



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

KARINA BETTEGA FELIPE

**Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de
*Casearia sylvestris***

Florianópolis

2010

Karina Bettega Felipe

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre em
Bioquímica**

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rozangela Curi Pedrosa
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cargnin Ferreira**

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F315e Felipe, Karina Bettega

Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris* [dissertação] / Karina Bettega Felipe ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa. - Florianópolis, SC, 2010.
1 v.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Plantas medicinais. 3. Celulas mortas. 4. *Casearia sylvestris*. 5. Casearinas. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos, mesmo à distância, me incentivando em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Martín Augusto Gaglio Vigil, pela cumplicidade, paciência, carinho e presença sempre importantes em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, pelo incentivo, amizade e por acreditar no meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Mais árduo que realizar este trabalho, é encontrar palavras certas para agradecer às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, e sem as quais eu jamais teria chegado até aqui. Através destas páginas simbólicas, deixo registrado meu profundo agradecimento:

A Deus, pela vida e por proporcionar-me diferentes caminhos, dando-me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

Aos meus pais, Rogério e Cynthia, pela contribuição na formação do meu caráter, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e dedicação da vida toda.

À minha irmã Cassandra e cunhado Alexandre, pela amizade, companhia e apoio durante a realização desse trabalho.

Ao meu namorado, Martín, pelo amor, paciência, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

À minha querida família postiça pelos inúmeros almoços de domingo, companhia, carinho, apoio e atenção nesses 2 anos de convivência.

À minha orientadora Rozangela Curi Pedrosa por possibilitar a execução deste trabalho, pela amizade, incentivo, pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos durante todo o período em que trabalhamos juntas.

Ao meu co-orientador Eduardo Cargnin Ferreira pela orientação, amizade e significativo aprendizado científico.

À equipe do Instituto de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, coordenada pela Profa. Dra. Maria Helena Rossi, que prepararam os extratos utilizados em nosso estudo.

Ao Professor Claus Pich pelo auxílio referente aos testes de atividade nucleásica.

À Professora Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e sua equipe, que gentilmente cederam o leitor de placas para a execução dos ensaios de citotoxicidade.

Aos professores Paulo Fernando Dias e Marcelo Maraschin por propiciarem o desenvolvimento dos testes da atividade angiogênica em seu laboratório.

À amiga Sara Ferrigo que me transmitiu seu conhecimento, amizade e carinho. Deus lhe reserva um futuro brilhante!

Aos colegas e ex colegas do laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX): Eduardo Antônio Ferreira, Luis Paulo Wiese, Reginaldo Geremias, Tatiana Schoenfelder, Fernando Cantanhede, Fernanda Biscaro, Eduardo Benedetti Parisoto, Tânia

Fischer Gunter pela convivência, amizade, discussões, apuros e momentos agradáveis que passamos. Duda, também aproveitou este espaço para lhe agradecer a paciência e auxílio na formatação de trabalho.

Aos amigos Maicon Kwiecinski, Silvia Dal Bó e Sílvio Ávila Jr., pelas exóticas “quintas-feiras sem lei”. Maicon e Sílvia, também aproveitou para agradecer pela essencial ajuda nas etapas finais desse projeto. Vocês são simplesmente demais!

Às amigas Andressa Pereira Bettega, Anele Trentin, Natália Scaravelli e Daiane Nemen, pela amizade, compreensão e ajuda nos momentos conturbados.

A todos os demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

À CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a execução desse projeto.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano.

Aos que acreditaram na minha capacidade, que torceram pela minha vitória e que me ajudaram de alguma maneira para a conquista de mais um sonho.

A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada	53
Tabela 2. Valores de CI_{50} e respectivos desvio-padrão derivados do efeito citotóxico do extrato bruto e frações clorofórmica, metanólica e acetato de etila de <i>C. sylvestris</i> (32,5 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), sob células do carcinoma de Ehrlich cultivadas <i>in vitro</i>	57
Tabela 3. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH), fração clorofórmica (f- CHCl_3) e fração acetato de etila (f-AcOEt) (150mg/kg) de <i>C. sylvestris</i> , sobre parâmetros cronomorfofisiológicos (variação de peso, variação de circunferência abdominal, tempo médio de sobrevivência, percentual de longevidade) de camundongos previamente inoculados com TAE.	66
Tabela 4. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH), fração clorofórmica (f- CHCl_3) e fração acetato de etila (f-AcOEt) (150mg/kg) de <i>C. sylvestris</i> sobre parâmetros histocitológicos (proporção de células inviáveis/viáveis, volume de líquido ascítico e de células compactadas) de camundongos previamente inoculados com TAE.	67
Tabela 5. Efeito dose dependente do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f- CHCl_3) (150, 75 e 62,5mg/kg) de <i>C. sylvestris</i> sobre parâmetros cronomorfofisiológicos (variação de peso, variação de circunferência abdominal, tempo médio de sobrevivência, percentual de longevidade) de camundongos previamente inoculados com TAE.	68
Tabela 6. Efeito dose dependente do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f- CHCl_3) (150, 75 e 62,5mg/kg) de <i>C. sylvestris</i> sobre parâmetros histocitológicos (proporção de células inviáveis/viáveis,	

volume de líquido ascítico e de células compactadas) de camundongos previamente inoculados com TAE.	70
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada das duas principais vias envolvidas na apoptose.	29
Figura 2. Representação esquemática da angiogênese.....	33
Figura 3. <i>C. sylvestris</i> Swart. (A) Árvore de <i>C. sylvestris</i> (B) Inflorescência de <i>C. sylvestris</i> (C) Frutos de <i>C. sylvestris</i> (D) Folhas de <i>C. sylvestris</i>	37
Figura 4. Estrutura química das casearinas. (A) Estrutura geral das casearinas; (B) Respectiveos substituintes das casearinas A-T.	38
Figura 5. Estrutura química das casearvestrinas. (A) Estrutura geral das casearvestrinas; (B) Respectiveos substituintes das casearvestrinas A-C..	38
Figura 6. Estrutura química dos derivados do ácido gálico isolados do extrato alcoólico obtido de folhas de <i>C. sylvestris</i> . (A) isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE); (B) metil galato-3,5- dimetil éter (MGDE) ...	39
Figura 7. Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial	47
Figura 8. Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos	47
Figura 9. Medidas céfálico cervical (CCV) e cervical caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie <i>G. domesticus</i>	55
Figura 10. Efeito dose -dependente (A) do extrato bruto (EB-ETO), (B) fração clorofórmica (f-CHCl ₃), (C) fração metanólica (f-MeOH) e (D) fração acetato de etila (f-AcOEt) (32,5 – 1000 µg/mL) de <i>C. sylvestris</i> sobre a viabilidade celular no carcinoma de Ehrlich após 24 horas de tratamento.	56

Figura 11. Efeito tempo-dependente do extrato bruto (EB-ETOH-175,9 µg/mL), fração clorofórmica (f-CHCl ₃ -92,0 µg/mL) e acetato de etila (f-AcOEt-93,5 µg/mL) de <i>C. sylvestris</i> sobre a viabilidade celular no carcinoma de Ehrlich após 12, 18 e 24 horas de tratamento.	58
Figura 12. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH- 175,9 µg/mL), fração clorofórmica (f-CHCl ₃ - 92,0 µg/mL) e acetato de etila (f-AcOEt- 93,5µg/mL) de <i>C. sylvestris</i> sobre a proliferação celular no carcinoma de Ehrlich após 24 horas de tratamento.....	59
Figura 13. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH) de <i>C. sylvestris</i> (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.	60
Figura 14. Efeito da fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i> (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.	60
Figura 15. Efeito da fração acetato de etila (f-AcOEt) de <i>C. sylvestris</i> (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C.....	61
Figura 16. Efeito protetor do extrato bruto (EB-ETOH) de <i>C. sylvestris</i> (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial.	62
Figura 17. Efeito protetor da fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i> (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial..	63
Figura 18. Efeito protetor da fração acetato de etila (f-AcOEt) de <i>C. sylvestris</i> (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial..	63

Figura 19. Morfologia de células do carcinoma de Ehrlich coradas com uma mistura de Brometo de Etídeo/ Laranja de Acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência, após 24 horas de incubação com extrato bruto (B), fração clorofórmica (C) e acetato de etila (D) de *C. sylvestris*. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos. Aumento=400X..... 64

Figura 20. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com extrato bruto (EB-ETOH- 175,9 µg/mL), fração clorofórmica (f-CHCl₃- 92 µg/mL) e acetato de etila (f-AcOEt- 93,5µg/mL) de *C. sylvestris* pelo período de 24 horas..... 65

Figura 21. Dano ao DNA no líquido ascítico de camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com extrato bruto (37,5-150mg/kg) de *C. sylvestris*..... 71

Figura 22. Dano ao DNA no líquido ascítico de camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com fração clorofórmica (37,5-150mg/kg) de *C. sylvestris*.. 72

Figura 23. Efeito dose-dependente do extrato bruto (3,25; 7,5; 15 µg/disco) de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana corioalantóide de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. 73

Figura 24. Efeito dose-dependente da fração clorofórmica (3,25; 7,5; 15 µg/disco) de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana corioalantóide de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. 74

Figura 25. Efeito inibitório do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana cório-alantóica de embriões, no 8º dia de desenvolvimento. A) Controle positivo, tratado

com ácido retinóico (1µg/disco). B) Fração clorofórmica de *C. sylvestris* (15µg/disco). C) Controle negativo, tratado com etanol. D) Extrato bruto de *C. sylvestris* (15µg/disco)..... 75

Figura 26. Efeito do extrato bruto na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A) Comprimento total do embrião (CCV+CVC). B) Razão do comprimento cefálico pelo comprimento truncal (CCV/CVC). C) Razão do Comprimento cefálico pelo comprimento total do embrião (CCV/CCV+CVC).. 76

Figura 27. Efeito da fração clorofórmica na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A) Comprimento total do embrião (CCV+CVC). B) Razão do comprimento cefálico pelo comprimento cervical (CCV/CVC). C) Razão do Comprimento cefálico pelo comprimento total do embrião (CCV/CCV+CVC).. 77

LISTA DE ACRÔNIMOS

AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
APAF 1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1
BE	Brometo de Etídeo
BE/LA	Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
CAM	Ensaio da membrane córioalantóica
CdK	Quinase dependente de ciclina
CDKI	Quinase dependente de ciclina I
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
COX-1 e -2	Ciclooxigenase -1 e -2
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DR	Receptor de morte
dTMP	5-desoxitimidina-monofosfato
dTDP	5-desoxitimidina-difosfato
dTTP	5-desoxitimidina-trifosfato
EB-ETOH	Extrato bruto de <i>C. sylvestris</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
f-AcOEt	Fração acetato de etila de <i>C. sylvestris</i>
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associada a FAS
f-CHCl ₃	Fração clorofórmica de <i>C. sylvestris</i>

F-I	Forma superenovelada
F-II	Forma circular aberta
F-III	Forma linear
FLIPS	Proteína inibidora da enzima conversora de interleucina 1-b tipo FADD
f-MeOH	Fração metanólica de <i>C. sylvestris</i>
HEPES	Ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n'-2'-etanossulfônico
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
X-IAP	Proteína inibidora de apoptose X
i.p.	Via intraperitoneal
IGDE	Isobutil galato-3,5-dimetil éter
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de Acridina
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDR	Múltipla resistência a quimioterápicos
MGDE	Metil galato-3,5- dimetil éter
MPT	Canal aniônico voltagem dependente relacionado a alteração da permeabilidade mitocondrial
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5- difeniltetrazolil
NFk-β	Fator Nuclear k-β
NMPA	Agarose de ponto de fusão normal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Percentual do aumento de longevidade
PBS	Tampão salina fosfato
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B

Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TCA	Ácido Tricloroacético
TMS	Tempo Médio de Sobrevida
TN-RI	Receptor do fator de necrose tumoral p55
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TQ1	Timidina quinase 1
TRAIL	Fator de necrose tumoral relacionado a apoptose induzida por Ligante
VEGF	Fator de crescimento endothelial vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endothelial vascular- tipo A

RESUMO

O desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como as terapias que utilizam as plantas medicinais, tem despertado grande interesse no tratamento do câncer, pois as terapias disponíveis não são capazes de regredir totalmente a evolução da patologia e/ou apresentam elevada toxicidade. A *C. sylvestris*, planta medicinal que possui vários usos populares no Brasil e outros países americanos, tem sido indicada para o tratamento de tumores. Nesse contexto, o presente trabalho propôs avaliar as atividades citotóxica, antiproliferativa, pró-apoptótica, antiangiogênica e antitumoral do extrato bruto (EB-ETOH), e das frações metanólica (f-MeOH), acetato de etila (f-AcOEt) e clorofórmica (f-CHCl₃) de *Casearia sylvestris* utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios do MTT e incorporação de timidina triциada realizados respectivamente, para investigar a citotoxicidade e influência dos extratos sobre a proliferação celular, os resultados demonstraram que EB-ETOH, f-CHCl₃ e f-AcOEt reduziram de maneira significativa a viabilidade e proliferação de células do carcinoma de Ehrlich, sendo a citotoxicidade promovida pelo tratamento com esses extratos, tempo e concentração dependente. Diante do efeito citotóxico promovido por EB-ETOH, f-CHCl₃ e f-AcOEt sobre células do carcinoma de Ehrlich, avaliou-se o tipo de morte celular promovida pelos tratamentos. A coloração com brometo de etídeo/laranja de acridina (BE/LA) revelou que o provável tipo de morte celular induzida pelos tratamentos trata-se de apoptose, uma vez que a grande maioria das células, após terem entrado em contato com a referida solução corante, adquiriram uma coloração laranja-avermelhada, característica da ocorrência do fenômeno apoptótico. Entretanto, em relação à avaliação da atividade nucleásica, verificada através da realização do teste de dano ao DNA plasmidial, observou-se que os efeitos antiproliferativo e citotóxico induzidos por EB-ETOH, f-CHCl₃ e f-AcOEt, não são mediados por uma interação e dano direto ao DNA. Além disso, a realização desse ensaio permitiu observar que os extratos têm a capacidade de proteger o DNA do ataque induzido por EROs, excluindo-se portanto, a possibilidade de estarem exercendo seus efeitos citotóxico e antiproliferativo através da indução de estresse oxidativo no núcleo. As avaliações morfológicas e bioquímicas realizadas nas amostras obtidas de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich mostraram que os animais tratados com EB-ETOH e f-CHCl₃ apresentaram menor ganho de peso corporal (26 e 31%, respectivamente) e de circunferência abdominal (52 e 58%, respectivamente), menor volume de líquido

ascítico (46 e 43%, respectivamente), aumento do percentual de longevidade (48 e 40%, respectivamente) e da proporção de células inviáveis/viáveis (70 e 78%, respectivamente), quando comparados ao grupo controle negativo. Com a realização do modelo *in vivo* do TAE, observou-se ainda que o efeito antitumoral promovido por esses extratos é dose-dependente, uma vez que se apresentou-maior, quanto mais elevada a concentração de extrato administrada ao animal. A realização do ensaio do CAM, permitiu verificar que tanto o EB-ETOH, como f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, exercem um significativo efeito antiangiogênico, de maneira dose-dependente, onde a administração de 3,25; 7,5 e 15 µg/disco de EB-ETOH e f-CHCl₃ foram capazes de diminuir o percentual de vasos, em torno de 54,5; 61,4 e 71% e 42,1; 59,1 e 70,9%, respectivamente. Por fim, cabe ressaltar que a realização da biometria dos embriões possibilitou observar que o tratamento dos mesmos com extrato bruto e fração clorofórmica não se apresentou tóxico, uma vez que não alterou o desenvolvimento embrionário nem a morfogênese externa, avaliados pelo comprimento total do embrião, razão comprimento cefálico/comprimento truncal e razão comprimento cefálico/comprimento total. Dessa forma, conclui-se que EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris* apresentaram efeito citotóxico, antiproliferativo, pró apoptótico e antitumoral *in vitro* e *in vivo*, sobre as células do carcinoma de Ehrlich. Tal efeito antitumoral mediado por esses extratos, não envolvem sua intercalação ao DNA, e sugere-se que se deva, pelo menos em parte, à inibição da formação de vasos e a conseqüente supressão nutricional das células tumorais.

Palavras-chave: Plantas Medicinais, *Casearia sylvestris*, Casearinas, Citotoxicidade, Pró-apoptótico Antitumoral, Antiangiogênico.

ABSTRACT

The development of new therapies, such as those using medicinal plants, have attracted great interest on cancer research because the available treatments have not been able so far to regress completely the evolution of the pathology and / or they present many adverse effects related to its toxicity. However, *C. sylvestris*, a medicinal herb whose popular use has been reported in Brazil and other American countries, has been indicated as an alternative treatment of tumors. In this context, the present study regards the evaluation of the cytotoxic, antiproliferative, pro-apoptotic, nucleasic, antiangiogenic and antitumour activities of the crude extract (EB-ETOH) and methanol (f-MeOH), ethyl acetate (f-AcOEt) and chloroform (f-CHCl₃) fractions of *C. sylvestris*, using experimental models *in vitro* and *in vivo*. The MTT and incorporation of tritiated thymidine assays were performed to investigate the cytotoxicity and influence of the extracts on cell proliferation, and the results showed that EB-ETOH, f-CHCl₃ and f-AcOEt significantly reduced the viability and proliferation of cells of Ehrlich carcinoma. Moreover, The MTT assay showed that the cytotoxicity promoted by treatment with these extracts is time and concentration-dependent. Given the cytotoxic effect promoted by EB-ETOH, f-AcOEt and f-CHCl₃ on cells of Ehrlich carcinoma, we evaluated the type of cell death promoted by these treatments. Staining with ethidium bromide/ acridine orange (BE / LA) revealed that the likely type of cell death induced by treatment with EB-ETOH, f-AcOEt and f-CHCl₃ is apoptosis, since the vast majority of cells, after coming into contact with the dye, acquired an orange-red color, which is a characteristic of the occurrence of apoptotic phenomenon. The test of damage to the plasmid DNA showed that the antiproliferative and cytotoxic effects induced by EB-ETOH, f-CHCl₃ and f-AcOEt are not mediated by an interaction and a direct DNA damage, such as one could see when dealing with alkylating agents. In addition, we observed that the extracts have the ability to protect DNA from attack induced by ROS, excluding therefore the possibility that they are exerting their cytotoxic and antiproliferative effects through induction of oxidative stress. The morphological and biochemical samples were obtained from mice bearing Ehrlich ascites tumor and they showed that animals treated with EB-ETOH and f-CHCl₃ had lower body weight gain (~ 25.7, 30.5%, respectively) and abdominal circumference (~ 51.6, 58.0%, respectively), lower volume of ascites (~ 46.2, 43.3%, respectively). Also, we observed the percentage raise of

both the longevity (~ 48.0 and 40.0%, respectively) and the proportion of unviable cells / viable (~ 70.0, 77.5%, respectively), when compared to negative controls. Through the TAE model we observed that the antitumor effect promoted by these extracts is dose-dependent. Further, the test of the CAM showed that both the crude extracts, such as the chloroform fraction of *C. sylvestris*, exerted a significant antiangiogenic effect in a dose-dependent manner, in which the administration of 3.25, 7.5 and 15.0 mg / disc of EB-ETOH and f-CHCl₃ was able to decrease the percentage of vessels around 54.5; 61.4 and 71% and 42.1, 59.1 and 70.9% respectively. Finally, it should be pointed out that the treatment with the EB-ETOH and f-CHCl₃ is unlikely to be toxic since it did not alter embryonic development and the outer morphogenesis assessed by the total length of the embryo, as well as the head length / trunk length ratio and head length / total length ratio. Thus, it appears that the EB-ETOH and f-CHCl₃ of *C. sylvestris* exhibit cytotoxic, antiproliferative, apoptotic and anti-tumor *in vitro* and *in vivo*, on cells of Ehrlich carcinoma. In addition, this antitumor effect, which was mediated by these statements, does not involve its intercalation to DNA due to, and suggest to be, at least in part, due to the inhibition of angiogenesis and consequent nutritional suppression of tumor cells.

