $\delta(\text{C})$  54.8 and 37.7, resp.) were similar to those described for the casearins and analogous compounds [9][10][26]. Moreover, the values of the coupling constants ( $J=3.5$  and  $13.5$  Hz) of the *doublet* of *doublets* at  $\delta(\text{H})$  2.74 suggested that H–C(10) was in axial orientation. Finally, nuclear

*Overhauser* (NOESY) effects between H–C(10) and H–C(12), and H–C(11) and H–C(19), indicated a similar orientation for the side chain at C(9).

In general, *cis*-clerodane diterpenes that are not substituted at positions C(7), C(8), C(10), C(11), and C(12) exhibit chemical shifts around  $\delta(\text{C})$  15.0 and 26.0 for the Me(17) and Me(20) groups, respectively, in the *trans* configuration [13][26–28], and values of *ca.*  $\delta(\text{C})$  16.0 and 18.0, respectively, for Me(17) and Me(20) groups in the *cis* configuration [20][21][28–30]. Casearins substituted at C(7) present chemical shifts for the Me(17) and Me(20) groups of *ca.*  $\delta(\text{C})$  11.0 and 26.0, respectively, which are most likely caused by the  $\gamma$  shielding effect of the O-bearing substituent at C(7) [9][10]. Casearvestrins are not substituted at C(7), which explains the chemical shift value of  $\delta(\text{C})$  15.6 reported for C(17) [18]. In the case of **1**, which has no substituent at C(7), the signals at  $\delta(\text{C})$  16.1 and 25.5 (associated with the Me(17) and Me(20) groups, resp.) indicate a *trans* relationship between Me(17) and Me(20).

The chemical shift of  $\delta(\text{C})$  67.4 for the O-bearing H–C(2) group, and the coupling constant observed for the allylic H-atom H–C(2) ( $\delta(\text{H})$  5.71, *t*,  $J=4.5$ ), are consistent with a  $\beta$ -*pseudo*-equatorial orientation of H–C(2) [13][19][26]. Furthermore, the observed nuclear *Overhauser* (NOESY) effects between H–C(2) and  $\text{H}_\beta$ –C(1) ( $\delta(\text{H})$  2.10–2.14 (*m*)), and H–C(6) and  $\text{H}_\beta$ –C(1), suggest that these H-atoms possess the same  $\beta$ -orientation. The 1,2-diaxial coupling of H–C(6) with  $\text{CH}_2(7)$ , implied by the value of the coupling constant (11.0 Hz) for H–C(6), confirms the  $\alpha$ -equatorial position of the OH group. The observed homoallylic coupling ( $^3J$ ) between H–C(18) ( $\delta(\text{H})$  7.43 (*t*,  $J=1.5$ )) and H–C(2) requires that the  $\pi$ -orbitals of the C=C bond overlap with the 1s orbitals of the H-atoms thus implying a  $\beta$ -orientation for H–C(18) [12]. Finally, the nuclear *Overhauser* effect between H–C(18) and H–C(19) confirms the  $\alpha$ -orientation of the butanoate group at C(18) and the AcO group at C(19).

The  $^{13}\text{C}$ -NMR data (recorded in ( $\text{D}_5$ )pyridine) for **2** ( $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$ ), **3** ( $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_9$ ), **4** ( $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_9$ ), **5** ( $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_{10}$ ), and **6** ( $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$ ) were comparable with those previously determined in  $\text{CDCl}_3$  [9][10][21]. Additional spectral data (UV, IR, HR-MS,  $^1\text{H}$ -NMR, HMBC, COSY, and NOESY) confirmed the structures of these compounds.

*Formation and Structure Elucidation of Casearin X Dialdehyde 7.* Some authors have reported, on the basis of NMR experiments, that clerodane diterpenes similar to the casearins are unstable in  $\text{CHCl}_3$  and undergo opening of the diacetal ring with the formation of an 18,19-dialdehyde [16][18]. In this context, the caseamembrins F, J, and K isolated from *C. membranaceae* which are considered to be natural products [14][26], are most likely artefacts generated by the use of  $\text{CHCl}_3$ . In the present study, the NMR spectra of **1** measured in  $\text{CDCl}_3$  presented signals of two aldehydic H-atoms replacing the H-atoms of the diacetal ring. When the stability over a period of one month of **1** dissolved in five different deuterated solvents (*i.e.*  $\text{CDCl}_3$ , ( $\text{D}_6$ )DMSO, ( $\text{D}_6$ )acetone,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , and ( $\text{D}_5$ )pyridine) was studied, degradation was detected only in  $\text{CDCl}_3$ . It is probable that the formation of **7** from **1** was promoted by traces of acid present in  $\text{CDCl}_3$  [16], and for this reason all further NMR experiments were conducted with ( $\text{D}_5$ )pyridine as solvent.

Compound **7**, obtained as a white powder, exhibited an  $[M+H]^+$  ion in the positive-ion mode HR-TOF-ESI-MS with a mass of 403.2484 that was consistent with the value of 403.2484 calculated on the basis of an empirical formula of  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$  for

the molecular ion. The difference in the molecular formulae of **1** and **7** was consistent with the loss of a butanoate and an AcO group and the formation of a dialdehyde at positions 18 and 19<sup>1</sup>). The <sup>13</sup>C-NMR data (including DEPT-135) of the dialdehyde recorded in CDCl<sub>3</sub> were similar to those of **1** measured in (D<sub>5</sub>)pyridine, except of the signals of the diacetal C-atoms at C(18) and C(19) which were substituted by signals associated with aldehydic CO groups with signals at  $\delta$ (C) 195.7 (*d*) and 202.6 (*d*), respectively. Similar differences were observed in the <sup>1</sup>H-NMR spectrum in which the signals associated with H–C(18) and H–C(19) appeared in the aldehydic region, *i.e.*,  $\delta$ (H) 9.92 (*d*, *J* = 2.0) and 9.38 (*s*), respectively. The structure and relative configuration of **7** was determined on the basis of data derived from 1D- and 2D-NMR experiments (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT-135 and -90, HMQC, HMBC, COSY, and NOESY) in a manner similar to that described above for casearin X.

Compound **7** is an isomer of caseanigrescens D-2, a degradation product of caseanegrescens D from *C. Nigrescens* [16], and the two aldehydes differ only with respect to the position of the conjugated diene in the side chain, being  $\Delta^{12,14}$  in the former and  $\Delta^{13(16),14}$  in the latter.

**Cytotoxicity against Tumor Cell Lines.** The isolated compounds **1–7** were evaluated for their cytotoxicities against the four human tumor cell lines MOLT-4 (leukaemia), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (colon), and SF-295 (glioblastoma), and against L-929 (normal fibroblasts). The *IC*<sub>50</sub> values displayed in Table 2 reveal that **6** was the most active of the compounds tested, showing stronger cytotoxicity against all tumor cell lines (*IC*<sub>50</sub> < 0.2  $\mu$ M) compared to normal L-929 cells (*IC*<sub>50</sub> = 1.09  $\mu$ M). These values are quite similar to those obtained to the positive control doxorubicin, that presented *IC*<sub>50</sub> values ranging from 0.02 to 0.83  $\mu$ M to tumor cells, and 1.2  $\mu$ M to L-929 cells. Considering the selectivity towards tumor cells, compound **6** was 12.1 times more active against MOLT-4 cells than against L-929, while doxorubicin was 24 times. However, if it was considered for example breast and glioblastoma cells, while doxorubicin was only 1.4 and 3.0 times more active in tumor cells, **6** was 8.4 and 6.4 times more active, respectively. In the previous evaluation of cytotoxicity against cancer cell lines, compound **6** was inactive against KB cells (oral epidermoid carcinoma), showed significant cytotoxicity against BC1 cells (human breast cancer) and minor activity against NCI-H187 cells (human small cell lung cancer) [21]. Further studies are necessary to establish the selectivity profile for this compound. Whilst **1** is not as cytotoxic as **6**, it exhibited a good anti-proliferative potential against tumor cells (*IC*<sub>50</sub> < 1  $\mu$ M). Compounds **2–5** displayed only moderate cytotoxicities, although it is worth noting that, in every case, cytotoxicity against normal cells was lower than that against tumor cells, indicating a possible selective action on cancer cells. Compound **7**, on the other hand, was ineffective against most of the tumor lines. Additionally, none of the compounds tested caused haemolysis even at the highest concentration (200  $\mu$ g/ml), suggesting that the mechanism of cytotoxicity is probably related to a more specific pathway.