Keywords: Medicinal plants, *Casearia sylvestris*, Casearins, Cytotoxicity, Pro-apoptotic, Antitumor, Antiangiogenic.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	24
1.1.Bases moleculares do câncer	26
1.2.Correlação entre Câncer e Apoptose	27
1.3.Correlação entre Câncer e Angiogênese	31
1.4.Plantas como fontes de medicamentos quimioterápicos.....	34
1.5. <i>Casearia sylvestris</i>	35
2.OBJETIVO	42
2.1.Objetivo Geral	42
2.2.Objetivos Específicos.....	42
3.METODOLOGIA	43
3.1.Caracterização de <i>C. sylvestris</i>	43
3.1.1.Preparo do extrato bruto e frações de <i>C. sylvestris</i>	43
3.2.Cultivo in vitro das células do carcinoma de Ehrlich.....	43
_Toc2666409623.3. Animais	44
3.4. Ovos.....	44
3.5. Ensaio biológicos.....	44
3.5.1. Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	44
3.5.1.1. Avaliação da atividade citotóxica	44
3.5.1.1.1 Citotoxicidade pela redução do MTT.....	44
3.5.1.1.2. Avaliação da atividade antiproliferativa	45
3.5.1.2.1 Ensaio de incorporação da timidina	45
3.5.1.3 Avaliação da atividade nucleásica	46
3.5.1.3.1 Avaliação de dano no DNA plasmidial.....	46

3.5.1.4. Avaliação da atividade pró-apoptótica.....	49
3.5.1.4.1 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/ Laranja de Acrinidina	49
3.5.2. Ensaios biológicos <i>in vivo</i>	49
3.5.2.1. Avaliação da atividade antitumoral.....	49
3.5.2.1.1. Modelo Experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich (TAE).....	49
3.5.2.1.1.1. Protocolo Experimental	49
3.5.2.1.1.2. Avaliações Cronomorfológicas	50
3.5.2.1.1.2.1. Avaliação da Média de Sobrevida	50
3.5.2.1.1.2.2. Avaliação da Variação de Peso.....	50
3.5.2.1.1.2.3. Avaliação da Variação da Medida da Circunferência Abdominal	51
3.5.2.1.1.3. Avaliações histocitológicas	51
3.5.2.1.1.3.1. Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de tripan.....	51
3.5.2.1.1.3.2. Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas.....	51
3.5.2.1.1.4. Avaliações bioquímicas.....	52
3.5.2.1.1.4.1. Avaliação da fragmentação do DNA pelo teste do cometa.....	52
3.5.2.2. Avaliação da atividade antiangiogênica	53
3.5.2.2.1. Ensaio da membrana corioanlatóica (CAM)	53
3.6 Análise estatística	55
4.RESULTADOS	56

4.1. Ensaio biológicos in vitro	56
4.1.1. Avaliação da atividade citotóxica.....	56
4.1.1.1. Citotoxicidade pela redução do MTT	56
4.1.2. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	58
4.1.2.1 Ensaio de incorporação da timidina.....	58
4.1.3. Avaliação da atividade nucleásica.....	59
4.1.3.1. Avaliação de dano no DNA plasmidial.....	59
4.1.4. Avaliação da atividade pró-apoptótica	64
4.1.4.1. Coloração Diferencial por Brometo de etídio/ Laranja de Acridina.....	64
4.2. Ensaio biológicos in vivo	65
4.2.1. Avaliação da atividade antitumoral	65
4.2.1.1. Modelo ascítico do tumor de Ehrlich (TAE).....	65
4.2.1.1.1. Avaliação da fragmentação do DNA pelo teste do cometa	71
4.2.2. Avaliação da atividade antiangiogênica	73
4.2.2.1. Ensaio da membrana corioanlatóica (CAM).....	73
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	96
7. PERSPECTIVAS	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

O termo câncer, de origem grega *karkinos*, que significa caranguejo, surgiu em torno de 460 a 370 a.C., quando Hipócrates utilizou esse termo para diferenciar tumores benignos de tumores malignos (REDDY, ODHAV, BHOOLA, 2003). Entretanto, o câncer trata-se de uma doença bem mais antiga, tendo sido relatado pela primeira vez, em um papiro egípcio datado do período de 1600 a.C., onde foram descritos detalhadamente casos de tumores de mama tratados por cauterização (COLLINS, 2004a).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (INCA, 2009). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas, acarretando em um processo de proliferação incontrolável, e determinando a formação de neoplasias malignas (INCA, 2009). O termo neoplasia por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada tanto em tumores benignos quanto em malignos (NAKAGAWA, LOPES, 2000). Entretanto, tumores benignos tratam-se de massas celulares localizadas, que proliferam lentamente e se assemelham ao tecido de origem, sendo separadas do mesmo por intermédio de uma cápsula. Normalmente a presença de tumores benignos não coloca em risco a vida do indivíduo (ALISSON, 2002; SOTO, SONNENSCHNEIN, 2004). Os tumores malignos por sua vez, crescem de forma invasiva nos tecidos adjacentes e, freqüentemente, originam tumores secundários (metástases) em órgãos distantes. Depois do tratamento, os tumores malignos freqüentemente podem reincidir, tanto localmente como à distância do sítio primário. Muitos pacientes morrem em consequência destas metástases (SOTO, SONNENSCHNEIN, 2004).

Atualmente, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte humana no mundo (COZZI, 2003; OTTO, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência média desta enfermidade é de aproximadamente 10 milhões de casos por ano. Destes, 7,9 milhões de casos, evoluem para óbito. Estima-se ainda que cerca de 15 milhões de novos casos irão ocorrer até 2020. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), revelaram para os anos de 2008 e 2009, a ocorrência de cerca de 466.730 casos novos da doença, sendo os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não

melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino, e de mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Portanto, esta patologia configura-se como um problema de saúde pública tanto de dimensões internacionais como nacionais (INCA, 2009).

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Atualmente, a quimioterapia é considerada o método mais efetivo para o tratamento da doença (AJITH; JANARDHANAN, 2002) uma vez que diversos tumores caracterizam-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, evidenciando a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica (ENGBERS; GABBERT, 2000).

O sucesso no tratamento dos tumores por meio da quimioterapia depende da maior sensibilidade das células neoplásicas aos fármacos aplicados, visto que células em proliferação são em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre as células neoplásicas e normais são às vezes pequenas, e a toxicidade é um problema comum (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996).

Atualmente, as classes de fármacos mais utilizadas na quimioterapia incluem: agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxiuréia, fluoruracila); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, etoposídeo); antimetabólitos, os quais inibem principalmente a síntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina,); agentes alquilantes (ex: cisplatina) e agentes inibidores da síntese de RNA e/ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) (RANG et al., 1999; RICHARDSON, 2000). Dentre estes grupos, os antibióticos antitumorais estão entre os mais importantes agentes quimioterápicos, e incluem os membros do grupo da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido aureólico (ROCHA, LOPES, SCHWARTSMANN, 2001).

Embora existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas atuais é capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta patologia. Além disso, o uso de agentes antitumorais acarreta numa alta incidência de efeitos adversos associados à sua elevada toxicidade e inespecificidade. Outro aspecto particular do tratamento do câncer refere-se a uma acentuada resistência à quimioterapia (MDR= *multidrug resistance*), o que obriga o clínico a optar por terapias de associação de dois ou mais fármacos (JENDIROBA, 2002).

1.1. Bases moleculares do câncer

Qualquer que seja a causa, o câncer pode ser considerado uma doença celular, caracterizada por desvios nos mecanismos de que dirigem a proliferação e diferenciação das células, além de processos de apoptose (MOFFAT et al., 2000). Desta forma, o câncer surge quando uma célula, por diversas razões, perde o controle sobre seu ciclo, ou seja, sobre seu processo de proliferação, diferenciação e morte, passando a dividir-se descontroladamente (BERTRAM, 2001). A perda do controle do ciclo celular é causada por uma mudança no repertório da expressão gênica devido a alguma mutação ocorrida no DNA, determinando a ocorrência da neoplasia (DUESBERG; RASNICK, 2000).

O câncer é resultado de mutações (herdadas ou adquiridas ao longo da vida) em genes que controlam o crescimento celular. Estes genes podem ser divididos em três grupos: oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais (WOLF; RAMIREZ, 2001; AUDIC, HARTLEY, 2004). Oncogenes trata-se de genes cuja presença e/ou hiperatividade podem predispor ao desenvolvimento de câncer. Codificam proteínas que estimulam excessivamente a proliferação celular (AUDIC, HARTLEY, 2004). Proto-oncogenes trata-se de uma família de genes normais que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular normal. Por fim, genes supressores tumorais, trata-se de genes que inibem o crescimento de células tumorais (DE VITA, HELMAN, ROSENBERG, 1998; WOLF; RAMIREZ, 2001). A ocorrência de mutações nesses genes pode ter como conseqüências: a ativação de proto-oncogenes em oncogenes e a inativação dos genes supressores tumorais (BERTRAM, 2001; RANG et al., 2004). A ativação de proto-oncogenes em oncogenes, pode levar à superexpressão de diversas proteínas e receptores responsáveis pelo crescimento, diferenciação e proliferação celular. Por exemplo, receptores de fatores de crescimento, que freqüentemente estimulam a atividade da tirosina quinase em seus domínios citoplasmáticos, estão expressos em maior quantidade em muitos tipos de câncer (RAK et al., 1995; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). Outro exemplo particularmente importante, refere-se a proteína Ras, constituinte da cascata mitogênica SOS-Ras-Raf-MAPK, que se encontra mutada em 25% dos tumores humanos, sendo capaz de iniciar um fluxo de sinais mitogênicos no interior das células, sem necessitar da ativação prévia de receptores sensíveis a fatores de crescimento (MEDEMA, BOS, 1993; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). Já a inativação de

genes supressores tumorais, particularmente o gene p53, leva à perda do controle da parada do ciclo celular em decorrência de um dano extenso ao DNA, ocorrendo conseqüentemente, a perda do estímulo para a apoptose (GHOBRIAL, WITZIG, ADJEI, 2005). Muitos cânceres como o de mama, pulmão, cólon retal, ovário e próstata, têm sido associados com a inibição da apoptose, especialmente relacionada com a mutação do gene p53 (EISINGER et al, 1998; GRETARSDOTTIR et al, 1998).

1.2. Correlação entre Câncer e Apoptose

Definida por Kerr, Wyllie e Curie (1972), a apoptose é reconhecida morfológicamente como um fenômeno de morte celular programada que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. Em humanos, a apoptose ocorre em situações fisiológicas (colapso endometrial durante a menstruação, deleção de células nas criptas intestinais e na embriogênese) e patológicas (doenças neurodegenerativas, lesões secundárias após isquemia, osteoporose), constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual (ISRAELS, ISRAELS, 1999).

O processo apoptótico é caracterizado por inúmeras alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA (via ativação de endonucleases) e a formação dos corpos apoptóticos, com preservação da membrana plasmática e conseqüentemente conservação do conteúdo citoplasmático (ARENDS, MORRIS, WYLLIE, 1990; CONTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; ZIMMERMANN, BONZON, GREEN, 2001; EDINGER, THOMPSON, 2004). Uma característica bioquímica particularmente importante da apoptose, refere-se a externalização de resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática dos corpos apoptóticos, o que permite o reconhecimento dos mesmos por parte de células fagocíticas e sua remoção, evitando assim, a ocorrência de resposta inflamatória (WILLIE, 1985; MARTIN, 1995; CONTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; EDINGER, THOMPSON, 2004).

Classicamente, a apoptose é desencadeada pela ativação de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominadas caspases (OKADA, MARK, 2004). As caspases tratam-se de zimogênios solúveis que podem ser encontrados em diversos compartimentos celulares: no citoplasma, no espaço intermembrana

mitocondrial e na matriz nuclear (NICHOLSON, THORNBERRY, 1997; SORGATO, 2007).

Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases (Figura 1): a via extrínseca ou citoplasmática e a via intrínseca ou mitocondrial. Na via extrínseca, a apoptose é induzida pela ativação de receptores de superfície celular, chamados receptores de morte (DR). Exemplos desses receptores incluem membros da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral, como o Fas/CD95/Apo-1, TNFR1, DR3(Apo-2), DR4(TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2) e DR6. Uma vez ativados, esses receptores recrutam proteínas adaptadoras, que possuem um domínio de morte. As proteínas adaptadoras se unem às pró-caspases 8 ou 10, formando o complexo sinalizador iniciador de morte (DISC), que então leva à ativação desses zimogênios. O resultado deste evento é uma ativação em cascata das caspases, onde as caspases iniciadoras (8 ou 10) causam a ativação das caspases executoras (normalmente a caspase 3), culminando nas alterações morfológicas e bioquímicas características de apoptose (GHOBRIAL, WITZIG, ADJEI, 2005).

A via intrínseca é ativada pela ação de estímulos apoptóticos que incluem: dano ao DNA, níveis elevados de espécies reativas do oxigênio, infecções virais, ativação de oncogenes, radiação ultravioleta, radiação ionizante, ação de agentes quimioterápicos, hipóxia, ausência de fatores de crescimento celular, dentre outros. Tais estímulos estressantes, uma vez detectados pela mitocôndria, levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e à liberação do citocromo c para o citosol da célula. O citocromo c liga-se a Apaf-1 (Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1), uma proteína adaptadora que também possui um domínio de morte. Apaf-1 por sua vez associa-se a pró-caspase 9, levando a formação de um complexo denominado apoptossoma, que na presença de ATP, culmina na ativação da caspase iniciadora 9 e conseqüentemente, na ativação da caspase executora 3, desencadeando o fenômeno apoptótico (OKADA, MARK, 2004; SHI, SHIOZAKI, 2004; GHOBRIAL, WITZIG, ADJEI, 2005; LORENZO, ARNOLDUSSEN, SAATCIOGLU, 2007).

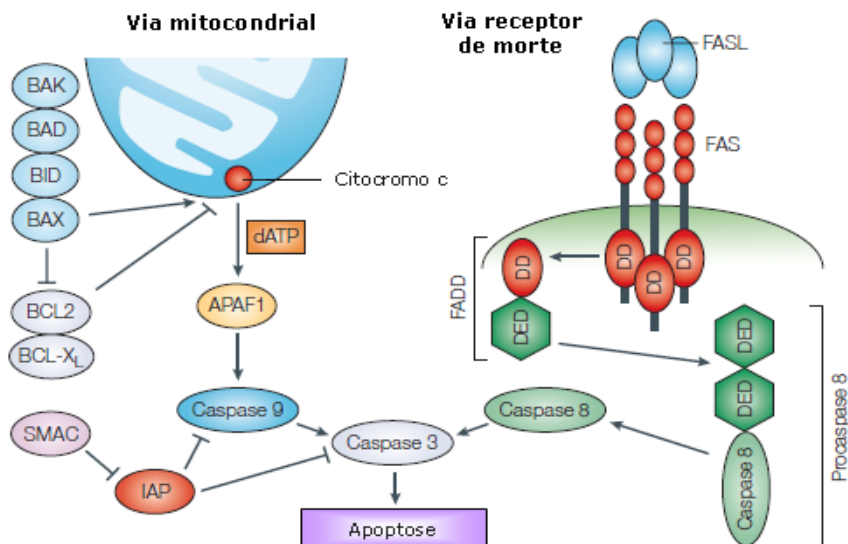


Figura 1. Representação simplificada das duas principais vias envolvidas na apoptose. A via mitocondrial ou intrínseca envolve alterações na permeabilidade mitocondrial, permitindo o extravasamento do citocromo C, o qual após associar-se a proteínas adaptadoras (APAF-1), culmina na formação do apoptossomo e ativação das caspases 9 e 3, desencadeando em morte celular por apoptose. As proteínas Bcl-2 e Bcl-xl inibem a liberação do citocromo C, enquanto que as proteínas BAD, BID e BAX, induzem a liberação dessa molécula. Já a via receptor de morte, ou via extrínseca, caracteriza-se pela ativação de receptores de morte (ex. FAS), os quais uma vez ativados, associam-se a proteínas adaptadoras (ex. FADD), formando o complexo desencadeador de morte DISC que culmina na ativação das caspases 8 e 3, e morte celular por apoptose. Fonte: Adaptado de FESIK (2005); CAMPOS, (2009).

O processo de autodestruição da célula por apoptose é altamente regulado, sendo tal regulação exercida em diferentes níveis (HANGAI, 2007). As proteínas inibidoras da apoptose por sua vez (IAPS), atuam ao se ligarem covalentemente as caspases, impedindo sua ação. Uma IAP que vem sendo caracterizada extensivamente, trata-se da X-IAP (proteína inibidora da apoptose X). Tal proteína exerce sua atividade ao se ligar e inibir as caspases 3,7 e 9 na sua forma ativa. Cabe ressaltar que a X-IAP não é capaz de atuar sobre as caspases na sua forma inativa (SHI, SHIOZAKI, 2004). As FLIPS (Proteína inibidora da enzima conversora de interleucina 1- β tipo FADD) são proteínas que competem com as pró caspases iniciadoras 8 e 10, pela ligação a proteína adaptadora recrutada pelo receptor de morte ativado. Uma vez associada a proteína adaptadora, a FLIP bloqueia a formação do DISC, interrompendo a ocorrência do fenômeno apoptótico (VERMEULEN,

VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2005). Outros reguladores da apoptose, tratam-se dos membros da família Bcl-2, os quais estão envolvidos no controle da via intrínseca. Essa família de proteínas contém membros que exercem funções opostas, pois algumas proteínas exercem efeito pró-apoptótico (membros da subfamília BH-3 only e subfamília Bax) e outras exercem efeito anti-apoptótico (membros da subfamília Bcl-2). Os membros da família BH-3 only, com exceção da proteína BID, exercem seus efeitos ao se ligarem e neutralizarem a ação dos membros anti-apoptóticos. Já os membros da família Bax (Bad, Bax, Bak), exercem seus efeitos ao se oligomerizarem na membrana mitocondrial, propiciando a formação de poros e conseqüentemente a liberação do citocromo C. Por fim, os membros da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1) promovem efeito antiapoptótico ao se ligarem aos membros da família Bax, evitando a formação do poro mitocondrial e o extravasamento de proteínas mitocondriais para o citosol (CORY, ADAMS, 2002).

Outro elemento regulador da apoptose, que atua no controle da via intrínseca, trata-se da proteína supressora de tumor p53, a qual é codificada por seu respectivo gene, em resposta a um dano extenso ao DNA (HANGAI, 2007). A ativação dessa proteína acarreta no aumento da expressão de Bax, o qual, por sua vez, estimula a liberação do citocromo C mitocondrial e conseqüente morte celular por apoptose (GREEN, REED, 1998; SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

Como mencionado anteriormente, o processo carcinogênico pode ser considerado como um desequilíbrio entre a proliferação e morte celular, predominando a proliferação celular. Se o dano ao DNA é muito grande, o processo de apoptose, que elimina as células alteradas seletivamente, pode ser danificado, levando conseqüentemente à proliferação descontrolada e à instalação do câncer (HENGARTNER, 2000). Ou seja, o câncer está diretamente relacionado à ocorrência de mutações em genes que controlam o ciclo celular e a apoptose. Alguns reguladores do ciclo celular participam de ambos processos. A relação entre o ciclo celular e a apoptose ocorre por diferentes genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKB, família Bcl-2 (Bax, Bid), NF-kB, CDK, ciclinas e CKI, uma vez que, após a ativação desses genes, tais proteínas podem induzir a proliferação, a parada do ciclo ou a morte celular (VERMEULEN, BERNEMAN, VAN BOCKSTAELE, 2003). No câncer, um ou mais destes genes podem estar mutados, impedindo dessa forma, a morte celular por apoptose. Dentre estes genes destacam-se o gene supressor de tumor *p53*, que leva à

formação da proteína p53 conhecida como indutora de parada do ciclo celular e desencadeadora de apoptose, e o gene *Bcl-2*, que induz a produção da proteína Bcl-2, a qual atua como bloqueadora do processo apoptótico ao impedir a liberação do citocromo C (HOCKENBERY et al., 1993; KROEMER, 1997; CORY, ADAMS, 2002; GOGVADZE, ORRENIUS, ZHIVOTOVSKY, 2009). Estes dois genes são os mais frequentemente mutados, sendo que em média, 50% dos tumores apresentam estas mutações (REED, 1998; COLMAN, AFSHARI, BARRET, 2000).

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que funciona como um fator de transcrição, estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose, estando elevada em diversos tumores. Tal proteína favorece a proliferação celular ao ativar a transcrição de genes que atuam no controle da progressão do ciclo celular (ciclinas e quinases), e ao inibir a transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular. Além de exercer um papel na progressão do ciclo celular, a proteína c-Myc também apresenta um papel-chave na regulação do processo apoptótico. Estudos demonstram que, tanto a superexpressão quanto a diminuição da expressão de c-Myc podem levar a morte celular (PRITCHARD, WATSON, 1996; THOMPSON, 1998; COLMAN, AFSHARI, BARRET, 2000; COZEN et al., 2000).