Cytotoxic activities against human tumor cell lines have been studied for other clerodane diterpene 18,19-dialdehydes obtained from species of *Casearia*. Thus, caseamembrin F was found to be cytotoxic to PC-3 (prostate cancer) cells but not to Hep3B (hepatoma) cells [26]. Moreover, the caseamembrins J and K exhibited no cytotoxicity against KB (oral epidermoid carcinoma), HeLa (cervical epithelial

Table 2. Cytotoxic Activities of Clerodane Diterpenes Isolated from the Leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ and *Casearin X Dialdehyde* against Human Cancer and Normal Cell Lines Determined by MTT Assay

	L-929	MOLT-4	MDA/MB-435		HCT-8		SF-295		
	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Sel. <sup>a)</sup>	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Sel.	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Sel.	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Sel.
Doxorubicin <sup>b)</sup>	1.20 (0.92–1.38) <sup>c)</sup>	0.05 (0.03–0.08)	24.0	0.83 (0.57–1.10)	1.4	0.02 (0.02–0.03)	60.0	0.40 (0.32–0.42)	3.0
1	1.52 (1.17–1.98)	0.22 (0.18–0.31)	6.9	0.35 (0.34–0.38)	4.3	0.97 (0.88–1.03)	1.6	0.43 (0.35–0.50)	3.5
2	6.50 (4.35–9.70)	1.44 (0.71–2.93)	4.5	1.75 (1.42–2.15)	3.7	5.11 (4.41–5.92)	1.3	2.70 (2.06–3.52)	2.4
3	3.59 (3.06–4.10)	0.54 (0.25–1.16)	6.6	1.29 (1.13–1.42)	2.8	2.80 (2.39–3.20)	1.3	1.53 (1.26–1.82)	2.3
4	29.87 (25.85–34.41)	3.57 (1.72–7.40)	8.4	7.67 (5.61–10.48)	3.9	16.93 (15.01–18.95)	1.8	25.51 (13.66–46.80)	1.2
5	18.53 (14.69–23.99)	10.34 (7.05–14.01)	1.8	6.63 (5.23–8.42)	2.8	11.59 (8.80–15.27)	1.6	17.30 (14.24–20.99)	1.1
6	1.09 (0.85–1.15)	0.09 (0.04–0.16)	12.1	0.13 (0.11–0.13)	8.4	0.15 (0.13–0.16)	7.3	0.17 (0.14–0.18)	6.4
7	>62.1	>62.1	nc <sup>d)</sup>	52.61 (48.31–57.30)	nc	34.48 (31.30–37.98)	nc	>62.1	nc

<sup>a)</sup> Selectivity ( $IC_{50}$  L-929/ $IC_{50}$  tumor cell). <sup>b)</sup> Positive control. <sup>c)</sup> 95% confidence intervals, obtained by non-linear regression for MOLT-4 (leukemia), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (colon), SF-295 (glioblastoma), and L-929 (normal fibroblasts) cells from three independent experiments. <sup>d)</sup> Not calculated.

carcinoma), and Hepa59T/VGH (liver carcinoma) cells [14], and casearnegrescens A-2 and D-2 were not active against A2780 (ovarian cancer) cells [16]. It would appear, therefore, that the presence of the dialdehyde function in these clerodane diterpenes results in the total or partial loss of cytotoxicity indicating that the occurrence of the CO groups at positions 18 and 19 is incompatible with the cytotoxic activity. In addition, the lack of an AcO group at C(6) and the lack of an O-bearing function at C(7) in the strongest active compounds (casearin X and caseargrewiin F) agree with the discussion of SAR in previous reports [10][14].