Os eventos moleculares envolvidos na apoptose induzida por c-Myc não estão bem esclarecidos. Em geral, essa proteína induz a apoptose em decorrência da privação de fatores de sobrevivência celular. Nessa condição, a proteína atua ativando a transcrição de Bax, (possibilitando a liberação do citocromo C da mitocôndria), receptor Fas e ligante Fas (REYNOLDS et al., 1994).

Finalmente, seria importante ressaltar que parte considerável da morte celular devida à ação de certos quimioterápicos citotóxicos utilizados na terapêutica do câncer, é por apoptose, induzida pela formação de espécies reativas do oxigênio (NAKAGAWA et al., 2002; TSANG et al., 2003).

1.3. Correlação entre Câncer e Angiogênese

Angiogênese refere-se ao processo de formação de novos vasos a partir de capilares e vênulas pós-capilares pré-existentes (RISAU, 1995). Normalmente ela ocorre no organismo adulto, é essencial no desenvolvimento dos órgãos, na cura de ferimentos e em processos inflamatórios, sendo rigorosamente regulada pelo organismo através do balanço entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos (os quais

bloqueiam a formação de novos vasos) ou angiostáticos (os quais promovem uma regressão de vasos recém-formados) (HAUBNER, FINSINGER, KESSLER, 1997). Como exemplo de fatores angiostáticos pode-se citar os pericitos, componentes da matriz extracelular como endostatina e tumstatina, fragmentos de colágeno tipo XVIII e IV e trombospondina (O'REILLY et al., 1997; MAESHIMA et al., 2000; FERREIRA, 2006a). Como fatores pró-angiogênicos têm-se a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF- α), quimiocinas, angiogenina e células inflamatórias (D'AMORE, THOMPSON, 1987; BERNARDINI et al., 2003; FERREIRA, 2006a).

Durante a resposta angiogênica, as células endoteliais, normalmente não proliferativas, são ativadas por diversos fatores pró-angiogênicos, como o bFGF (*fibroblast growth factor – basic*, ou, *type-2*) e a família dos VEGFs (FOLKMAN, 1995a; FACHINGER, DEUTSCH, RISAU, 1999; YANCOPOULOS et al., 2000; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). Esses fatores interagem com glicosaminoglicanas e proteoglicanas presentes na matriz extracelular, na lâmina basal e em receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência das células endoteliais entre uma variedade de tipos celulares (SOLIMENE et al., 1999; CHIPPERFIELD et al., 2002; SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

O processo de angiogênese envolve uma série de etapas (Figura 2). Primeiramente, células endoteliais do vaso-mãe são estimuladas pela liberação de citocinas angiogênicas. Em um segundo momento, a lâmina basal começa a ser degradada pela ação de proteases da matriz extracelular, sendo liberada do endotélio. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, proliferam e iniciam o brotamento capilar. A direção da migração é apontada para a fonte dos estímulos angiogênicos. A seguir, o broto formado expande e assume a forma tubular e uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose e dão origem à cadeia circulatória funcional (LIOTTA, STEEG, STELLER-STEVENSON, 1991; GIANNIS, RÜBSAN, 1997).

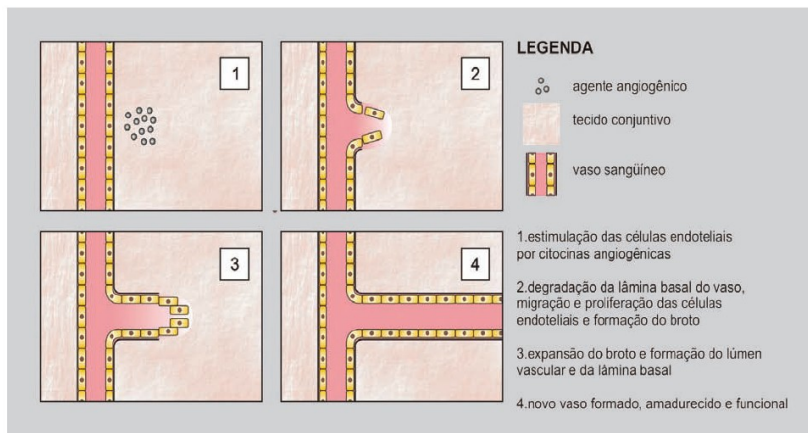


Figura 2. Representação esquemática da angiogênese. Fonte: DA SILVA (2007).

A angiogênese fisiopatológica (neovascularização) é característica em diversos processos patológicos, como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, na psoríase, obesidade, aterosclerose, isquemia, osteoporose, e outras condições (FOLKMAN, 1995b; RISAU, 1995; JONES et al., 2001; FERREIRA, 2006a).

O papel da angiogênese na biologia do câncer foi descrito inicialmente por Folkman (1971), que postulou e descreveu o fenômeno da dormência do tumor, na ausência de vascularização. No tumor existe um balanço entre proliferação e regressão que impede a expansão tumoral (estado de “dormência”). Somente após o recrutamento de seu próprio suprimento sanguíneo é que o tumor pode expandir em tamanho, uma vez que um inadequado suprimento de oxigênio e nutrientes resulta em altas taxas de apoptose. Cabe ainda ressaltar que a neovascularização que possibilita o crescimento de tumores sólidos e formação de metástases envolve a produção de fatores angiogênicos secretados pelas células tumorais e é conhecido como “*angiogenic switch*” (FOLKMAN, 1971; SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (LIOTTA, STEEG, STELLER-STEVENSON, 1991). Dessa forma, estratégias antiangiogênicas e, conseqüentemente antitumorais, são baseadas na inibição da proliferação de células

endoteliais, interferências na migração e adesão nessas células e interferência com metaloproteinasas (GRIFFIOEN, MOLEMA, 2000).

No endotélio em “repouso” (sem atividade angiogênica), a integrina $\alpha\beta 3$ praticamente não é detectada. Na angiogênese induzida por citocinas ou por tumores, entretanto, sua expressão é intensamente estimulada (BROOKS, 1996; LIEKENS, DE CLERCQ, NEYTS, 2001). A falta de interações célula-matriz específicas induz o sinal apoptótico nas células endoteliais envolvidas na angiogênese e, portanto, previne a neovascularização. Em vários modelos animais foi demonstrado que antagonistas de integrina bloqueiam a angiogênese induzida por fatores de crescimento e tumores (CHERESH, 1998; BRASSARD *et al.*, 1999; ELICEIRI, CHERESH, 2001).

1.4. Plantas como fontes de medicamentos quimioterápicos

Dentre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial de saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma parcela significativa é preenchida por medicamentos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais. Pode-se citar, por exemplo, importantes fármacos extraídos de plantas como a digoxina, obtida de espécies de *Digitalis*, a quinina e a quinidina, obtidos de espécies de *Cinchona*; a atropina e a escopolamina obtidas de *Atropa belladonna*; a morfina e a codeína, obtidas de *Papaver somniferum*. A maioria desses produtos não possui ainda um método de síntese economicamente viável, sendo obtidos a partir de plantas selvagens ou cultivos extensivos (FELLOWS, 1992; RATES, 2001; YUNES, CECHINEL FILHO, 2001; HOSTETTMAN, QUEIROZ, VIEIRA., 2003; SILVA, CARVALHO, 2004).

A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais possui um importante papel no tratamento do câncer, e de fato, muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido direcionados ao combate desta patologia (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2003; BUTLER, 2004). De acordo com Calixto (2003), aproximadamente 70% dos fármacos antitumorais existentes no mercado, são derivados de plantas. Como exemplo pode-se citar: alcalóides da vinca, como vincristina e vimblastina, isolados da *Catharantus roseus* (Apocynaceae); derivados de lignanos como etoposídeos e tenoposídeos; derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, isoladas de espécies do gênero *Podophyllum* (Berberidaceae), bem como taxanos isolados de espécies do gênero

Taxus (Taxaceae), derivados semi-sintéticos da camptotecina, irinotecano e topotecano, isoladas de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), dentre outros (DE MESQUITA et al., 2009).

Apesar de várias substâncias naturais com importância terapêutica terem sido isoladas de plantas da flora brasileira, as investigações científicas relacionadas aos estudos químicos, bioquímicos e farmacológicos de substâncias provenientes de plantas medicinais estão aquém do potencial de nossa flora. É importante ressaltar que no Brasil, dos quase seis mil produtos farmacêuticos disponíveis entre fármacos e fitofármacos, poucos foram desenvolvidos por indústrias nacionais. No entanto, investe-se bilhões de dólares na importação da matéria-prima utilizada na produção de fármacos (BLOCK et al., 1998).

1.5. *Casearia sylvestris*

Casearia sylvestris Swartz (Figura 3), pertence à família Flacourtiaceae, a qual é constituída por 89 gêneros e 1300 espécies encontradas em diversas regiões temperadas e tropicais do mundo. Somente o gênero *Casearia*, possui mais de 1000 espécies conhecidas, destas, 70 espécies podem ser encontradas em território brasileiro, sendo encontrada principalmente nos estados do Amazonas e de São Paulo (ABSY, SCAVONE, 1973; MOSADDIK et al., 2004).

A *C. sylvestris* SW trata-se de uma árvore que apresenta em torno de 4-6 metros de altura, com tronco de 20-30 centímetros de diâmetro. Anatomicamente, suas estruturas vegetativas e reprodutivas são caracterizadas pela presença de inclusões cristalinas e células glandulares repletas de óleo essencial. Suas folhas são um tanto assimétricas, persistentes, glabras ou ásperas, pecioladas, lanceoladas, serreadas, alternas, brilhantes em cima e dotadas de glândulas visíveis por transparência em todo o limbo (que apresenta em torno de 6-12 cm de comprimento, por 3-5 cm de altura). Suas flores são pequenas e numerosas, de coloração esverdeada, actinomorfas, diclamídeas e hipóginas. Os frutos são cápsulas septicidas, com sementes envolvidas por arilo vermelho. Esta árvore floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro, prolongando-se até meados de novembro (ABSY, SCAVONE, 1973; SCAVONE et al., 1979; LORENZI, 1992; FERREIRA, 2006b).

No Brasil, a *C. sylvestris* é conhecida principalmente como guaçatonga, uma palavra originária do tupi-guarani, o que sugere o antigo uso da planta por parte de comunidades indígenas brasileiras (ESTEVES et al., 2005). Outros nomes populares comumente utilizados para a planta nesse país são: guaçatunga, vaçatonga, café-bravo, café-do-diabo, porangaba, cafeeiro-do-mato, cafezinho-do-mato, herba-de-lagarto, pau-de-lagarto, língua-de-giú (HOEHNE, 1939; SCAVONE et al., 1979; BASILE et al., 1990).

O gênero *Casearia* tem se caracterizado pela ocorrência de substâncias de interesse como cumarinas (TALAPATRA et al., 1983), flavonóides (JUNGLES, SCHENKEL, SIMÕES, 1985) e diversos diterpenos, especialmente clerodânicos (KHAN et al., 1990; MORITA et al., 1991; HUNTER et al., 1997). Os diterpenos clerodânicos mais comumente encontrados nas folhas de *C. sylvestris*, tratam-se das casearinas. Atualmente, foram isolados e identificados 20 tipos diferentes dessas moléculas na planta, as quais foram denominadas de acordo com as letras do alfabeto de A a T (MORITA et al., 1991) (Figura 4). Estudos têm evidenciado a atividade citotóxica das casearinas sobre diversos microorganismos e linhagens celulares (incluindo células tumorais), sugerindo dessa forma, uma possível atividade antitumoral dessas moléculas isoladas da planta (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; DE CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al. 1999; FERREIRA, 2006b). Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados no intuito de esclarecer o possível potencial antitumoral desses compostos.



Figura 3. *C. sylvestris* Swart. (A) Árvore de *C. sylvestris* (B) Inflorescência de *C. sylvestris* (C) Frutos de *C. sylvestris* (D) Folhas de *C. sylvestris*. Fonte: (BLANCO, 2006 apud FERREIRA, 2006b, p.33).

Além das casearinas, novos diterpenos clerodânicos, conhecidos como casearvestrinas, têm sido identificados nas folhas de *C. sylvestris* (ORBELIES et al., 2002; FERREIRA, 2006b) (Figura 5). Recentemente, foram isolados do extrato alcoólico obtido das folhas da planta, dois derivados do ácido gálico, o isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE) e o metil galato-3,5-dimetil éter (MGDE) (Figura 6), os quais demonstraram efeito antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich e o carcinoma de pulmão de Lewis (DA SILVA, CHAAR, YANO, 2009).

B

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

A

Figura 4. Estrutura química das casearinas. (A) Estrutura geral das casearinas; (B) Respectivos substituintes das casearinas A-T. Fonte: (MORITA et al., 1991 apud FERREIRA, 2006b, p.36).

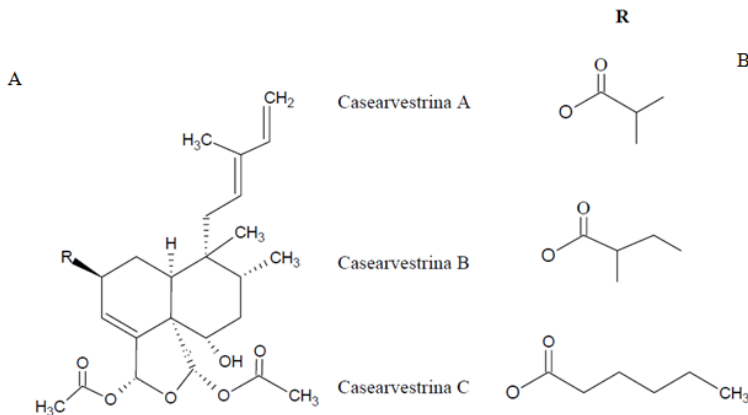


Figura 5. Estrutura química das casearvestrinas. (A) Estrutura geral das casearvestrinas; (B) Respectivos substituintes das casearvestrinas A-C. Fonte: (ORBELIES et al., 2002; FERREIRA, 2006b).

Sobre a constituição do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, há relatos descrevendo a presença de bicilogermacreno, um composto

que apresenta atividade antitumoral, que constitui o componente majoritário do óleo essencial da planta (40,9%). Outros componentes abundantes nesse óleo são os sesquiterpenos β -cariofileno e δ -humuleno, os quais apresentam atividade citotóxica e antiinflamatória comprovadas (ESTEVES et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; DA SILVA et al., 2008b).

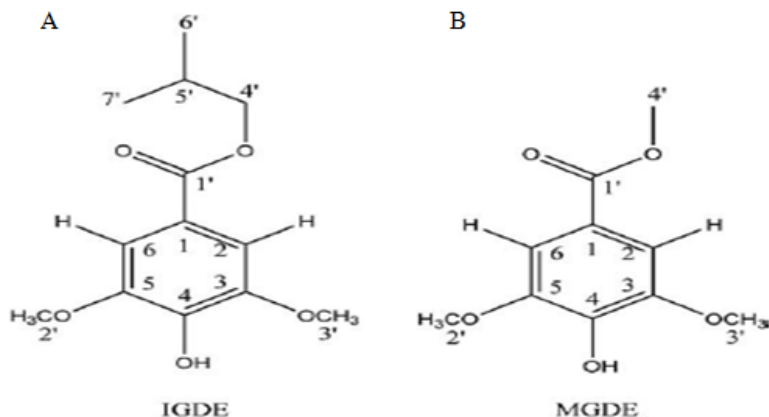


Figura 6. Estrutura química dos derivados do ácido gálico isolados do extrato alcoólico obtido de folhas de *C. sylvestris*. (A) isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE); (B) metil galato-3,5-dimetil éter (MGDE). Fonte: (DA SILVA, CHAAR, YANO, 2009).

A *C. sylvestris* é utilizada na medicina popular como agente antisséptico, anestésico local, cicatrizante, antitérmico, antitumoral, anti-ulcerativo e antiofídico. Outras aplicações populares da planta referem-se ao uso como anestésico tópico e para o tratamento de herpes, sífilis e síndromes diarréicas (HOEHNE, 1939; ITOKAWA, 1988; BASILE et al., 1990; HIRSCHMANN, ARIAS, 1990; ALONSO, 2004; ESTEVES, 2005).

Muitos desses usos populares já foram corroborados pela comunidade científica, por exemplo, a ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, explica o uso popular da planta no tratamento de feridas, pequenas ulcerações da pele e diarreia (HOEHNE, 1939; FERREIRA 2006b). Já a atividade citotóxica da planta sobre diversas linhagens tumorais (HT 29, Hela, A-579, V79, SF 295, HCT-8, MDA-MB 435, HL-60), pode justificar o uso popular da mesma como agente antitumoral (MAISTRO, CARVALHO, MANTOVANI, 2004; FERREIRA, 2006b; DA SILVA et al., 2008; DE MESQUITA, 2009). Investigações clínicas demonstraram cicatrização progressiva de lesões

intra e extra-orais causadas por herpes simples depois da aplicação tópica de *C. sylvestris*, o que corrobora seu uso popular para o tratamento de herpes (CAMARGO, 1993; FERREIRA, 2006b).

O uso popular da *C. sylvestris* na prevenção de úlceras gástricas, também foi investigado. Basile e colaboradores (1990) observaram que o extrato etanólico da planta possui propriedades anti-ulcerativas, e afirmam que tal propriedade pode estar relacionada à presença dos óleos voláteis, taninos e triterpenos presentes nas folhas da planta. Esses dados corroboram as informações obtidas por Esteves e colaboradores (2005), os quais observaram que o óleo essencial da *C. sylvestris* possui efeito anti-ulcerativo e antiinflamatório. Os autores sugerem que essas atividades podem estar diretamente relacionadas à presença de compostos terpênicos (sesquiterpenos) no óleo essencial das folhas da planta.

Dados da literatura apontam que o extrato aquoso de *C. sylvestris*, inibe as atividades tóxicas e enzimáticas exibidas pelo veneno de uma variedade de serpentes e abelhas. A ação neutralizante do extrato ocorre por intermédio da inibição da fosfolipase A₂ e de metaloproteinases presentes nos venenos, o que previne a ocorrência de paralisia neuromuscular, dano muscular e alterações no sistema de coagulação sanguínea, além de reduzir a formação de edema e de hemorragia características do processo de envenenamento botrópico (BORGES et al., 2000; BORGES et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2007; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008). Esse efeito neutralizador pode estar associado à presença de quatro derivados de ácido elágico (ácido elágico, 3'-O-metil-ácido elágico, 3, 3'-O-dimetil-ácido elágico e 3-O-metil-3', 4'-metilenodioxo-ácido elágico), no extrato aquoso da planta, os quais foram capazes de inibir tanto a atividade miotóxica quanto a formação de edema induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e fosfolipase A₂ isolada do mesmo (DA SILVA et al., 2008a).

Perante o uso popular de *C. sylvestris* como analgésico local, De Mattos e colaboradores (2007), investigaram o efeito antinociceptivo do extrato bruto hidroetanólico obtidos de folhas da planta, e observaram que a *C. sylvestris* possui um potencial antinociceptivo particularmente importante, no que se refere à dor associada a condições inflamatórias.

A *C. sylvestris* também apresenta efeito sobre a osteogênese. Sassiotto e colaboradores (2004) observaram que o decocto a 5% de *C. sylvestris*, diminuiu a osteogênese em defeitos ósseos femurais de ratos preenchidos com matriz bovina desvitalizada. Os autores sugerem que

esse efeito deve-se à presença de compostos fitoquímicos com ação antiinflamatória na planta, que, agindo como os antiinflamatórios não hormonais, estariam inibindo a síntese de prostaglandinas e promovendo a diminuição da formação de fibras colágenas e do número de macrófagos e fibroblastos ativos, inibindo a osteogênese.

Por fim, cabe ressaltar que a *C. sylvestris* apresenta ainda efeito antihiperlipêmico (SCHOENFELDER et al., 2008), atividade anticolinesterásica (DA SILVA et al., 2006) e atividade citotóxica sobre *Aspergillus niger* (OBERLIES et al., 2002), *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* amastigotes (MESQUITA et al., 2005) e larvas de *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Baseando-se nos dados supracitados, o presente trabalho pretendeu avaliar o potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico, antitumoral e antiangiogênico do extrato bruto e frações da *C. sylvestris* utilizando, para isso, modelos biológicos e bioquímicos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a citotoxicidade dos extratos e frações de *C. sylvestris* em células do carcinoma de Ehrlich, através do ensaio de citotoxicidade mitocondrial do MTT.
2. Avaliar o efeito antiproliferativo dos extratos e frações de *C. sylvestris* em células do carcinoma de Ehrlich, através da realização do teste de incorporação da timidina.
3. Avaliar a atividade nucleásica dos extratos e frações de *C. sylvestris*, através da realização do ensaio de avaliação de danos no DNA plasmidial.
4. Avaliar a atividade pró-apoptótica dos extratos e frações de *C. sylvestris* em células do carcinoma de Ehrlich, através da observação da morfologia nuclear das células neoplásicas, com o auxílio de corantes nucleares específicos.
5. Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* dos extratos e frações de *C. sylvestris* na forma líquida do carcinoma de Ehrlich, através da avaliação da viabilidade celular pelo método do azul de tripan e da avaliação de parâmetros morfofisiológicos e histocitológicos (variação de peso e de circunferência abdominal, volume de líquido ascítico e de células compactadas e tempo de sobrevida).
6. Avaliar o efeito antiangiogênico dos extratos e frações de *C. sylvestris* que demonstraram a melhor atividade antitumoral *in vivo*, em membrana córioalantóica de ovos de galinha fertilizados.

3. METODOLOGIA

3.1. Caracterização de *C. sylvestris*

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas em Criciúma, Estado de Santa Catarina, sendo posteriormente identificadas pela professora Dra. Vanilde Citadini-Zanette. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Criciúma, Brasil) (CRI 7381).

O extrato bruto e frações da planta utilizados nesse estudo foram produzidos e gentilmente cedidos pela Dra. Maria Helena Rossi, do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais, do Centro de Sanidade Animal, do Instituto Biológico de São Paulo.

3.1.1. Preparo do extrato bruto e frações de *C. sylvestris*

Folhas secas de *C. sylvestris* foram moídas e submetidas à maceração com etanol absoluto (P.A.) a frio por 3 a 4 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes consecutivas. Após, efetuou-se a evaporação do solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um resíduo chamado de extrato bruto etanólico (EB-ETOH). Posteriormente, tal extrato foi submetido a uma cromatografia rápida sob vácuo em coluna de sílica 60, utilizando-se os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: clorofórmio, acetato de etila e metanol. Desta forma, foram obtidas respectivamente as frações clorofórmica (f-CHCl₃), acetato de etila (f-AcOEt) e metanólica (f-MeOH).

3.2. Cultivo in vitro das células do carcinoma de Ehrlich

Células do carcinoma de Ehrlich, isoladas de camundongos Balb-C doadores, foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e NaHCO₃. As células foram mantidas em uma densidade de 1-2 x 10⁶ células/ml de meio, à temperatura de 37°C e em ar atmosférico contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.3. Animais

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20±2g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), CCB - UFSC.

Tais animais foram pesados, divididos em grupos de 12 e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 hs, temperatura 25± 2°C~ 60% umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

Previamente à aplicação do protocolo experimental *in vivo*, submeteu-se esse projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), o qual foi aprovado sob o número 23080.008779/2009-19.

3.4. Ovos

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da atividade antiangiogênica, foram utilizados ovos de galinha (*Gallus domesticus*) fertilizados, adquiridos junto à empresa Tyson® do Brasil, localizada no município de São José- SC.

Previamente à aplicação do protocolo experimental *in vivo*, submeteu-se esse projeto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), o qual foi aprovado sob o número 23080.038415/2009-55.

3.5. Ensaios biológicos

3.5.1. Ensaios biológicos *in vitro*

3.5.1.1. Avaliação da atividade citotóxica

3.5.1.1.1 Citotoxicidade pela redução do MTT

O MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil) é um sal de coloração amarelo-ouro, que é reduzido a formazan (um composto de coloração púrpura) pelo metabolismo mitocondrial. Desta forma, o MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

Para a avaliação do efeito citotóxico dos extratos de *C. sylvestris*, procedeu-se da seguinte maneira: células do carcinoma de Ehrlich foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma densidade celular de 5×10^6 células/mL e incubadas em uma estufa em ambiente controlado (temperatura de 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂). 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo os extratos a serem analisados (extrato bruto etanólico e as frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica) nas concentrações que abrangem a faixa de 31,25 - 1000 µg/mL (KVIECINSKI et al., 2008).

Após o seu tratamento pelo período de 12, 18 e 24 horas o meio de cultura contendo os extratos foi retirado, e o MTT (1mg/mL) foi adicionado, seguido de incubação por 4 horas, em ambiente controlado. Decorrido esse período, o MTT excedente foi removido, sendo adicionado 100 µl de DMSO (PA) para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente com o auxílio de um leitor de placas (540nm) para se determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Neste experimento, uma solução constituída por DMSO 1% (veículo de diluição dos extratos) foi utilizada como controle negativo.

Cabe ressaltar que cada concentração foi testada em oito replicatas, em três experimentos individuais e em três dias diferentes. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = [(Abs_{\text{teste}} - Abs_{\text{branco}}) \times 100] / Abs_{\text{controle}}$$

Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória 50%) foram calculados por regressão linear e expressos em Média ± Desvio-padrão. Considerou-se os valores dos controles negativo como 100% de viabilidade celular sem a presença dos extratos testados.

3.5.1.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

3.5.1.2.1 Ensaio de incorporação da timidina

A timidina é um nucleosídeo do ácido desoxirribonucleico (DNA) formado pela base nitrogenada, timina, ligada a uma pentose (desoxirribose) através da ligação β-N-glicosídica (TENG et al., 2006).

O processo de incorporação da timidina ao DNA é realizado em múltiplas etapas. A etapa inicial do seu metabolismo é a fosforilação da desoxitimidina para 5-desoxitimidina-monofosfato (dTMP), que é catalisada pela enzima timidina quinase 1 (TQ1). Nesta etapa, o nucleosídeo se transforma em nucleotídeo, o qual não consegue atravessar a membrana celular e permanece retida na célula (TENGG *et al.*, 2006). A etapa seguinte é a conversão de dTMP para 5-desoxitimidina-difosfato (dTDP) e, depois, para 5-desoxitimidina-trifosfato (dTTP) até a incorporação ao DNA (SCHWARTZ *et al.*, 2004).

Células do carcinoma de Ehrlich foram colocadas em placas de 96 poços, em uma densidade celular de 5×10^6 células/mL e incubadas em uma estufa em ambiente controlado. Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo os a serem analisados extratos e [metil-3H]-timidina (1 μ Ci/mL). As concentrações de extrato utilizadas (extrato bruto: 175,9 μ g/mL; fração clorofórmica: 92,0 μ g/mL e fração acetato de etila: 93,5 μ g/mL) foram estimadas a partir do CI_{50} encontrada no MTT para a mesma linhagem celular. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados duas vezes com PBS (250 μ L/poço). Posteriormente, as células foram transferidas para microtubos, sendo lavadas com 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 10%). As células foram então fixadas com solução de éter:etanol (1:3) e deixadas à temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido este período, foi adicionado 250 μ L de hidróxido de sódio (0,2 N), sendo a radioatividade incorporada verificada por medidor de cintilação (MOTA SIQUEIRA, 2009).

Os valores obtidos foram expressos em percentual de incorporação de H^3 -timidina e normalizados pela concentração de proteínas totais presentes em cada amostra.

3.5.1.3 Avaliação da atividade nucleásica

3.5.1.3.1 Avaliação de dano no DNA plasmidial

Além de sua forma superenovelada (F I) normal, o DNA plasmidial pode “adotar” a forma circular aberta (F II) e a forma linear (F III). Quebras na dupla hélice, fazem com que a forma superenovelada (original) transforme-se em forma circular aberta (através de quebras simples) e/ou forma linear (através de quebra dupla de cadeia) (Figura 7).

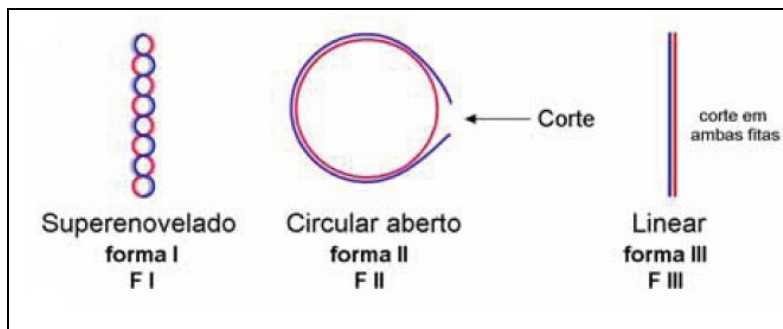


Figura 7. Esquema de corte da molécula de DNA Plasmidial. Fonte: Adaptado de BERG, TYMOCZKO, STRYER, 2004).

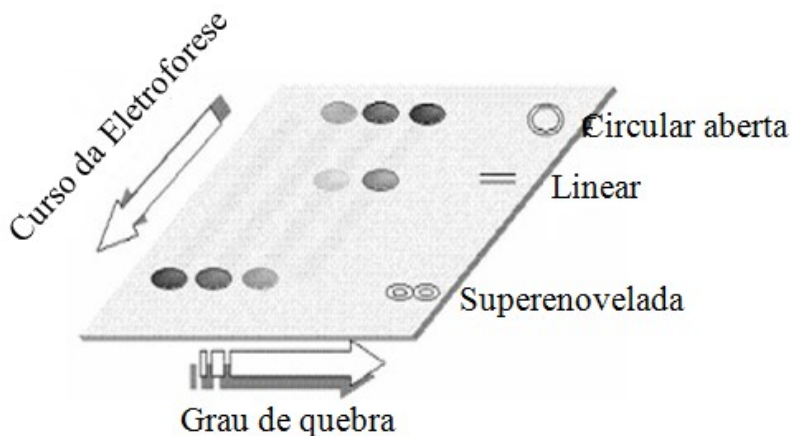


Figura 8. Imagem típica de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos. Fonte: MANCIN et al, (2005).

As três formas (FI, FII e FIII), que podem ser adotadas pelo DNA, possuem velocidades eletroforéticas diferenciadas, apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese como mostrado na Figura 8 (SREDDHARA; COWAN, 2001).

Para avaliar o potencial indutor ou protetor de danos ao DNA induzido pelos extratos de *C. sylvestris* foram utilizados plasmídeos pUC 9.1 isolados de *Escherichia coli* DH5 α FIQ, que confere resistência aos antimicrobianos ampicilina e canamicina. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina, de acordo com as

instruções presentes na bula do kit de extração Perfectprep Plasmid Mini da Eppendorf. A quantificação do DNA obtido foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta, com leitura em comprimento de onda de 260 nm, onde uma unidade de densidade ótica, em 260 nm, corresponde a 50µg/mL de DNA (BISO, 2008). O DNA plasmidial obtido, que não foi utilizado no momento da extração, foi estocado a 4°C, por no máximo 5 dias.

Para a avaliação da atividade nucleásica dos extratos, realizou-se uma incubação em microtubos, durante 16 horas, a 50°C, de 5µl de uma solução de DNA plasmidial (600ng), 5 µl de tampão HEPES (pH 7,4) e 10 µl dos extratos, em concentrações que abrangem a faixa de 75 a 600µg/mL. Decorrido o período de incubação, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose. Posteriormente, realizou-se a revelação do gel com brometo de etídio e puderam-se visualizar as bandas que representam o perfil de quebra do DNA plasmidial (intacta ou superenovelada, com quebra simples ou circular aberta e com quebra dupla ou linear, FI, FII e FIII, respectivamente) induzido pelos extratos. Em um computador, através da utilização do programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.), procedeu-se a quantificação das bandas e conseqüente determinação das quantidades das três formas adotadas pelo DNA plasmidial após sua corrida eletroforética (SCARPELLINI *et al.*, 2003). A intensidade de DNA supertorcido foi corrigida por um fator de 1,47, como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREEDHARA; COWAN, 2001). Nesse experimento, foi utilizado DMSO 1% como controle negativo (veículo de diluição dos extratos).

Para a verificação da atividade protetora do DNA plasmidial contra ataque oxidativo, procedeu-se da mesma maneira descrita para a avaliação do potencial indutor de danos, com a diferença de que na incubação, foram adicionados aos microtubos o DNA, tampão, extrato, e 10µL de uma solução constituída por Fe-EDTA (20µM), a qual, através da indução da geração de peróxido de hidrogênio, uma importante fonte de espécies reativas do oxigênio (EROs), promove cortes no DNA de maneira oxidativa. Neste experimento, uma incubação constituída por DNA, tampão e solução de Fe-EDTA (20µM), foi utilizada como controle positivo (SCARPELLINI *et al.*, 2003).

Os valores obtidos foram expressos em percentual da forma de quebra adotada pelo DNA plasmidial.

3.5.1.4. Avaliação da atividade pró-apoptótica

3.5.1.4.1 Coloração Diferencial por Brometo de Etídio/ Laranja de Acrinidina

Células do carcinoma de Ehrlich, na concentração de 5×10^6 células/mL foram incubadas durante 24 horas, em uma estufa a 37°C e que mantém uma atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 . Decorrido esse tempo, o meio foi removido e substituído por outro meio contendo os extratos a serem analisados. As concentrações de extrato utilizadas (extrato bruto: $175,9 \mu\text{g/mL}$; fração clorofórmica: $92,0 \mu\text{g/mL}$ e fração acetato de etila: $93,5 \mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do CI_{50} encontrada no MTT para a mesma linhagem celular. A suspensão de células foi transferida para um tubo do tipo eppendorf e centrifugada durante 10 minutos a baixa rotação (10 g, correspondente a 1000rpm). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em $25 \mu\text{l}$ de PBS. Em seguida, $1 \mu\text{l}$ da solução corante (1:1) de BE ($100 \mu\text{g/mL}$)/LA ($100 \mu\text{g/mL}$) foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferidas para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida, levadas para o microscópio de fluorescência para observação dos efeitos celulares. Uma solução de DMSO 1% (veículo de diluição dos extratos), foi utilizada como controle negativo (GENG, ZENG, WANG, 2003).

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra, as quais foram montadas em lâminas e posteriormente fotografadas para o registro visual de possíveis alterações.

3.5.2. Ensaios biológicos *in vivo*

3.5.2.1. Avaliação da atividade antitumoral

3.5.2.1.1. Modelo Experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich (TAE)

3.5.2.1.1.1. Protocolo Experimental

Neste modelo experimental, foram utilizados camundongos Balb/c distribuídos em seis diferentes grupos experimentais ($n= 12$ por grupo experimental pesando 20 ± 2 g): I) controle normal (solução de

DMSO a 10%); II) controle negativo (TAE + solução de DMSO a 10%); III) controle positivo (TAE + Doxorrubicina); IV) grupo tratado com EB-ETOH (TAE + EB-ETOH); V) grupo tratado com f-AcOEt (TAE + f-AcOEt); VI) grupo tratado com f-CHCl₃ (TAE+ f-CHCl₃).

Inoculou-se em todos os camundongos (com exceção do grupo controle normal), 5 X 10⁶ células tumorais no peritônio em condições assépticas. O dia da inoculação do tumor foi considerado dia zero (0). O tratamento dos animais iniciou-se 24 h após a inoculação das células tumorais, administrando-se doses dos extratos ou doxorrubicina nas concentrações de 150 mg/kg e 1,2 mg/kg, respectivamente, durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I e II receberam 50 µl de uma solução de DMSO a 10% diariamente durante o mesmo período de tratamento. Todos os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (i.p.).

No décimo dia, seis animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo retirado o líquido ascítico para a realização das análises. Os animais restantes de cada grupo foram mantidos pelo período de 30 dias para a avaliação da sobrevida em comparação ao grupo controle do tumor (grupo controle negativo).

3.5.2.1.1.2. Avaliações Cronomorfológicas

3.5.2.1.1.2.1. Avaliação da Média de Sobrevida

Para determinação da sobrevida (6 animais por grupo), os animais inoculados com o tumor de Ehrlich e tratados ou não com os extratos e frações de *C. sylvestris* ou doxorrubicina foram observados diariamente, durante o período de 30 dias.

A partir desse monitoramento, foram feitos o registro da mortalidade diária, e posteriormente calculada a taxa média de sobrevida (TMS) e a percentagem média de sobrevida (PAL), através das seguintes fórmulas:

$$TMS = (\text{Dia da 1}^\circ \text{ morte} + \text{Dia da última morte}) / 2$$

$PAL (\%) = [(\text{TMS do grupo tratado} / \text{TMS do grupo controle}) - 1] \times 100$ (QURESHI, 2001).

3.5.2.1.1.2.2. Avaliação da Variação de Peso

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença entre o peso final (após os 9 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0). Os resultados obtidos foram expressos em gramas (REBELLO, 2004).

3.5.2.1.1.2.3. Avaliação da Variação da Medida da Circunferência Abdominal

Para se determinar a variação da circunferência abdominal dos camundongos, foi calculada a diferença entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados obtidos foram expressos em centímetros (REBELLO, 2004).

3.5.2.1.1.3. Avaliações histocitológicas

3.5.2.1.1.3.1. Avaliação da viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de tripan

A viabilidade celular foi avaliada pela incorporação do azul de tripan, um corante que só penetra nas células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

Após a retirada do líquido ascítico dos animais, a viabilidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma solução constituída por 10 μ L deste líquido, 890 μ L de solução salina e 100 μ L do corante azul de tripan (4%). Os resultados foram expressos na proporção de células inviáveis/ células viáveis (STROBER, 1996).

3.5.2.1.1.3.2. Determinação do volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas

O volume ascítico total foi mensurado utilizando tubos falcon graduados. O volume de células compactadas foi determinado após a

centrifugação a 1000g por 5 min dos respectivos tubos falcon preenchidos com todo líquido retirado dos animais (REBELLO, 2004).

3.5.2.1.1.4. Avaliações bioquímicas

3.5.2.1.1.4.1. Avaliação da fragmentação do DNA pelo teste do cometa




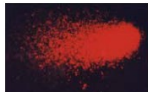
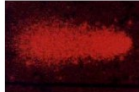
No intuito de se avaliar se os tratamentos com os extratos e frações aqui pesquisados poderiam induzir dano ao DNA das células do TAE, utilizou-se o teste do cometa (SINGH *et al.*, 1988). Este teste fundamenta-se na eletroforese de células lisadas sob condições alcalinas e embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas de microscopia. Diluiu-se 20 µL do líquido ascítico retirado dos camundongos em 100 µL de PBS (1:10). Coletou-se 10 µL dessa diluição, que foram homogeneizados em 70 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA 0,75%) a 37°C. Transferiu-se esse sistema (células/LMPA) para uma lâmina de microscopia, a qual continha uma pré-camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA 1%) obtida previamente por esfregaço. Em seguida, cobriu-se o referido sistema, com uma lamínula de vidro. As lâminas foram então acondicionadas a 5°C durante 5 min. Posteriormente efetuou-se a retirada das lamínulas e transferiu-se as lâminas para cubas apropriadas, envoltas em papel alumínio (para proteger da luz) e contendo solução de lise a 4°C (2,5 mM NaCl, 100 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 10% de DMSO e 10 mM Tris pH 10) por 24 horas. Após o período de lise das membranas celulares e nucleares, as lâminas foram mantidas durante 30 minutos em tampão alcalino a 4°C (300 mM NaOH e 1 mM de EDTA, pH 13), e o DNA liberado foi, então, submetido a uma eletroforese horizontal sob voltagem de 25 V e corrente elétrica de 280 mA por 20 min. A seguir as lâminas foram lavadas três vezes, em intervalos de 15 min, com solução neutralizadora (tampão Tris 0,4M, pH 7,5). Finalmente, cada lâmina foi corada com brometo de etídio (2µg/mL), e então fixada com etanol a 4°C. Efetuou-se a leitura das lâminas em microscópio de imunofluorescência (400X) com filtro de excitação de 515 nm e filtro de extinção de 560 nm (SINGH *et al.*, 1988). Para o controle negativo das amostras, utilizou-se líquido ascítico de um camundongo tratado apenas com DMSO 10%.

Para cada animal, analisou-se aleatoriamente, imagens de 100 células (50 células de cada lâmina, em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi classificado visualmente. Os

cometas das células de cada animal foram divididos em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (indicativos de ausência de dano e denominados cometas de classe 1), até cometas que apresentaram cauda longa (indicativos de dano máximo ao DNA e denominados cometas de classe 5).