In conclusion, caseargrewiin F and the new compound casearin X showed relevant cytotoxic activity against the leukemia, melanoma, colon, and glioblastoma cancer cell lines, comparable with the positive control doxorubicin. In addition, the lower activities of these compounds against normal human cells can be indicative of a selective action on cancer cells.

The authors are grateful to the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, and *Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo* for support of the project. Thanks are due to the *Laboratório de Espectrometria de Massas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil*, for the MS determinations.

#### Experimental Part

**General.** TLC: *Merck* glass-backed silica gel *G60* layers (20 × 20 cm; 0.25 mm thick), eluted with hexane/AcOEt/PrOH (78:20:2, v/v/v), and visualized with anisaldehyde/sulfuric acid reagent. Anal. reversed-phase HPLC: *Varian ProStar* system (comprising a model 240 pump, a 410 autosampler, and a 330 photodiode array detector) fitted with a *Phenomenex Luna C-18* column (250 × 4.6 mm i.d.; 5 μm), with control and data handling managed by *Star Chromatography* software. Prep. HPLC: *Varian Dynamax* model *SD-1* pump, *ProStar 320* UV-VIS detector, with *Star Integrator* software, and a *Phenomenex Luna C-18* column (250 × 21.2 mm i.d.; 10 μm).  $[\alpha]_D^{25}$ : *Perkin-Elmer 14 Polamat* polarimeter. UV Spectra: *Cary 13E* instrument. IR Spectra: *Perkin-Elmer FTIR 1600* spectrophotometer, in KBr discs. NMR Spectra: *Varian INOVA 500 11.7 T* instrument with pyridine or CHCl<sub>3</sub> as internal standard. MS: *Bruker* ESI-quadrupole-TOF instrument (*UltrOTOFOQ*).

The mobile phases for SPE, LPCC, and TLC were prepared using anal. grade solvents from *Synth*, whilst those for HPLC were prepared using chromatographic grade MeOH (*J. T. Baker*) and *Millipore Milli Q* Ultrapure water (18 MΩ).

**Plant Material.** Leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ (Salicaceae) were collected at the Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, São Paulo, Brazil) in March and July 2004. Voucher specimens are deposited with the Herbarium 'Maria Eneida P. Kaufmann' (Instituto Botânico do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil) with the reference numbers AGS04, AGS05, AGS06, AGS13, and AGS19.

**Extraction and Isolation of Compounds 1–6.** Dried and powdered leaves of *C. sylvestris* (20.5 kg) were extracted with EtOH (ca. 200 l) in a stainless steel extractor with solvent re-circulation for ca. 24 h at 40°. The crude extract was concentrated under reduced pressure to yield 1540.0 g of dry residue. A portion (473.6 g) of the residue was separated by SPE from SiO<sub>2</sub> (60–200 μm, *Merck*)/activated charcoal (*Synth*) (1:1, w/w) by elution with hexane/AcOEt (95:5, v/v), AcOEt, and MeOH to afford three fractions (SPE1–SPE3). SPE2 (16.0 g) was submitted to normal-phase LPCC over SiO<sub>2</sub> (40–63 μm; *Merck*) eluted with a gradient of hexane/AcOEt/PrOH of increasing polarity (78:20.5:1.5 to 60:37.3:2.7, v/v/v); 45 fractions were collected and monitored by TLC, anal. HPLC-UV, and NMR. Frs. 5, 6, 8, 9, 15–19, 25, and 31–36 were submitted to prep. reversed-phase HPLC (*C<sub>18</sub>* column) with

MeOH/H<sub>2</sub>O mixtures as the mobile phase to yield **1** (1250.0 mg), **2** (250.6 mg), **3** (80.0 mg), **4** (43.0 mg), **5** (128.5 mg), and **6** (850.0 mg).

**Cytotoxicity Assay.** The cytotoxic potential of the isolated compounds and doxorubicin was evaluated by the MTT assay [31] against five cell lines (MOLT-4, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295, and L-929) obtained from the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA). All cell lines were maintained in *RPMI 1640* medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Tumor cell growth was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a purple formazan product. Briefly, cells were plated in 96-well plates (0.7 × 10<sup>5</sup> cells/well for adherent cells and 0.3 × 10<sup>5</sup> cells/well for suspended cells) and the compounds (0.019–25 µg/ml) were added to each well. After 69 h of incubation, the supernatant was replaced by fresh medium containing MTT 0.5 mg/ml. After 3 h, the plates were centrifuged, and the MTT formazan product was dissolved in 150 µl DMSO, and absorbance was measured at 595 nm (*DTX-880, Beckman Coulter*). Doxorubicin was used as pos. control.

**Statistical Analysis.** The IC<sub>50</sub> values and their 95% confidence intervals (CI 95%) were obtained by nonlinear regression using the GRAPHPAD program (*Intuitive Software for Science, San Diego, CA*), from three independent experiments.

**Haemolytic Assay.** The isolated compounds were assayed for haemolytic activity at concentrations in the range 1.56–200 µg/ml according to the method of *Moreira et al.* [32]. Analytes were incubated in 96-well plates for 60 min at r.t. with suspensions of mouse erythrocytes (2%) in NaCl (0.85%) containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Following centrifugation, the levels of haemoglobin in the supernatants were determined spectrophotometrically at 540 nm.

**Casearin X** (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aR\*,7S\*,8S\*,10R\*,10aR\*)-1-(Acetyloxy)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-10-hydroxy-7,8-dimethyl-7-[ (2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphtho[1,8a-c]furan-3,5-diyl Dibutanoate; **1**). White powder.  $[\alpha]_D^{20} = +54.3$  ( $c = 1.00$ , MeOH). UV ( $c = 0.019$ , MeOH): 235 (16.7 × 10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). IR (KBr disc): 3490, 2967, 2936, 2887, 1752, 1461, 1374, 1225, 1173. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: *Table 1*. HR-TOF-ESI-MS: 555.2931 ([M + Na]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 555.2934), 571.2659 ([M + K]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>KO<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 571.2673).

**Casearin B** (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aS\*,7R\*,8R\*,9S\*,10S\*,10aR\*)-1,3,10-Tris(acetyloxy)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-5-methoxy-7,8-dimethyl-7-[ (2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphtho[1,8a-c]furan-9-yl Butanoate; **2**). White powder.  $[\alpha]_D^{20} = +42.6$  ( $c = 1.00$ , MeOH). UV ( $c = 0.024$ , MeOH): 234 (18.1 × 10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). IR (KBr disc): 2975, 2940, 2886, 2826, 1751, 1457, 1374, 1227, 1176, 1076, 1023. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, (D<sub>5</sub>)pyridine)<sup>1</sup>): 173.1 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 170.8, 170.5, 169.6 (3 MeCO<sub>2</sub>); 141.5 (C(4)); 134.5 (C(13)); 134.2 (C(14)); 127.0 (C(12)); 126.5 (C(3)); 115.0 (C(15)); 98.3 (C(19)); 95.9 (C(18)); 74.9 (C(6)); 73.4 (C(7)); 73.0 (C(2)); 57.1 (MeO); 53.7 (C(5)); 41.5 (C(8)); 40.0 (C(9)); 37.6 (C(10)); 36.5 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 30.9 (C(11)); 26.4 (C(1)); 25.8 (C(20)); 21.6, 21.3 (3 MeCO<sub>2</sub>); 20.4 (C(16)); 19.0 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 14.1 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 11.4 (C(17)). HR-TOF-ESI-MS: 599.2853 ([M + Na]<sup>+</sup>, C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 599.2826), 615.2580 ([M + K]<sup>+</sup>, C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>KO<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 615.2566).