Com o intuito de expressar-se o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, segundo demonstrado na Tabela 2:

Tabela 1. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada. Fonte: CARBONARI, 2005.

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Pontuação	0	1	2	3	4
Imagem do cometa					

Para cada animal atribuiu-se uma pontuação utilizando-se o índice de unidades arbitrárias, obtido de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação a seguir:

Índice de Dano ao DNA = (nº cometas classe 1 X 0) + (nº cometas classe 2 X 1) + (nº cometas classe 3 X 2) + (nº cometas classe 4 X 3) + (nº cometas classe 5 X 4).

Consequentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Então, o índice de dano de cada grupo variou de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

Para todas as amostras, os resultados foram expressos como Média ± Desvio padrão das unidades arbitrárias de cada grupo experimental e da quantidade de células por classe de dano.

3.5.2.2. Avaliação da atividade antiangiogênica

3.5.2.2.1. Ensaio da membrana corioanlatóica (CAM)

A avaliação da atividade antiangiogênica da *C. sylvestris* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994). Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de 37°C e sob umidade relativa do ar

de 33%. Após 48h de incubação (2 dias), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo e, assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada a fim de se evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Logo na sequência, outra janela, agora com cerca de 15 mm de diâmetro, foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões. Estas janelas foram fechadas com auxílio de fita adesiva e fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72h até a idade embrionária de 6 dias ou 144 h, quando um disco de metilcelulose (1,5%) adsorvido com os extratos a serem testados (3,25; 7,5 3 15,0 µg/disco), foi implantado sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a fita adesiva e fita isolante. Assim a incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias, quando se realizou a análise da atividade antiangiogênica.

A fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados. Uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com aumento de 20x capturou imagens que foram enviadas para um microcomputador, onde cada imagem foi utilizada para se realizar uma contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm². Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão, em relação ao grupo controle negativo.

Concluídos os procedimentos de incubação, realizou-se a biometria e a mensuração do comprimento dos embriões, que, posteriormente, foram fixados em formol a 10%. O comprimento embrionário foi expresso em milímetros (mm) e realizado através de medidas de comprimento corporal nos segmentos definidos como eixos entre as flexuras cefálica, cervical e caudal (Figura 9). Para permitir uma avaliação da morfogênese embrionária, a proporção entre as regiões anterior e posterior do embrião foi determinada como mostrado na Figura 9. Os eixos de comprimento entre as flexuras cefálica e cervical (CCV) e as flexuras cervical e caudal (CCC), foram relacionados por meio da razão do comprimento cefálico (mm) pelo comprimento truncal (mm) (CCV/CVC). Por fim, foi determinada a razão entre o comprimento da região cefálica (mm) em relação ao comprimento total do embrião (mm) (CCV/CCV+CVC).

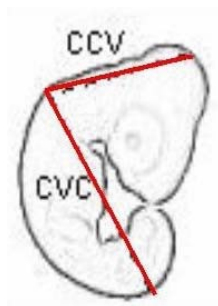


Figura 9. Medidas céfalo cervical (CCV) e cervical caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie *G. domesticus*. Fonte: Dias et al. (2005).

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada por Tukey-Kramer, e o teste de Barlett quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaios biológicos in vitro

4.1.1. Avaliação da atividade citotóxica

4.1.1.1. Citotoxicidade pela redução do MTT

A avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações de extratos e frações de *C. sylvestris* permitiu verificar que, com exceção da fração metanólica, todos os extratos analisados promoveram um significativo efeito citotóxico nas células do carcinoma de Ehrlich (Figura 10; Tabela 2).

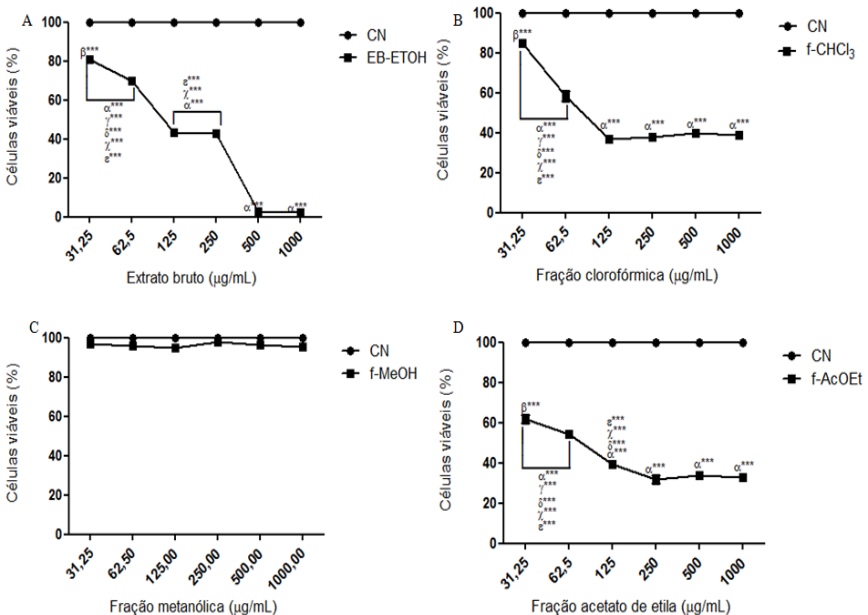


Figura 10. Efeito dose -dependente (A) do extrato bruto (EB-ETOH), (B) fração clorofórmica (f-CHCl₃), (C) fração metanólica (f-MeOH) e (D) fração acetato de etila (f-AcOEt) (32,5 – 1000 µg/mL) de *C. sylvestris* sobre a viabilidade celular no carcinoma de Ehrlich após 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao controle negativo; (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento na

concentração de 62,5µg/mL; (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento na concentração de 125µg/mL; (δ) representa diferença estatística em relação ao tratamento na concentração de 250µg/mL; (χ) representa diferença estatística em relação ao tratamento na concentração de 500 µg/mL e (ε) representa diferença estatística em relação ao tratamento na concentração de 1000 µg/mL.

A partir desses dados, foram calculadas as CI_{50} de cada extrato, os quais estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de CI_{50} e respectivos desvio-padrão derivados do efeito citotóxico do extrato bruto e frações clorofórmica, metanólica e acetato de etila de *C. sylvestris* (32,5 – 1000 µg/mL), sob células do carcinoma de Ehrlich cultivadas *in vitro*.

Extratos	CI_{50} (µg/mL)
Extrato Bruto	175,9 ± 3,0
Fração Clorofórmica	92,0 ± 2,1
Fração Metanólica	> 1000
Fração Acetato de Etila	93,5 ± 5,2

Os valores da concentração inibitória (CI_{50}) foram determinados por regressão linear.

Partindo dos valores de CI_{50} apresentados pelos extratos de *C. sylvestris*, pode-se observar que a fração clorofórmica e acetato de etila apresentaram maior efeito citotóxico, seguido do extrato bruto (Tabela 2). Entretanto, o tratamento com o extrato bruto nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, foi o único capaz de reduzir a viabilidade celular para 2,9 e 2,3% respectivamente, enquanto que o tratamento com fração clorofórmica e acetato de etila nessas concentrações, foi capaz de reduzir a viabilidade celular para aproximadamente 40 e 30%, respectivamente (Figura 10). Como descrito anteriormente, a fração metanólica não promoveu efeito citotóxico nas concentrações testadas.

Posteriormente, para avaliar se o efeito citotóxico promovido pelo tratamento com os extratos e frações de *C. sylvestris* é tempo-dependente, células do carcinoma de Ehrlich foram tratadas com extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila nas concentrações de 175,9; 92,0 e 93,5 µg/mL, respectivamente, pelo período de 12, 18 e 24 horas, e posteriormente, avaliada a redução do MTT a formazan a 540nm.

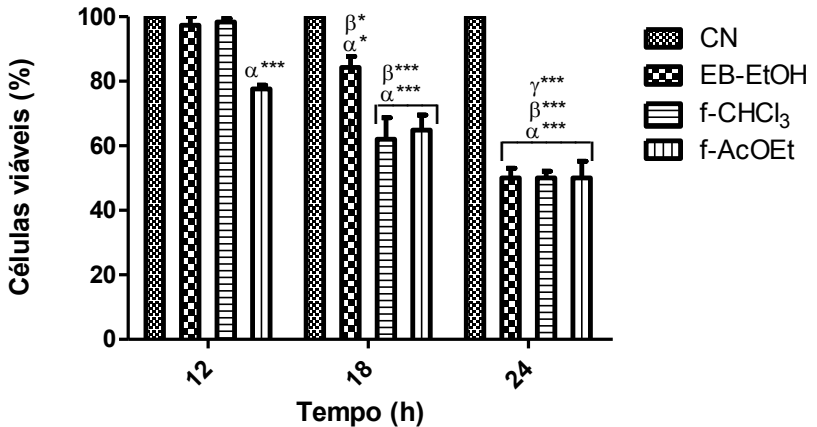


Figura 11. Efeito tempo-dependente do extrato bruto (EB-ETOH-175,9 µg/mL), fração clorofórmica (f-CHCl₃-92,0 µg/mL) e acetato de etila (f-AcOEt-93,5 µg/mL) de *C. sylvestris* sobre a viabilidade celular no carcinoma de Ehrlich após 12, 18 e 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) e (*) representam diferença estatística significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (CN); (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento com o respectivo extrato no período de 12 h ; (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento com o respectivo extrato no período de 18 h.

Como pode-se observar, todos os extratos analisados promoveram seu efeito citotóxico de maneira tempo-dependente, visto que a viabilidade celular reduziu de acordo com o aumento do tempo de exposição das células aos extratos analisados (Figura 11). Tanto o extrato bruto quanto a fração clorofórmica começam a apresentar efeito citotóxico após 18 horas de exposição. Já a fração acetato de etila apresentou efeito significativo nas primeiras 12 horas de exposição.

4.1.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

4.1.2.1 Ensaio de incorporação da timidina

Para investigar o efeito do tratamento com o extrato bruto e frações de *C. sylvestris* sobre a proliferação celular foi utilizado o ensaio de incorporação da timidina triциada. Nestes experimentos, a incubação

de células do carcinoma de Ehrlich com EB-ETOH (175,9 $\mu\text{g/mL}$), f- CHCl_3 (92,0 $\mu\text{g/mL}$) e f-AcOEt (93,5 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas, reduziu significativamente a incorporação da timidina e a taxa de proliferação celular em 61, 84 e 58%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo (veículo) (Figura 12).

Como pode-se observar, o extrato mais efetivo nesse parâmetro trata-se da fração clorofórmica, seguida do extrato bruto e fração acetato de etila (não houve diferença estatística entre esses tratamentos) (Figura 12).

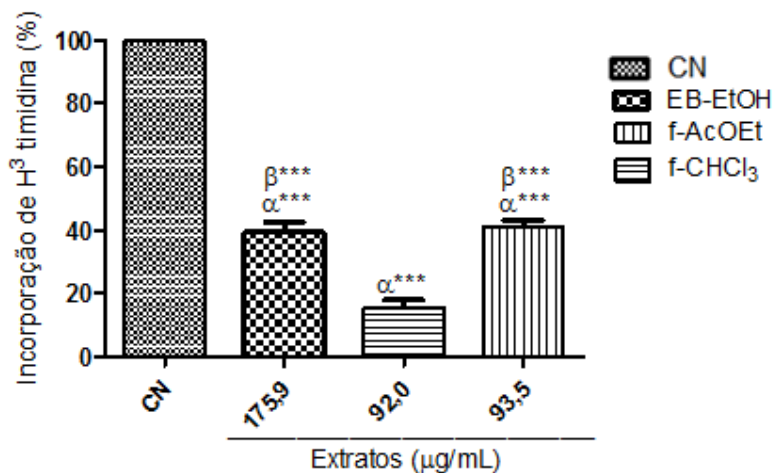


Figura 12. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH- 175,9 $\mu\text{g/mL}$), fração clorofórmica (f- CHCl_3 - 92,0 $\mu\text{g/mL}$) e acetato de etila (f-AcOEt-93,5 $\mu\text{g/mL}$) de *C. sylvestris* sobre a proliferação celular no carcinoma de Ehrlich após 24 horas de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao controle negativo (CN); (β) representa diferença estatística em relação a fração clorofórmica.

4.1.3. Avaliação da atividade nucleásica

4.1.3.1. Avaliação de dano no DNA plasmidial

Nas figuras 13, 14 e 15 estão representados os efeitos do extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila de *C. sylvestris* sobre o DNA plasmidial, respectivamente.

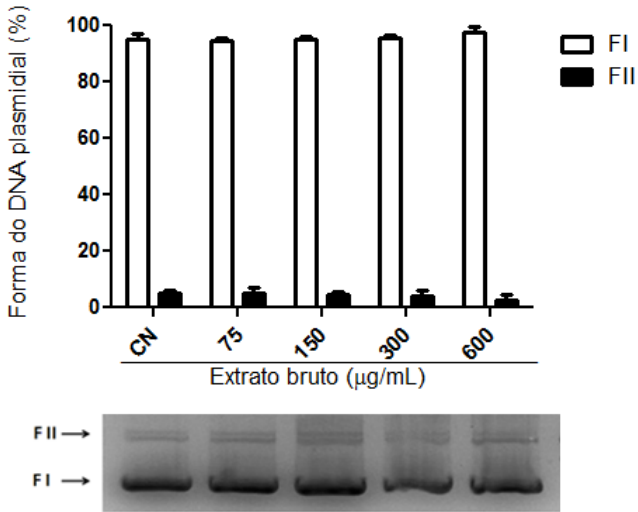


Figura 13. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH) de *C. sylvestris* (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos.

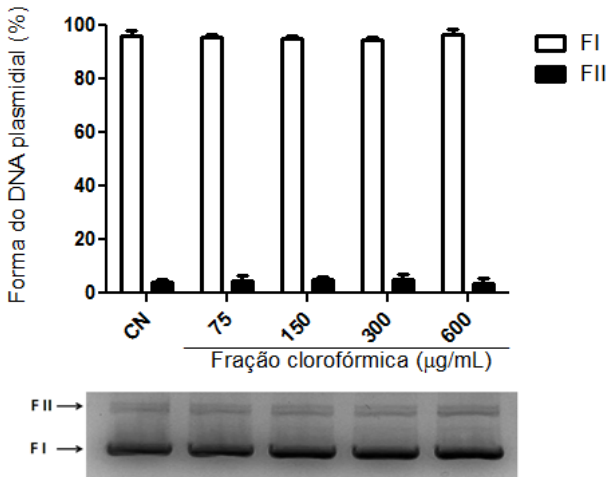


Figura 14. Efeito da fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C. Os experimentos foram realizados em

triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos.

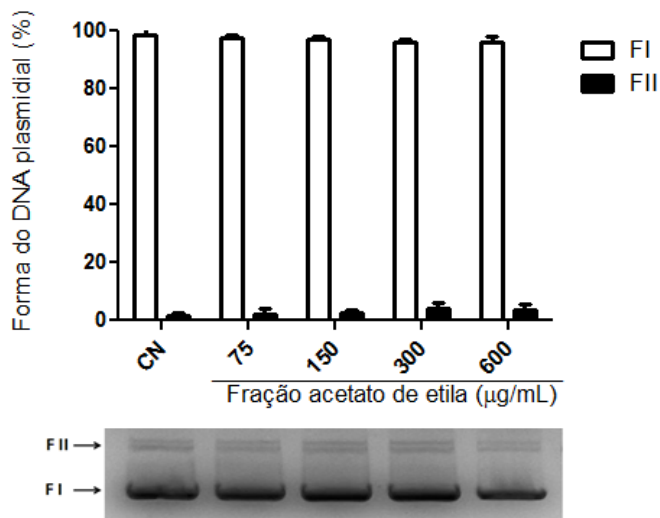


Figura 15. Efeito da fração acetato de etila (f-AcOEt) de *C. sylvestris* (75-600µg/mL) sobre o DNA plasmidial após 16 horas de incubação a 50°C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos.

Os testes para avaliação da atividade nucleásica revelaram que o extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila de *C. sylvestris*, nas concentrações de 75, 150, 300 e 600µg/mL, respectivamente, não apresentaram efeito genotóxico, a partir do momento que não foram capazes de promover dano e quebra do DNA plasmidial, não alterando desta forma, seu perfil eletroforético normal, que se refere à conformação superenovelada (FI).

Os testes realizados para verificar o potencial protetor dos extratos de *C. sylvestris* perante um ataque oxidativo ao DNA plasmidial, revelaram que todos os extratos, em todas as concentrações testadas, foram capazes de proteger contra o dano e a quebra induzidos pela solução de Fe-EDTA (20µM) (Figuras 16, 17 e 18).

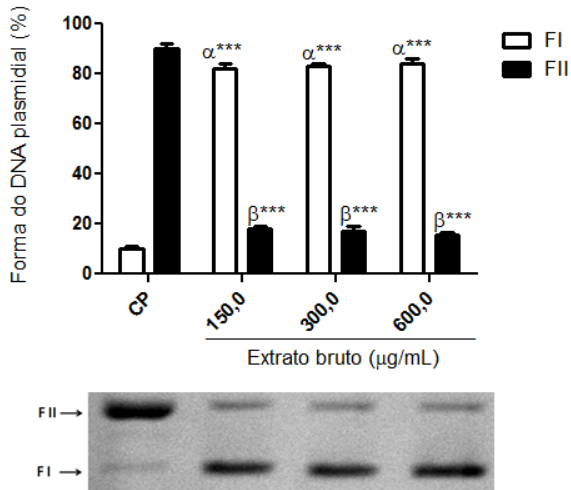


Figura 16. Efeito protetor do extrato bruto (EB-ETOH) de *C. sylvestris* (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. CP= grupo controle positivo tratado com o veículo de diluição dos extratos e uma solução constituída por Fe-EDTA (20µM). (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$). (α) e (β) representam diferença estatística em relação ao controle positivo.

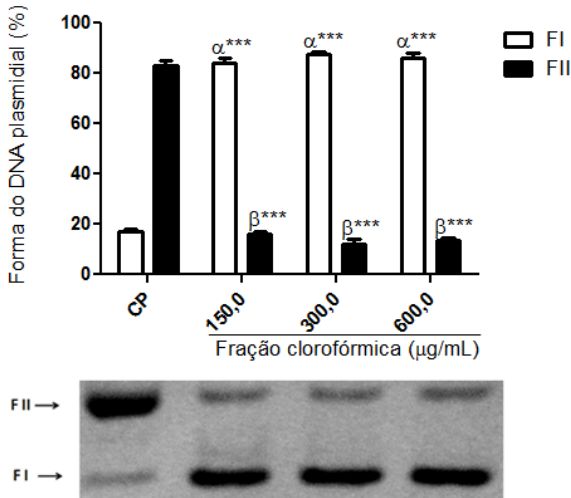


Figura 17. Efeito protetor da fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. CP= grupo controle positivo tratado com o veículo de diluição dos extratos e uma solução constituída por Fe-EDTA (20µM). (***) representa diferença significativa (p < 0,001). (α) e (β) representam diferença estatística em relação ao controle positivo.

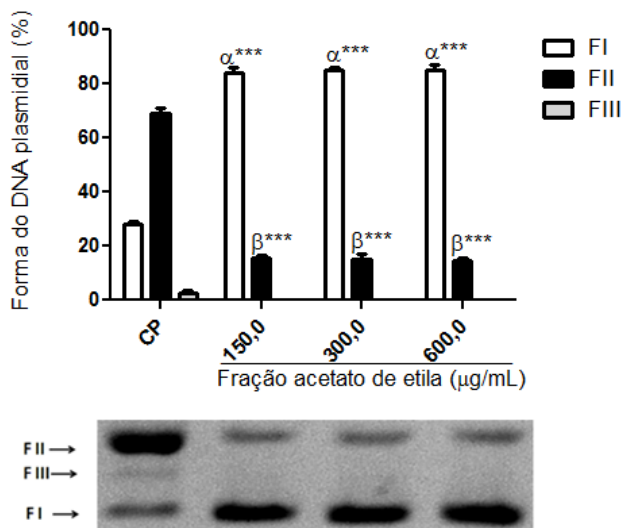


Figura 18. Efeito protetor da fração acetato de etila (f-AcOEt) de *C. sylvestris* (150-600µg/mL) sobre o ataque oxidativo promovido por espécies reativas do oxigênio ao DNA plasmidial. Os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. CP= grupo controle positivo tratado com o veículo de diluição dos extratos e uma solução constituída por Fe-EDTA (20µM). (***) representa diferença significativa (p < 0,001). (α) e (β) representam diferença estatística em relação ao controle positivo.