**Casearin D** (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aR\*,7R\*,8R\*,9S\*,10S\*,10aR\*)-1-(Acetyloxy)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-5,10-dihydroxy-7,8-dimethyl-7-[ (2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphtho[1,8a-c]furan-3,9-diyl Dibutanoate; **3**). White powder.  $[\alpha]_D^{20} = +41.6$  ( $c = 1.00$ , MeOH). UV (MeOH): 235. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, (D<sub>5</sub>)pyridine)<sup>1</sup>): 173.5, 173.7 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 169.7 (MeCO<sub>2</sub>); 142.6 (C(4)); 134.3 (C(13)); 134.0 (C(14)); 127.8 (C(12)); 127.5 (C(3)); 114.7 (C(15)); 99.3 (C(19)); 97.3 (C(18)); 76.5 (C(7)); 74.8 (C(6)); 63.7 (C(2)); 55.0 (C(5)); 41.8 (C(8)); 40.1 (C(9)); 36.8, 36.7 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 36.6 (C(10)); 31.1 (C(1)); 31.0 (C(11)); 26.1 (C(20)); 21.8 (MeCO<sub>2</sub>); 20.5 (C(16)); 19.1, 18.9 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 14.1, 13.9 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 11.8 (C(17)). HR-TOF-ESI-MS: 571.2875 ([M + Na]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>7</sub><sup>+</sup>; calc. 571.2883).

**Casearin L** (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aR\*,7R\*,8R\*,9S\*,10S\*,10aR\*)-1,10-Bis(acetyloxy)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-9-hydroxy-5-methoxy-7,8-dimethyl-7-[ (2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphtho[1,8a-c]furan-3-yl Butanoate; **4**). Colorless oil. UV (MeOH): 234. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, (D<sub>5</sub>)pyridine)<sup>1</sup>): 173.4 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 170.6, 169.5 (2 MeCO<sub>2</sub>); 144.1 (C(4)); 134.0 (C(13)); 133.9 (C(14)); 127.3 (C(12)); 123.8 (C(3)); 114.5 (C(15)); 98.8 (C(19)); 97.0 (C(18)); 76.1 (C(7)); 74.5 (C(6)); 73.0 (C(2)); 56.7 (Me); 54.7 (C(5)); 41.5 (C(8)); 39.8 (C(9)); 36.7 (C(10)); 36.5 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 30.7



(C(11)); 26.3 (C(1)); 25.7 (C(20)); 21.5, 21.2 (2 MeCO<sub>2</sub>); 20.5 (C(16)); 18.9 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 13.8 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 11.5 (C(17)).

*Casearin O* (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aR\*,7R\*,8R\*,9S\*,10S\*,10aR\*)-1,10-Bis(acetyloxy)-5-methoxy-7,8-dimethyl-7-[(2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydronaphtho[1,8a-c]furan-3,9-diyl Dibutanoate; 5). Colorless oil. UV (MeOH): 233. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, (D<sub>5</sub>)pyridine<sup>d</sup>): 173.3, 173.1 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 170.5, 169.5 (2 MeCO<sub>2</sub>); 144.7 (C(4)); 134.5 (C(13)); 134.2 (C(14)); 126.9 (C(12)); 126.4 (C(3)); 115.0 (C(15)); 98.4 (C(19)); 95.7 (C(18)); 74.9 (C(6)); 73.4 (C(7)); 72.9 (C(2)); 57.0 (MeO); 53.8 (C(5)); 41.5 (C(8)); 40.0 (C(9)); 37.6 (C(10)); 36.6, 36.5 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 30.9 (C(11)); 26.4 (C(1)); 25.8 (C(20)); 21.7, 21.3 (2 MeCO<sub>2</sub>); 20.4 (C(16)); 19.0, 18.8 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 14.1, 13.8 (2 Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 11.4 (C(17)). HR-TOF-ESI-MS: 627.3161 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>NaO<sub>10</sub><sup>-</sup>; calc. 627.3145), 643.2918 ([M+K]<sup>+</sup>, C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>KO<sub>10</sub><sup>-</sup>; calc. 643.2885).