Os extratos-teste de *C. sylvestris* (extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila), respectivamente, nas concentrações de 150, 300 e 600µg/mL, foram capazes de proteger o DNA do ataque oxidativo promovido pelo agente indutor de dano (solução de Fe-EDTA), uma vez que aproximadamente 80% das moléculas de DNA presentes no sistema de incubação, apresentaram após a corrida eletroforética, conformação FI (Figuras 17, 18, 19).

4.1.4. Avaliação da atividade pró-apoptótica

4.1.4.1. Coloração Diferencial por Brometo de etídio/ Laranja de Acrinidina

Um dos métodos aplicados para avaliar o padrão de morte celular induzido pelos extratos e frações de *C. sylvestris* foi realizado através da coloração diferencial com BE/LA, e posterior análise por microscopia de fluorescência. A Figura 19 ilustra os dados obtidos com os tratamentos das células do carcinoma de Ehrlich com extrato bruto (175,9µg/mL), fração clorofórmica (92 µg/mL), fração acetato de etila (93,5 µg/mL) e controle negativo (DMSO 1%). Células com coloração típica de apoptose (alaranjadas), foram observadas em maior número, no tratamento com os respectivos extratos, enquanto que células viáveis (caracterizadas pela coloração verde brilhante) foram encontradas com maior frequência no controle negativo.

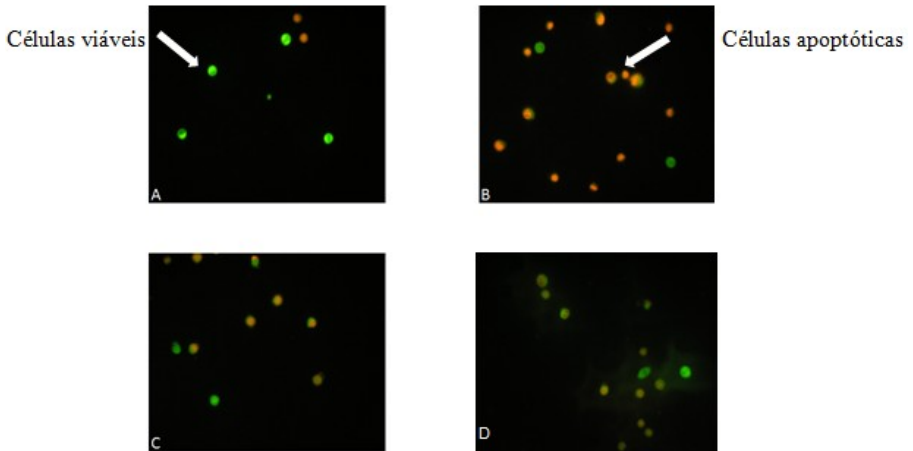


Figura 19. Morfologia de células do carcinoma de Ehrlich coradas com uma mistura de Brometo de Etídeo/ Laranja de Acrinidina e visualizadas por microscopia de fluorescência, após 24 horas de incubação com extrato bruto (B), fração clorofórmica (C) e acetato de etila (D) de *C. sylvestris*. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos. Aumento=400X.

Após 24 horas de incubação de células do carcinoma de Ehrlich com os extratos de *C. sylvestris*, ocorreu uma redução do número de células viáveis, havendo quase total ausência das mesmas (Figura 13). Essa redução foi acompanhada pelo aumento de células apoptóticas

(EB-ETOH=91,5 f-CHCl₃=90,5; f-AcOEt =94%). Curiosamente, em nenhum dos tratamentos, inclusive com DMSO 1% (veículo de diluição dos extratos), observou-se a presença de células necróticas.

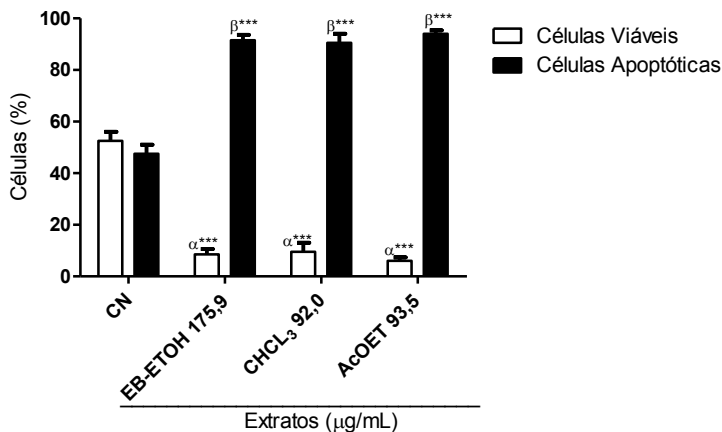


Figura 20. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com extrato bruto (EB-ETOH- 175,9 µg/mL), fração clorofórmica (f-CHCl₃- 92 µg/mL) e acetato de etila (f-AcOEt-93,5µg/mL) de *C. sylvestris* pelo período de 24 horas. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (***) representa diferença significativa (p < 0,001). (α) e (β) representam diferença estatística em relação ao controle negativo (CN).

4.2. Ensaios biológicos in vivo

4.2.1. Avaliação da atividade antitumoral

4.2.1.1. Modelo ascítico do tumor de Ehrlich (TAE)

Na tabela 3 estão apresentados os valores dos parâmetros cronomorfofisiológicos avaliados (variação de peso, circunferência abdominal, tempo médio de sobrevivência e percentual de longevidade), após o tratamento dos animais com extrato bruto e frações da *C. sylvestris*, doxorrubicina e solução aquosa de DMSO a 10% (veículo de diluição dos extratos- controle negativo).

Como pode-se observar, todos os tratamentos reduziram significativamente a variação da circunferência abdominal e o peso corporal dos animais. Além disso, os tratamentos com extrato bruto,

fração clorofórmica e acetato de etila foram capazes de elevar o tempo médio de sobrevida em relação ao grupo controle negativo (Tabela 3). Tal aumento na sobrevida promovido pela administração desses extratos, elevou conseqüentemente, o percentual de longevidade. Nesse parâmetro, o extrato que mostrou ser mais eficaz, trata-se do extrato bruto, que elevou o percentual de sobrevida para 48%, seguido da fração clorofórmica e acetato de etila, que promoveram um aumento de 39% e 17% nesse parâmetro, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH), fração clorofórmica (f-CHCl₃) e fração acetato de etila (f-AcOEt) (150mg/kg) de *C. sylvestris*, sobre parâmetros cronomorfofisiológicos (variação de peso, variação de circunferência abdominal, tempo médio de sobrevida, percentual de longevidade) de camundongos previamente inoculados com TAE.

Grupo	Varição da Circunferência Abdominal (cm)	Varição do Peso Corporal (g)	Tempo Médio de Sobrevida (dias)	Percentual de Longevidade (%)
Controle Normal	0,3 ± 0,1 ^{α***}	3,3 ± 0,9 ^{α***}	30,0 ^{α***}	100,0 ^{α***}
Controle Negativo	3,4 ± 0,4	10,2 ± 1,1	11,5	0
Doxo	0,3 ± 0,1 ^{α***}	2,2 ± 0,8 ^{α***}	30,0 ^{α***}	100,0 ^{α***}
EB-ETOH	1,4 ± 0,3 ^{α**}	7,7 ± 0,3 ^{α**}	17,0 ^{α***}	48,0 ^{α***}
f-CHCl ₃	2,0 ± 0,4 ^{α*}	7,2 ± 0,1 ^{α**}	16,0 ^{α***}	39,0 ^{α***}
f-AcOEt	2,0 ± 0,6 ^{α*}	7,9 ± 0,3 ^{α**}	13,5 ^{α***}	17,0 ^{α***}

Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6. (***), (**) e (*) representam diferença significativa (p<0,001), (p<0,01) e (p<0,05), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao controle negativo. Doxo= grupo controle positivo tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg).

Na tabela 4 estão apresentados os valores dos parâmetros histocitológicos avaliados (proporção de células inviáveis/células viáveis, volume de líquido ascítico e de células compactadas) após o tratamento dos animais com extrato bruto e frações da *C. sylvestris*, doxorubicina e solução aquosa de DMSO a 10% (veículo de diluição dos extratos- controle negativo).

Com exceção da fração acetato de etila, todos os tratamentos conseguiram elevar de maneira significativa a proporção de células

inviáveis/células viáveis e reduzir o volume de líquido ascítico e de células compactadas, evidenciando um efeito citotóxico *in vivo* sobre as células do carcinoma de Ehrlich (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do extrato bruto (EB-ETOH), fração clorofórmica (f-CHCl₃) e fração acetato de etila (f-AcOEt) (150mg/kg) de *C. sylvestris* sobre parâmetros histocitológicos (proporção de células inviáveis/viáveis, volume de líquido ascítico e de células compactadas) de camundongos previamente inoculados com TAE.

Grupo	Proporção de células inviáveis/células viáveis	Volume de Líquido Ascítico (mL)	Volume de Células Compactadas (mL)
Controle Normal	-----	-----	-----
Controle Negativo	0,01±0,001	10,4 ± 0,5	3,4 ± 0,5
Doxo	-----	-----	-----
EB-ETOH	0,028±0,002 ^{a***}	5,8 ± 0,1 ^{a***}	2,2 ± 0,3 ^{a***}
f-CHCl ₃	0,037±0,002 ^{a***}	5,5 ± 0,4 ^{a***}	1,8 ± 0,2 ^{a***}
f-AcOEt	0,01±0,001	9,1 ± 0,8	3,0 ± 0,4

Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6. (***) representa diferença significativa (p<0,001). (a) representa diferença estatística em relação ao controle negativo. Doxo= grupo controle positivo tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg).

Levando-se em consideração os resultados observados nas tabelas 3 e 4, conclui-se que os extratos mais efetivos *in vivo*, sob o modelo da forma líquida do carcinoma de Ehrlich, foram o extrato bruto seguido da fração clorofórmica de *C. sylvestris*. Assim, para avaliar se a atividade antitumoral desses extratos é concentração-dependente, adotou-se o mesmo modelo experimental utilizado anteriormente, sendo os animais tratados com três concentrações diferentes (37,5, 75 e 150 mg/mL) de extrato bruto e fração clorofórmica da referida planta.

Tabela 5. Efeito dose dependente do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f-CHCl₃) (150, 75 e 62,5mg/kg) de *C. sylvestris* sobre parâmetros cronomorfofisiológicos (variação de peso, variação de circunferência abdominal, tempo médio de sobrevida, percentual de longevidade) de camundongos previamente inoculados com TAE.

Grupo	Varição da Circunferência Abdominal (cm)	Varição do Peso Corporal (g)	Tempo Médio de Sobrevida (dias)	Percentual de Longevidade (%)
Controle Normal	0,3±0,2 ^{α***}	1,1±1,0 ^{α***}	30,0 ^{α***}	100,0 ^{α***}
Controle Negativo	3,1±0,4	10,5±1,1	11,5	0
Doxo	0,3 ± 0,1 ^{α***}	2,2 ± 0,8 ^{α***}	30,0 ^{α***}	100,0 ^{α***}
EB-ETOH 150	1,5±0,3 ^{α***}	7,8±0,4 ^{α*}	18,0 ^{α***}	56,5 ^{α***}
EB-ETOH 75	1,5±0,2 ^{α***}	7,3±1,2 ^{α*}	16,0 ^{α*** β*}	39,1 ^{α*** β*}
EB-ETOH 37,5	2,8±0,1 ^{β*** γ***}	8,5±1,0 ^{β*** γ***}	11,0 ^{β*** γ***}	0 ^{β*** γ***}
f-CHCl ₃ 150	1,3±0,3 ^{α***}	7,3±0,75 ^{α*}	17,0 ^{α***}	47,8 ^{α***}
f-CHCl ₃ 75	1,9±0,1 ^{α*** β*}	7,5±1,0 ^{α*}	16 ^{α*** β*}	39,1 ^{α*** β*}
f-CHCl ₃ 37,5	3,1±0,2 ^{β*** γ***}	8,8±1,1 ^{β*** γ***}	11 ^{β*** γ***}	0 ^{β*** γ***}

Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6. (***) e (*), representam diferença significativa de (p<0,001) e (p<0,05), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 150 mg/Kg e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 75 mg/Kg. Doxo= grupo controle positivo tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg).

Na tabela 5 estão apresentados os valores dos parâmetros cronomorfofisiológicos avaliados (variação de peso, circunferência abdominal, tempo médio de sobrevida e percentual de longevidade) após o tratamento dos animais com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* nas concentrações de 37,5, 75 e 150 mg/mL, além dos

resultados apresentados pelos animais tratados com doxorrubicina e solução aquosa de DMSO a 10%.

O tratamento com extrato bruto nas concentrações de 150 e 75mg/kg, reduziu significativamente a variação da circunferência abdominal e o peso corporal dos animais tratados. Além disso, a administração de extrato bruto nessas concentrações foi capaz de promover a elevação do tempo médio de sobrevivência e, conseqüentemente, do percentual de longevidade. O tratamento com extrato bruto na concentração de 37,5mg/kg não foi efetivo, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (Tabela 5).

O tratamento com fração clorofórmica apresentou um perfil semelhante ao apresentado pelo extrato bruto, uma vez que a administração de fração clorofórmica nas concentrações de 75 e 150mg/kg foi capaz de promover uma redução significativa na variação da circunferência abdominal e peso corporal dos animais tratados, além de ter elevado o tempo médio de sobrevivência e percentual de longevidade. Já a administração de fração clorofórmica na concentração de 37,5 mg/kg não promoveu uma alteração significativa nos parâmetros avaliados, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle negativo e dessa forma, não exercendo efeito (Tabela 5).

O efeito citotóxico *in vivo* do extrato bruto e fração clorofórmica sobre as células do carcinoma de Ehrlich pode ser observado com o tratamento nas concentrações de 75 e 150mg/kg. Além disso, a administração desses extratos nessas concentrações foi capaz de promover uma redução significativa do volume de líquido ascítico. Novamente, o tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica na concentração de 37,5 mg/kg não foi efetivo em relação aos parâmetros histocitológicos, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito dose dependente do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f-CHCl₃) (150, 75 e 62,5mg/kg) de *C. sylvestris* sobre parâmetros histocitológicos (proporção de células inviáveis/viáveis, volume de líquido ascítico e de células compactadas) de camundongos previamente inoculados com TAE.

Grupo	Proporção de células inviáveis/células viáveis	Volume de Líquido Ascítico (mL)	Volume de Células Compactadas (mL)
Controle Normal	-----	----	----
Controle Negativo	0,009±0,001	10,4±0,8	3,2±0,7
Doxo	-----	-----	-----
EB-ETOH 150	0,030±0,002 ^{a***}	5,6±0,6 ^{a**}	1,3±0,3 ^{a***}
EB-ETOH 75	0,020±0,002 ^{a*** β*}	5,3±1,2 ^{a**}	1,8±0,3 ^{a***}
EB-ETOH 37,5	0,009±0,001 ^{β*** γ***}	10,8±1,3 ^{β*** γ***}	2,6±0,6 ^{β*** γ***}
f-CHCl₃ 150	0,040±0,001 ^{a***}	5,9±1,2 ^{a**}	1,7±0,2 ^{a***}
f-CHCl₃ 75	0,015±0,001 ^{a*** β***}	5,2±1,2 ^{a**}	1,2±0,3 ^{a***}
f-CHCl₃ 37,5	0,008±0,002 ^{β*** γ***}	10,5±1,5 ^{β*** γ***}	2,2±0,7 ^{β*** γ***}

Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=6. (***) e (**), representam diferença significativa de (p<0,001) e (p<0,01), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 150 mg/Kg e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 75 mg/Kg. Doxo= grupo controle positivo tratado com doxorrubicina (1,2 mg/kg).

4.2.1.1.1. Avaliação da fragmentação do DNA pelo teste do cometa

Com o intuito de observar se o extrato bruto e a fração clorofórmica de *C. sylvestris* são capazes de promover a fragmentação do DNA de células do TAE, realizou-se o teste cometa no líquido ascítico de animais previamente tratados com esses extratos, nas concentrações de 37,5; 75 e 150mg/kg.

Em relação ao tratamento realizado com extrato bruto (Figura 21), pode-se observar que a administração desse extrato nas concentrações de 75 e 150mg/kg, foi genotóxico, uma vez que tais tratamentos apresentaram um índice de dano ao DNA de 214,5 e 213, respectivamente. Já o tratamento com extrato bruto na concentração de 37,5 mg/kg apresentou um índice de dano ao DNA de 68, não promovendo a fragmentação do DNA e não apresentando diferença estatística em relação ao controle negativo. Cabe ressaltar que o índice de dano ao DNA apresentado pelo controle negativo (65,5) e tratamento com extrato bruto na concentração de 37,5 mg/kg, representam a taxa normal de turnover das células do carcinoma de Ehrlich.

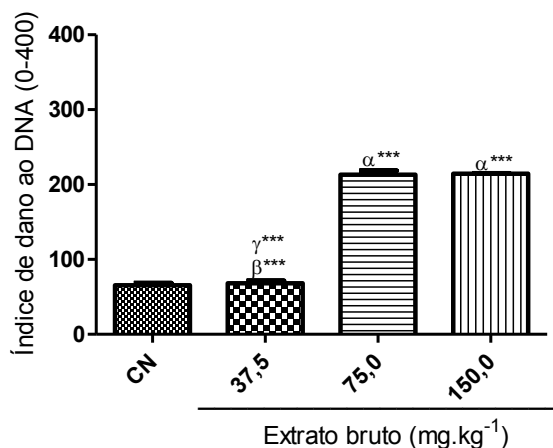


Figura 21. Dano ao DNA no líquido ascítico de camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com extrato bruto (37,5-150mg/kg) de *C. sylvestris*. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa diferença estatística em

relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 150 mg/Kg e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 75 mg/Kg. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (DMSO 10%).

Novamente, o perfil de índice de dano ao DNA apresentado pelo tratamento com fração clorofórmica, foi muito semelhante ao apresentado pelo extrato bruto, uma vez que a administração desse extrato nas concentrações de 75 e 150mg/kg, levou a uma fragmentação significativa do DNA (200 e 206 respectivamente), enquanto que o tratamento com a concentração de 37,5 mg/kg não foi genotóxico, apresentando um índice de dano ao DNA (88) muito semelhante ao apresentado pelo controle negativo (Figura 22).

A análise das tabelas 5 e 6 e das figuras 21 e 22 permitem observar que o efeito antitumoral do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* é dose-dependente, considerando que a concentração mais eficaz foi a concentração de 150 mg/kg, seguida da concentração de 75mg/kg e da concentração de 37,5mg/kg, a qual não apresentou mais efeito.

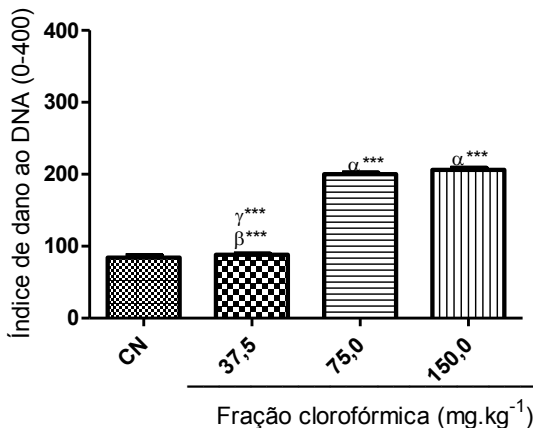


Figura 22. Dano ao DNA no líquido ascítico de camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com fração clorofórmica (37,5-150mg/kg) de *C. sylvestris*. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 150 mg/Kg e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na

concentração de 75 mg/Kg.CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (DMSO 10%).

4.2.2. Avaliação da atividade antiangiogênica

4.2.2.1. Ensaio da membrana corioanlatóica (CAM)

Com o objetivo de se verificar se a atividade antitumoral apresentada pelo extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* está relacionada à capacidade desses extratos em inibir a formação de vasos sanguíneos pelas células tumorais, avaliou-se a atividade dos mesmos pelo ensaio da CAM.