*Caseargrewiini F* (= (1R\*,3S\*,5S\*,6aR\*,7S\*,8R\*,10R\*,10aR\*)-1,3-Bis(acetyloxy)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahydro-10-hydroxy-7,8-dimethyl-7-[(2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphtho[1,8a-c]furan-5-yl Butanoate; 6). White powder. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +55.1 (c=1.00, MeOH). UV (c=0.018, MeOH): 235 (15.9 × 10<sup>3</sup> cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). IR (KBr disc): 3460, 2967, 2930, 2878, 1738, 1376, 1230, 1175. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, (D<sub>5</sub>)pyridine<sup>d</sup>): 173.0 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 170.5, 169.8 (2 MeCO<sub>2</sub>); 147.4 (C(4)); 134.1 (C(14)); 133.7 (C(13)); 128.1 (C(12)); 121.3 (C(3)); 114.3 (C(15)); 98.8 (C(19)); 97.1 (C(18)); 72.5 (C(6)); 67.0 (C(2)); 54.5 (C(5)); 38.3 (C(9)); 37.8 (C(7)); 37.4 (C(8)); 36.7 (C(10)); 36.4 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 29.7 (C(11)); 27.4 (C(1)); 25.2 (C(20)); 20.4 (C(16)); 21.7, 21.1 (2 MeCO<sub>2</sub>); 18.9 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>); 15.8 (C(17)); 13.7 (Me-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>). HR-TOF-ESI-MS: 527.2619 ([M+Na]<sup>-</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>NaO<sub>8</sub><sup>-</sup>; calc. 527.2621), 543.2362 ([M+K]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>KO<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 543.2360).

*Casearin X Dialdehyde* (= (2R\*,4aS\*,5S\*,7R\*,8R\*,8aS\*)-4,4a-Diformyl-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-5-hydroxy-7,8-dimethyl-8-[(2Z)-3-methylpenta-2,4-dien-1-yl]naphthalen-2-yl Butanoate; 7). Compound 1 (10.0 mg) was submitted to degradation in CDCl<sub>3</sub> (0.7 ml) in an NMR tube to afford 9.0 mg of a white powder. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1. HR-TOF-ESI-MS: 403.2484 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 403.2484).

## REFERENCES

- [1] H. O. Sleumer, 'Flacourtiaceae', The New York Botanic Garden, New York, 1980.
- [2] J. M. Caminhoá, 'Elementos de Botânica Geral e Médica', Tipographia Nacional, Rio de Janeiro, 1877, Vol. 3.
- [3] F. C. Hoehne, 'Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais', Graphicars, São Paulo, 1939.
- [4] A. C. Basile, J. A. A. Sertié, S. Panizza, T. T. Oshiro, C. A. Azzolini, *J. Ethnopharmacol.* **1990**, *30*, 185.
- [5] J. A. A. Sertié, J. C. T. Carvalho, S. Panizza, *Pharm. Biol.* **2000**, *38*, 112.
- [6] F. B. da Silva, J. M. de Almeida, S. M. G. de Sousa, *Braz. Oral Res.* **2004**, *18*, 174.
- [7] M. H. Borges, A. M. Soares, V. M. Rodrigues, S. H. Andrião-Escarso, H. Diniz, A. Hamaguchi, A. Quintero, S. Lizano, J. M. Gutiérrez, J. R. Giglio, M. I. Homs-Brandeburgo, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *127*, 21.
- [8] M. H. Borges, A. M. Soares, V. M. Rodrigues, F. Oliveira, A. M. Fransheschi, A. Rucavado, J. R. Giglio, M. I. Homs-Brandeburgo, *Toxicon* **2001**, *39*, 1863.
- [9] H. Itokawa, N. Totsuka, H. Morita, K. Takeya, Y. Itaka, E. P. Schenkel, M. Motidome, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3384.
- [10] H. Morita, M. Nakayama, H. Kojima, K. Takeya, H. Itokawa, E. P. Schenkel, M. Motidome, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 693.
- [11] E. L. Maistro, J. C. Carvalho, M. S. Mantovani, *Toxicol. in Vitro* **2004**, *18*, 337.
- [12] E. Guittet, V. Stoven, J.-Y. Lallemand, F. Ramiandrasoa, G. Kunesch, C. Moretti, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2893.
- [13] S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, T. Kanarsa, M. Buayairaksa, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 183.
- [14] Y.-C. Shen, C. L. Lee, A. T. Khalil, Y.-B. Cheng, C.-T. Chien, Y.-H. Kuo, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 68.
- [15] E. K. S. Vijayakumar, S. Bal-Tembe, K. S. Joshi, V. B. Deore, *Ind. J. Chem., Sect. B* **2002**, *41*, 2706.

- [16] R. B. Williams, A. Norris, J. S. Miller, C. Birkinshaw, F. Ratovoson, R. Andriantsiferana, V. E. Rasamison, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 206.
- [17] P. R. F. de Carvalho, M. Furlan, M. C. M. Young, D. G. I. Kingston, V. da S. Bolzani, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1659.
- [18] N. H. Oberlies, J. P. Burgess, H. A. Navarro, R. E. Pinos, C. R. Fairchild, R. W. Peterson, D. D. Soejarto, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, M. C. Wani, M. E. Wall, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 95.
- [19] L. S. Espindola, J. R. Vasconcelos Júnior, M. L. de Mesquita, P. Marquié, J. E. de Paula, L. Mambu, J. M. Santana, *Planta Med.* **2004**, *70*, 1093.
- [20] A. G. dos Santos, C. C. Perez, A. G. Tininis, V. da Silva Bolzani, A. J. Cavaleiro, *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1100.
- [21] S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, M. Buayairaksa, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1122.
- [22] B. Blas, J. Zapp, H. Becker, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 127.
- [23] P. Singh, S. Jain, J. Jakupovic, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1537.
- [24] M. R. Khan, A. I. Gray, D. R. Reed, I. H. Sadler, P. G. Waterman, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1609.
- [25] S. Manabe, C. Nishino, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3461.
- [26] Y.-C. Shen, C.-H. Wang, Y.-B. Cheng, L.-T. Wang, J.-H. Guh, C.-T. Chien, A. T. Khalil, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 316.
- [27] J. T. Else, A. I. Gray, D. W. Thomas, P. G. Waterman, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2489.
- [28] R. T. Nogueira, G. J. Sheperd, A. Laverde Jr., A. J. Marsaioli, P. M. Imamura, *Phytochemistry* **2001**, *58*, 1153.
- [29] D. Billet, M. Durgeat, S. Heitz, J. P. Brouard, A. Ahond, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *32*, 2773.
- [30] W. Geis, B. Buschauer, H. Becker, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 643.
- [31] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
- [32] D. R. de Magalhães Moreira, A. C. L. Leite, P. M. P. Ferreira, P. M. da Costa, L. V. Costa-Lotufo, M. O. de Moraes, D. J. Brondani, C. do Ó Pessoa, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 351.

Received December 11, 2008