O tratamento dos embriões com o extrato bruto e a fração clorofórmica nas concentrações de 3,25, 7,5 e 15 $\mu\text{g}/\text{disco}$ foram capazes de reduzir significativamente, o percentual de vasos em 54,5; 61,4 e 71% e 42,1; 59,1 e 70,9% respectivamente, em relação ao CN. Já o tratamento com ácido retinóico (AR), foi o mais eficaz, sendo capaz de promover uma redução de 85,7% no número de vasos, quando comparado ao grupo CN (Figuras 23, 24 e 25). Esses resultados indicam que o extrato bruto e a fração clorofórmica de *C. sylvestris* exercem efeito antiangiogênico de maneira dose-dependente.

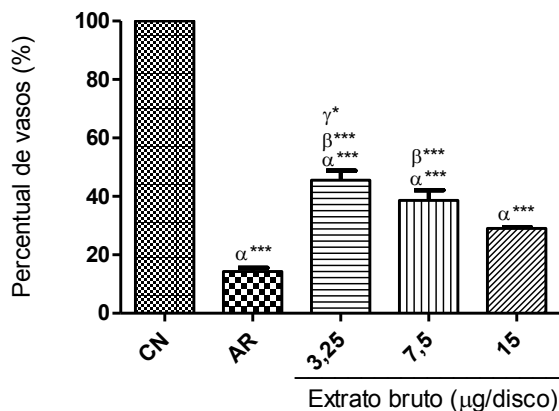


Figura 23. Efeito dose-dependente do extrato bruto (3,25; 7,5; 15 $\mu\text{g}/\text{disco}$) de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana corioalantóide de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (***) e (*) representam diferença significativa ($p < 0,001$) e ($p < 0,05$), respectivamente. (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa

diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{disco}$ e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 7,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (etanol P.A); AR= grupo controle positivo tratado com ácido retinóico (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$).

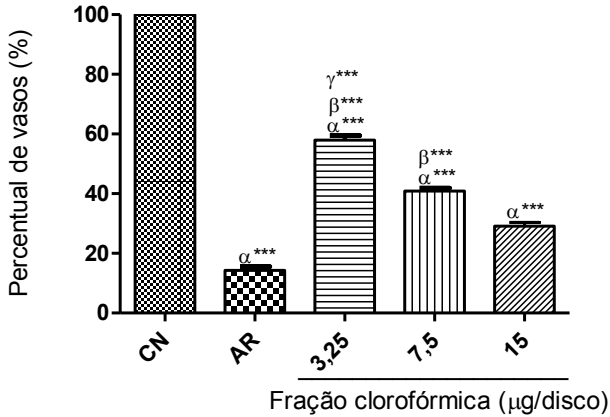


Figura 24. Efeito dose-dependente da fração clorofórmica (3,25; 7,5; 15 $\mu\text{g}/\text{disco}$) de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana corioalantóide de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (***) representa diferença significativa ($p < 0,001$). (α) representa diferença estatística em relação ao grupo controle negativo; (β) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{disco}$ e (γ) representa diferença estatística em relação ao tratamento realizado com o respectivo extrato na concentração de 7,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (etanol P.A); AR= grupo controle positivo tratado com ácido retinóico (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$).

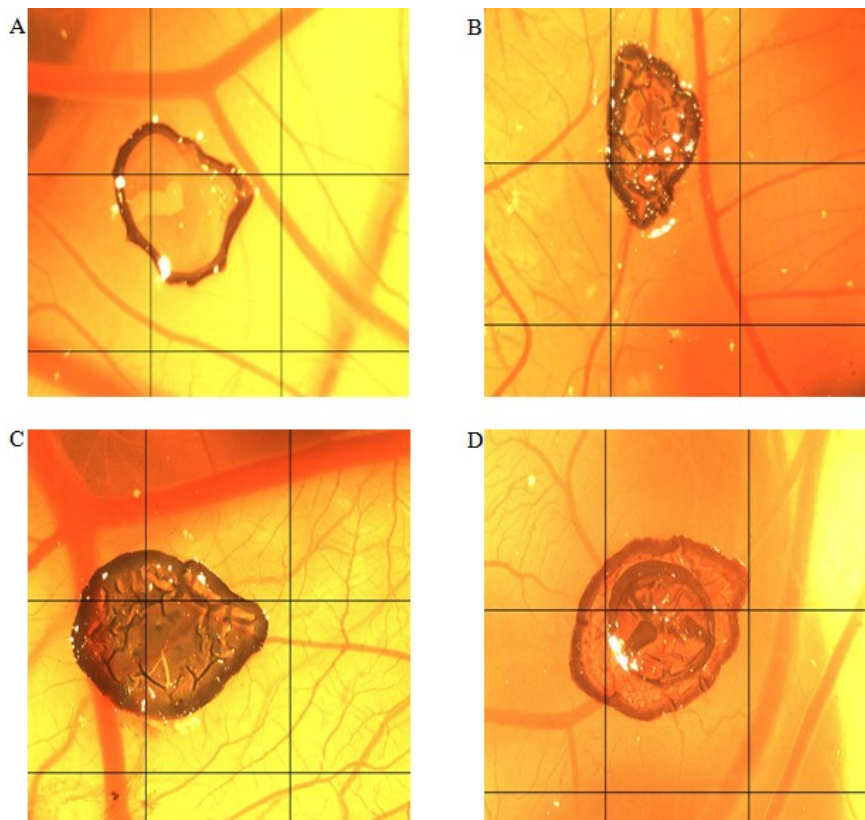


Figura 25. Efeito inibitório do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* sobre a vascularização da membrana cório-alantóica de embriões, no 8º dia de desenvolvimento. A) Controle positivo, tratado com ácido retinóico (1µg/disco). B) Fração clorofórmica de *C. sylvestris* (15µg/disco). C) Controle negativo, tratado com etanol. D) Extrato bruto de *C. sylvestris* (15µg/disco).

Com o objetivo de avaliar a possível influência do efeito antiangiogênico do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* na morfogênese e no crescimento embrionário, foram obtidas as medidas de comprimento cefálico-cervical-caudal (total) dos embriões, assim como as razões CCV/CVC e CCV/CCV+ CVC, após os oito dias de desenvolvimento. Analisando-se as Figuras 26 e 27, observa-se que extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* não exerceram modificações significativas sobre a morfogênese e o crescimento corporal dos embriões, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo.

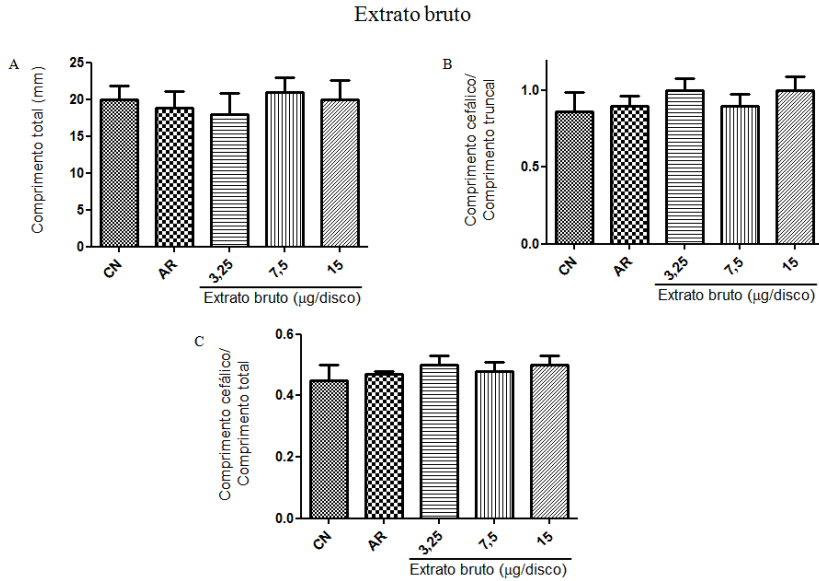


Figura 26. Efeito do extrato bruto na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A) Comprimento total do embrião (CCV+CVC). B) Razão do comprimento cefálico pelo comprimento truncal (CCV/CVC). C) Razão do Comprimento cefálico pelo comprimento total do embrião (CCV/CCV+CVC). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (etanol P.A); AR= grupo controle positivo tratado com ácido retinóico (1µg/disco).

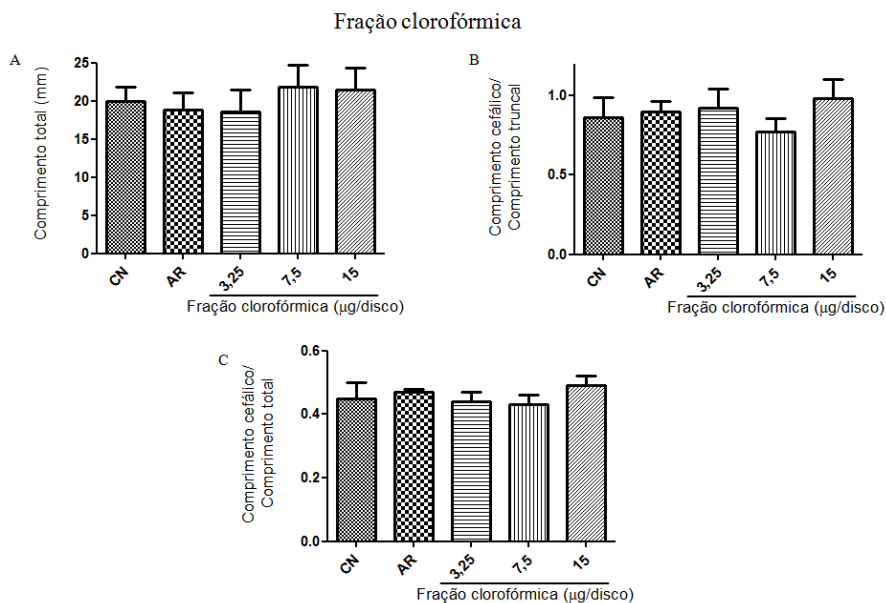


Figura 27. Efeito da fração clorofórmica na morfogênese de embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A) Comprimento total do embrião (CCV+CVC). B) Razão do comprimento cefálico pelo comprimento cervical (CCV/CVC). C) Razão do Comprimento cefálico pelo comprimento total do embrião (CCV/CCV+CVC). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. CN= grupo controle negativo tratado apenas com o veículo de diluição dos extratos (etanol P.A); AR= grupo controle positivo tratado com ácido retinóico (1µg/disco).

5. DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer consiste em uma doença que causa temor na sociedade, devido à sua alta incidência e índice de mortalidade. Nos países desenvolvidos, estima-se que uma em cada três pessoas que desenvolve a doença, faleça em decorrência da mesma. Mesmo em casos de diagnóstico precoce, a expectativa de vida pode ser bastante curta (KAMB, 2005; FERREIRA, 2006b).

Embora já existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhuma das abordagens terapêuticas atuais foi capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta patologia, ou mesmo reduzir significativamente sua toxicidade, efeitos adversos e a multiresistência à quimioterapia (MDR). Por outro lado, as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos nos processos tumorais, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Assim, a seleção de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento baseada na alegação de um dado efeito terapêutico, pode constituir em um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos mais efetivos, menos tóxicos e/ou com novos mecanismos de ação.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar informações sobre o potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico, antitumoral e antiangiogênico do extrato bruto etanólico e frações de *C. sylvestris* utilizando modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Normalmente, a utilidade de um determinado composto ou mistura de compostos dos quais se suspeita possuir atividade antitumoral, é julgada primeiramente através de ensaios para a avaliação da citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*. O interesse concentra-se em avaliar a capacidade destes compostos em inibir o crescimento e/ou induzir a morte das células tumorais *in vitro*. No caso de *C. sylvestris*, existem alguns relatos na literatura científica acerca de seu efeito citotóxico sobre microorganismos, protozoários e diversas linhagens celulares (OBERLIES et al., 2002; MAISTRO, CARVALHO, MANTOVANI, 2004; MESQUITA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; DA SILVA et al., 2008b; DE MESQUITA, 2009).

Diante do evidente potencial citotóxico apresentado pela *C. sylvestris* e do fato de que células de mamíferos em cultura são ferramentas utilizadas para avaliar a citotoxicidade de novos compostos antitumorais (PAILARD et al., 1999; FERREIRA, 2006b), o presente trabalho avaliou, inicialmente, a atividade citotóxica do extrato bruto

etanólico e frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica de *C. sylvestris* sobre células do carcinoma de Ehrlich, através da realização do ensaio do MTT.

Segundo Suffines e Pezzuto (1990), somente os extratos com valor de $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ podem ser considerados ativos. Essa preconização foi considerada e, nesse sentido, as frações clorofórmica e acetato de etila foram reveladas como as mais ativas nesse estudo, seguida do extrato bruto e da fração metanólica, a qual não demonstrou efeito citotóxico (Tabela 3). Esses resultados corroboram estudos realizados por Mesquita e colaboradores (2009), que observaram o efeito citotóxico de extratos obtidos da casca, frutos e folhas, da planta sobre diversas linhagens tumorais humanas (SF 295, HCT-8, MDA-MB 435, HL-60). Além disso, a observação das Figuras 10 e 11 permite observar que a atividade citotóxica promovida por esses extratos é concentração e tempo-dependente.

A atividade citotóxica apresentada pelos extratos de *C. sylvestris*, pode estar diretamente relacionada à presença de alguns compostos citotóxicos nas folhas da planta. A grande maioria dos compostos isolados das folhas de *Casearia* sp. é representada por clerodanos, um novo grupo de diterpenóides com atividade biológica. Há um aumento constante do número de clerodanos diterpenos descobertos graças a ensaios de fracionamento bioguiado, mostrando que muitos deles, especialmente os ricos em moléculas de oxigênio, possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas, de repelência de insetos e citotóxica (OBERLIES et al., 2002; HUANG et al., 2004; FERREIRA, 2006b). Diterpenos clerodânicos isolados dos frutos e casca de *Casearia grewifolia*; da raiz, folhas e galhos de *Casearia membranacea* e dos galhos de *Casearia oblíqua* mostraram-se citotóxicos sobre diversas linhagens tumorais humanas (KB, HL-60, HCT-8, MDA/MB-435, SF-295, BC1, NC1-H187, Daoy, MED, HeLa, PC-3, DLD1) (SHEN et al., 2004; SHEN et al., 2005; KANOKMEDHAKUL, BUAYAIRAKSA, 2005; KANOKMEDHAKUL, BUAYAIRAKSA, 2007; CHEN et al., 2008; VIEIRA JR et al., 2009). Em relação aos diterpenos clerodânicos (casearinas) isolados das folhas de *C. sylvestris*, estudos têm demonstrado que os mesmos apresentam efeito citotóxico sobre diversos microorganismos e linhagens celulares transformadas (LX-1, HCT, 116, A 2780; HL-60) (DE CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al. 1999, OBERLIES, 2002; FERREIRA, 2006b;).

Outros compostos de atividade citotóxica comprovada que foram identificados no óleo essencial das folhas da planta, consistem em

sesquiterpenos (β -cariofileno e δ -humuleno), que mostraram citotoxicidade perante células A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, Bel-7402 e CT-26 (LEGAULT et al., 2003; SYLVESTRE et al., 2005; HOU et al., 2006; SYLVESTRE et al., 2006;). Estudos realizados por Tundis e colaboradores (2009), mostraram que o β -cariofileno e δ -humuleno isolados de *Senecio stibianus Lacaita* (Asteraceae), apresentaram-se citotóxicos para as linhagens C32 e LNCaP. Já Da Silva, Figueiredo e Yano (2007), observaram a citotoxicidade do β -cariofileno isolado do óleo volátil das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* sobre células do carcinoma de Ehrlich. Embora atualmente não exista nenhum estudo acerca da atividade citotóxica dos sesquiterpenos isolados do óleo de *C. sylvestris*, Da Silva e colaboradores (2008b), comprovaram a atividade citotóxica do óleo da planta perante diversas linhagens de células tumorais, como células A-549, HeLa e HT-29, dados estes, que corroboram diretamente os resultados obtidos no presente trabalho.

Cabe ressaltar que ambos os sesquiterpenos identificados na planta possuem atividade antiinflamatória (FERNANDES et al., 2007). Dados da literatura indicam que o uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) de maneira contínua, reduz o risco de ocorrência de câncer de cólon em torno de 40–50%, e pode ser preventivo contra os cânceres de pulmão, esôfago e estômago (BARON, SANDLER, 2000; GARCIA-RODRIGUEZ, HUERTA-ALVAREZ, 2001; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). Já o tratamento com inibidores seletivos da COX-2 reduz a formação de tumores intestinais, esofágicos, de mama, pele e bexiga em animais (KAWAMORI et al., 1998; JACOBY et al., 2002; SUBBARAMAIAH, DANNENBERG, 2003; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). A ação quimiopreventiva dos antiinflamatórios poderia ocorrer através da inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX 1 e COX2), onde os mesmos estariam reduzindo o metabolismo do ácido araquidônico e, conseqüentemente, a liberação de fatores de crescimento e agentes causadores de dano ao microambiente inflamatório, reduzindo, desta forma, a proliferação celular neste local e a ocorrência de possíveis mutações que, em conjunto, poderiam facilitar o desenvolvimento da carcinogênese (COUSSENS, WERB, 2002, DVORAK, 1986; SIQUEIRA JUNIOR, 2007). Além disso, tem sido proposto que esses fármacos exercem efeito quimiopreventivo e antitumoral ao induzirem a apoptose através da liberação do citocromo C mitocondrial, ao promoverem interferências na progressão do ciclo celular e ao apresentarem efeito antiangiogênico, visto que a COX-2 regula a expressão de proteínas pró e antiapoptóticas, proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, e

fatores de crescimento e citocinas que regulam a angiogênese (DEMPKE, et al, 2001; BRIGATI et al., 2002; SIQUEIRA JUNIOR, 2007).

Dados da literatura têm demonstrado o efeito citotóxico do ácido gálico em diversas linhagens tumorais humanas (DU 145, 22Rv1) e animais (PC-12) (KAUR et al., 2009; KANG et al., 2009). Recentemente, Da Silva e colaboradores (2009), isolaram das folhas de *C. sylvestris* dois derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) os quais mostraram atividade citotóxica sobre células do carcinoma de Ehrlich.

A análise destes dados permite sugerir então, que a atividade citotóxica apresentada pelos extratos de *C. sylvestris* testados neste estudo, deve-se à presença de diterpenos clerodânicos, derivados do ácido gálico (MGDE e IGDE) e sesquiterpenos (β -cariofileno e δ -humuleno), nas folhas da planta. Sugere-se ainda, que os sesquiterpenos presentes no óleo essencial da planta, podem estar exercendo efeito citotóxico através da inibição da COX, da indução da apoptose, através da liberação do citocromo C mitocondrial ou do bloqueio do ciclo celular.

Apesar da avaliação da atividade citotóxica pelo método do MTT ser uma etapa imprescindível e eficaz na procura de novos agentes quimioterápicos, a realização desse método não permite definir o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade apresentada por um determinado composto (BERRIDGE et al., 2006; FERREIRA, 2006b).

Com o intuito de se verificar se o efeito citotóxico promovido pelo extrato bruto e frações clorofórmica e acetato de etila de *C. sylvestris* sobre células do carcinoma de Ehrlich estaria relacionado à capacidade antiproliferativa desses extratos, realizou-se o ensaio da incorporação da H^3 - timidina, utilizando-se concentrações correspondentes aos respectivos CI_{50} de 24 horas de incubação.

A timidina é um nucleosídeo do ácido desoxirribonucléico (DNA) formado pela base nitrogenada timina ligada a uma pentose (desoxirribose), através da ligação β -N-glicosídica (TENG *et al.*, 2006). Como a replicação do DNA depende da síntese e disponibilidade de timidina, a utilização de timidina radioativa (H^3 -timidina), permite monitorar o DNA genômico. Desta forma, a mensuração de H^3 -timidina incorporada ao DNA, tem sido amplamente usada como marcador de proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2001).

No presente estudo, o extrato que exibiu maior efeito antiproliferativo, foi a fração clorofórmica, seguido do extrato bruto e fração acetato de etila, sendo que estes dois últimos tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 12). Esses resultados

corroboram os dados obtidos no ensaio do MTT, onde o efeito citotóxico apresentado por esses extratos pode estar diretamente associado ao seu efeito antiproliferativo. Além disso, esses resultados sugerem que o tratamento com os extratos de *C. sylvestris* promove alterações no ciclo celular normal das células do carcinoma de Ehrlich, inibindo a síntese de DNA e, conseqüentemente, a divisão celular. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados, no intuito de elucidar a(s) fase(s) do ciclo celular e a(s) proteína(s) afetada(s) pelo tratamento com os extratos de *C. sylvestris*.

O efeito antiproliferativo de diterpenos clerodânicos, sesquiterpenos e agentes polifenólicos têm sido amplamente investigado. Huang e colaboradores (2004), observaram o efeito antiproliferativo de 6 caseamembrinas (diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia membranaceae*), em células PC-3, que são células de câncer de próstata humano. Em relação ao potencial antiproliferativo apresentado por sesquiterpenos, estudos mostraram que o α -humuleno inibe a proliferação de células A-549, DLD-1 e LNCaP (LEGAULT et al., 2003; LOIZZO et al., 2007), e que o β -cariofileno, exerce efeito antiproliferativo sobre células K562 (LAMPRONTI et al., 2006). Por fim, o ácido gálico vem sendo frequentemente avaliado quanto à sua atividade antiproliferativa. Dados da literatura têm demonstrado o efeito antiproliferativo deste composto e seus derivados sobre diversas linhagens celulares transformadas (HeLa, MDA-MB-231, L-132, MOLT-3) e modelos de neoplasia *in vivo* desenvolvidos em cobaias (hepatocarcinoma de rato induzido pela dietilnitrosamina) (GOMES et al., 2003; JAGAN et al., 2008).

Evidências sugerem que a promoção do efeito antiproliferativo dos polifenóis seja mediado pela inibição das topoisomerasas e fosfatidilinositol-3 quinase ou pela paralisação do ciclo celular em determinada fase, o que ocorre em conseqüência da interação desses compostos com proteínas envolvidas na progressão do ciclo (LEPLEY et al., 1996; AGULLO et al., 1997; SKAPER et al., 1997). Em estudo realizado por Hwang e colaboradores (2008), foi comprovado que um dos mecanismos pelos quais o ácido gálico exerce efeito antiproliferativo consiste na inibição da atividade da UDP-glicose desidrogenase, limitando a disponibilidade de UDP- ácido glucurônico e, conseqüentemente, a produção excessiva de proteoglicanos associados com a proliferação de células tumorais. Já Chen e colaboradores (2009), observaram que o ácido gálico isolado das folhas de *Toosa sinensis*, exerce efeito antiproliferativo sobre células DU 145 ao bloquear o ciclo

celular na fase G₂, através da ativação de ChK1 e ChK2 e da inibição de Cdc25C Cdc 2.

Como comentado anteriormente, estudos fitoquímicos realizados nas folhas de *C. sylvestris* revelaram a presença de dois derivados do ácido gálico (IGDE, MGDE) e diterpenos clerodânicos nas folhas da planta (MORITA et al., 1991; DA SILVA, CHAAR, YANO, 2009). Já análises realizadas no óleo volátil de *C. sylvestris*, revelaram a presença de biciclogermacreno e sesquiterpenos (α -humuleno e β -cariofileno) (ESTEVES et al., 2005). Desta forma, sugere-se que o efeito antiproliferativo do extrato bruto e frações clorofórmica e acetato de etila de *C. sylvestris* sobre as células do carcinoma de Ehrlich, esteja diretamente associado à presença de compostos de comprovada atividade citotóxica (diterpenos clerodânicos, MGDE, IGDE, α -humuleno, β -cariofileno) nas folhas da planta.

Diversos agentes quimioterápicos exercem seu efeito citotóxico e antiproliferativo ao inibir a síntese de DNA. Esses fármacos exercem sua ação ao inibir a síntese de desoxirribonucleosídeos e purinas, ao inibir a atividade das topoisomerases, ou ao se intercalar (alquilar) ao DNA, impedindo sua replicação (RICHARDSON, 2000). A doxorubicina e a cisplatina, dois antineoplásicos alquilantes, vem sendo extensivamente usados na clínica (CRAGG; NEWMAN, 1999). A doxorubicina atua intercalando seus anéis planares entre os pares de bases nucleotídicas do DNA, o que inibe a replicação nucleotídica e pode desencadear a quebra do DNA pela topoisomerase II, originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA. A atividade antineoplásica da doxorubicina também parece estar envolvida nas reações de oxidação/redução, com a produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos. Há indícios ainda de que esse fármaco afeta o ciclo celular, sendo ativo inclusive na interfase, além de promover alterações celulares características de apoptose (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; CHING YU et al., 2005). Já a cisplatina, ao penetrar na célula, deve ser ativada para promover sua ação. Tal ativação ocorre pela hidrólise dos íons cloreto existentes em sua estrutura, promovendo a formação de um complexo reativo que interage com o DNA. Essa interação resulta em ligações cruzadas intrafilamentosas (provavelmente entre N7 e O6 de moléculas adjacentes de guanina) com conseqüente torção e desnaturação local da cadeia de DNA (RANG et al., 2004; ROY et al., 2009). O amplo emprego terapêutico da cisplatina pode ser justificado pelo fato desse fármaco promover a completa remissão do tumor em pacientes com câncer testicular avançado, além de apresentar

efeito terapêutico significativo nos cânceres de ovário, útero, bexiga, cabeça/pescoço (RANG; DALE; RITTER, 1999; BOYLES et al., 2001).

Com intuito de investigar se a atividade citotóxica e antiproliferativa promovida pelos extratos de *C. sylvestris* envolviam a sua intercalação ao DNA, realizou-se o teste de dano ao DNA plasmidial. Entretanto, neste estudo, observou-se que nenhum dos extratos, em nenhuma das concentrações testadas, foi capaz de promover uma alteração no perfil eletroforético normal do DNA, caracterizado pela conformação FI (Figuras 13, 14 e 15). Diante dos resultados obtidos, pode-se supor que o efeito citotóxico e antiproliferativo promovido por esses extratos não é mediado por uma interação e dano direto ao DNA, como é o caso dos agentes alquilantes.

Como descrito anteriormente, Da Silva e colaboradores (2009), identificaram e isolaram dois derivados do ácido gálico (IGDE, MGDE) nas folhas da planta. É bem estabelecido na literatura que o ácido gálico e alguns de seus derivados, quando administrados em baixas concentrações, possuem efeito pró-oxidante, sendo capazes de promover um ataque oxidativo às bases nitrogenadas do DNA, levando à formação de adutos e a fragmentação do mesmo (YOSHINO et al., 2002). Cabe ressaltar que grande parte dos agentes antineoplásicos utilizados na clínica, atuam produzindo EROs, os quais podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, desencadeando morte celular por apoptose das células malignas (ALLEN, TRESINI, 2000; NAKAGAWA et al., 2002; TSANG et al., 2003).

Para avaliar se as atividades citotóxica e antiproliferativa promovida pelo extrato bruto e frações de *C. sylvestris* ocorre mediante o ataque oxidativo ao DNA, realizou-se novamente, o teste de dano ao DNA plasmidial. Para tal avaliação, incubou-se conjuntamente, DNA plasmidial, solução de Fe-EDTA (geradora de peróxido de hidrogênio e EROs) e extratos de *C. sylvestris*. Como foi possível observar (Figuras 16, 17 e 18) os três extratos, em todas as concentrações testadas, foram capazes de proteger o DNA plasmidial do ataque oxidativo, uma vez que a maioria das moléculas de DNA presentes no sistema de incubação apresentaram um perfil eletroforético de migração correspondente à conformação FI, que refere-se à conformação superhelicoidal e normal do DNA. Este resultado mostra que os extratos de *C. sylvestris* atuam protegendo o DNA das células do ataque oxidativo induzido por EROs. Sugere-se que, provavelmente, o IGDE e MGDE presentes nos extratos testados estejam exercendo efeito antioxidante (uma atividade também apresentada pelo ácido gálico, quando administrado em doses maiores),

ou não sejam capazes de causar um efeito pró-oxidante, independente da concentração em que se encontram.

Apesar do tratamento do câncer através da aplicação de radio e quimioterapia, levar à morte das células neoplásicas primeiramente através da indução de apoptose, este não é o único tipo de morte celular eficientemente capaz de destruir células malignas (IGNEY, KRAMMER, 2002; MASQUELIER et al., 2004). A necrose, embora seja um mecanismo inespecífico, é tão eficaz quanto a apoptose na terapia do câncer, uma vez que favorece a ativação do sistema imune contra o tumor (MASQUELIER et al., 2004).

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, ou seja, que envolve a ocorrência de mecanismos de transdução de sinal e síntese de proteínas específicas, e atua na eliminação de células indesejáveis e danificadas, especialmente quando a lesão afeta o DNA (KIECHLE, ZANG, 1998; ISRAELS, ISRAELS, 1999; KUMAR *et al.*, 2005). Como mencionado anteriormente, morfológicamente a apoptose é caracterizada pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e empacotamento dos restos citoplasmáticos na forma de corpos apoptóticos, sem a ocorrência de danos à membrana plasmática e processo inflamatório (STRASSER, O'CONNOR, DIXIT, 2000). Já a necrose, ocorre geralmente em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo para o meio extracelular. Desta forma, a necrose envolve a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até mesmo a morte de células vizinhas; ou seja, nesta condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e, devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN, DONOVAN, COTTER, 2002).

Com o intuito de se determinar qual mecanismo de morte celular (necrose ou apoptose), estaria relacionada à atividade citotóxica e antiproliferativa apresentada pelos extratos de *C. sylvestris*, foram investigadas alterações morfológicas induzidas pelo tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila da planta, através da coloração das mesmas com uma mistura constituída por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA).

O método de coloração por BE/LA permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose, tendo como base a revelação de alterações morfológicas nucleares e

citoplasmáticas através da fluorescência (McGAHON *et al.*, 1995; FERREIRA, 2006b).

A laranja de acridina (LA), por ser capaz de atravessar membranas intactas, intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular. Já o brometo de etídio, não é capaz de atravessar membranas intactas, e dessa forma, é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA. Assim, células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente (ou muitas vezes não marca) o núcleo dessas células, pois não atravessa membranas intactas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Como o final do processo apoptótico é caracterizado morfológicamente pela formação dos corpos apoptóticos, o que leva a pequenas alterações da membrana celular, células que estão em apoptose tardia, apresentam coloração alaranjada devido a algum dano de membrana que permite a entrada de pequena quantidade de BE. Já as células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso (McGAHON *et al.*, 1995; FERREIRA, 2006b).

As avaliações morfológicas realizadas com BE/LA revelaram a presença escassa de células viáveis no tratamento com os extratos de *C. sylvestris* (Figura 19 B-D; Figura 20). A grande maioria das células submetidas ao tratamento com extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila apresentaram um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada (característico de apoptose tardia) e sem a formação de corpos apoptóticos (Figura 19 A-D). Possivelmente isso deve-se ao fato de que as membranas plasmáticas permanecem intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios, onde ocorrem pequenas alterações na membrana, tornando-se permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMAR *et al.*, 2005; FERREIRA, 2006b). Em relação à quantificação do tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com os extratos de *C. sylvestris*, o tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila, aumentou em até 48; 47 e 49 %, o percentual de células apoptóticas em relação ao CN (Figura 20).

Uma enorme quantidade de dados suporta a existência do papel do estresse oxidativo no desencadeamento de apoptose, onde a ocorrência desse fenômeno pode ser observada através da geração de baixos níveis de EROs, o qual é inibido pela adição de agentes

antioxidantes como a N-acetil-cisteína (NAC) (LENNON et al., 1991; MCGOWAN et al., 1996). Adicionalmente, tem sido reportada a geração de EROS na apoptose mediada por TNF e FAS (WOLFE et al., 1994; SUZUKI et al., 1998), bem como no tratamento com agentes quimioterápicos (ZAMZAMI et al., 1995; GORMAN et al., 1997). Neste estudo, a realização do ensaio do dano ao DNA plasmidial na bateria de testes onde utilizou-se uma solução de Fe-EDTA como fonte geradora de EROS, possibilitou observar que a apoptose induzida pelo tratamento com extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila de *C. sylvestris*, não é mediada pela produção direta de EROS e estresse oxidativo no núcleo, uma vez que a incubação do DNA com esses extratos e substância indutora de dano, promoveu a proteção do DNA plasmidial e não a intensificação do dano (Figuras 16, 17 e 18).

Como comentado anteriormente, classicamente a apoptose é desencadeada pela ocorrência de duas vias: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca envolve alterações na permeabilidade mitocondrial e conseqüente extravasamento de proteínas mitocondriais, como o citocromo C, o qual, após associar-se com proteínas adaptadoras, culmina na formação do apoptossomo, ativação das caspases 9 e 3, e morte celular. O controle dessa via é realizado pela expressão e ativação de membros pró e anti-apoptóticos pertencentes à família Bcl-2. Já a via extrínseca caracteriza-se pela ativação de receptores de morte, os quais uma vez ativados associam-se a proteínas adaptadoras, levando à formação do DISC e conseqüente ativação das caspases 8 e 3 (IGNEY, KRAMMER, 2002).

O efeito pró-apoptótico de diterpenos clerodânicos têm sido relatado na literatura. Um estudo realizado por Huang e colaboradores (2004), revelou que o efeito citotóxico e antiproliferativo apresentado pela caseamembrina C, um diterpeno clerodânico isolado das folhas de *Casearia membranaceae*, é mediado pela ativação da via intrínseca da apoptose, através da diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-xL, aumento da expressão de Mcl-1S e ativação das caspases 9 e 3.

A atividade pró-apoptótica induzida pelo ácido gálico, pode estar associada à ativação, tanto da via intrínseca, quanto da via extrínseca da apoptose. Kang e colaboradores (2009) observaram que o ácido gálico promove a apoptose de células PC12 ao diminuir a expressão de Bcl-2, via fosforilação de JNK (*c-Jun N-terminal protein kinase*). Já estudos realizados por Hsu e Yen (2007) em células 3T3-L1, revelaram que o ácido gálico promove a apoptose destas células ao

e elevar a expressão de FASR, FASL e p53, e ao induzir a ativação de caspase 9 e 3.

A atividade pró-apoptótica de sesquiterpenos vem sendo amplamente estudada. Em um estudo realizado por Darmanin e colaboradores (2009), foi comprovada a atividade pró-apoptótica do β -cariofileno isolado das folhas de *Ricinus communis*, sobre células de melanoma humano (SK-MEL-28). Dados da literatura revelaram que a atividade pró-apoptótica relacionada aos sesquiterpenos deve-se à ativação da via extrínseca, onde esses compostos atuam promovendo um aumento da expressão do receptor TRAIL e seu respectivo ligante (ISHIBASHI, OHTSUKI, 2008). A ativação da apoptose via TRAIL/receptor TRAIL tem sido considerado um alvo terapêutico promissor para o tratamento do câncer, visto que a apoptose mediada pela ativação dessa via, é específica e acomete diversas linhagens tumorais, não sendo ativada em células normais (CHEN, 2001; SINGH, 2003). Por fim, cabe ressaltar que os sesquiterpenos identificados no óleo volátil das folhas de *C. sylvestris* apresentam atividade antiinflamatória comprovada. Tem sido reportado na literatura que a dexametasona e o sulfido sulindaco (um fármaco pertencente à classe dos AINEs), exercem efeito pró-apoptótico ao induzirem a expressão de DR5, um subtipo de receptor TRAIL. Já o ácido salicílico exerce efeito pró-apoptótico ao diminuir a expressão de proteínas de sobrevivência, estando essa atividade vinculada à sua ligação e inativação do fator de transcrição E2F-1, presente na região promotora de sobrevivência (YOO, LEE, 2007).

Dessa forma, o efeito pró-apoptótico exercido pelo extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila de *C. sylvestris* pode estar diretamente associado à presença de compostos com atividade citotóxica e antiproliferativa (diterpenos clerodânicos, derivados do ácido gálico, e sesquiterpenos) nas folhas da planta. Entretanto, há a necessidade de se desenvolver estudos mais aprofundados no intuito de se elucidar o(s) mecanismo(s) pelo qual (is) esses extratos exercem tal efeito, uma vez que a planta apresenta diversos compostos com efeito pró-apoptótico, que atuam ativando, tanto a via intrínseca quanto via extrínseca da apoptose.

A etapa *in vitro* dos estudos de citotoxicidade, proliferação celular, atividade nucleásica e pró-apoptótica, indicou que três extratos de *C. sylvestris* (EB-ETOH, f-AcOEt e f-CHCl₃) foram efetivos. Sendo a *C. sylvestris* uma planta popularmente utilizada para tratar tumores, e dando continuidade aos ensaios de avaliação, os efeitos do extrato bruto,

frações clorofórmica e acetato de etila, foram também avaliados *in vivo*. Para essa avaliação, utilizou-se o modelo experimental da forma ascítica do carcinoma de Ehrlich.

Modelos experimentais como os de câncer espontâneo em animais, oferecem oportunidades de estudo que auxiliam na compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de ação de compostos, com perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (HANSEN, KHANNA, 2004). Nesse aspecto, o TAE é uma ferramenta que está sendo amplamente utilizada em nossos estudos.

O TAE é um carcinoma que foi desenvolvido para a forma ascítica por Loewenthal e Jahn em 1932, de uma das várias linhagens do carcinoma de Ehrlich que surge de tumores epiteliais espontâneos, provavelmente originados de glândulas mamárias (GUPTA et al., 2004). Ele cresce rapidamente, apresenta um comportamento muito agressivo e tem sido amplamente citado na literatura para investigar propriedades antitumorais de vários novos agentes terapêuticos (RAJESHKUMAR et al., 2002; AJITH, JANARDHANAN, 2003; KANENO et al., 2004; MELO et al., 2004).

Nos camundongos inoculados, o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) causou um rápido desenvolvimento de ascite tumoral. Esta ascite causou no animal portador um aumento exagerado de seu peso e de sua circunferência abdominal. O líquido ascítico é a fonte nutricional direta para as células do tumor e a observação de um aumento rápido deste líquido acompanhado pelo crescimento do tumor (volume de células) pode ser usada como uma ferramenta para avaliar a requisição nutricional das células tumorais (PRASAD; GIRI, 1994).

No experimento inicial, onde os animais foram tratados com extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila na concentração de 150 mg/kg, a administração dos mesmos reduziu a circunferência abdominal e o peso corporal dos animais, resultados esses que estão diretamente relacionados à diminuição do volume de líquido ascítico observada com os respectivos tratamentos (Tabelas 3 e 4). Além disso, os tratamentos efetuados com o extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* foram capazes de aumentar a proporção de células inviáveis/células viáveis em torno de 50%, o que evidencia seu efeito citotóxico *in vivo*. Apesar da fração acetato de etila ter apresentado efeito citotóxico significativo *in vitro* ($CI_{50} = 93,5 \pm 5,2$), tal efeito não pode ser observado *in vivo*, uma vez que camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com fração acetato de

etila (150 mg/kg), não apresentaram um aumento significativo na proporção de células inviáveis/células viáveis em relação ao CN. Sugere-se que a ausência do efeito citotóxico mediado pela fração acetato de etila *in vivo*, seja decorrente da dificuldade de solubilização e absorção pelas células tumorais dos compostos citotóxicos presentes no extrato, bem como da biotransformação e inativação dos mesmos. Entretanto, estudos mais aprofundados de biodisponibilidade, devem ser realizados com o intuito de se elucidar a biodistribuição e atividade dos metabólitos provenientes do processo de biotransformação do referido extrato.

Em relação ao volume de células compactadas, nenhum dos tratamentos foi eficaz a ponto de apresentar diferença estatística em relação ao controle negativo, porém observa-se claramente a tendência na redução desse parâmetro, que poderia ser melhor observada com a administração de uma concentração maior de extratos e/ou prolongação do tratamento (Tabela 4). Esse resultado pode estar diretamente associado à ocorrência de um processo inflamatório característico do modelo experimental adotado, onde o grande volume de células compactadas pode ser decorrente da presença de células do sistema imune no líquido ascítico.

Um dos critérios de confiança mais aceitos pela comunidade científica para julgar o valor de qualquer agente antitumoral é o aumento do tempo de sobrevida dos animais (CLARKSON, BURCHENAL, 1965). Neste estudo, a administração de extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila de *C. sylvestris* aumentaram a sobrevida dos animais, como foi demonstrado pelo aumento do percentual de longevidade (PAL). Neste parâmetro, o tratamento com extrato bruto causou a maior elevação no PAL (cerca de 48%), seguido pelo tratamento com fração clorofórmica (PAL~26%) e fração acetato de etila (PAL ~ 17%) (Tabela 3). O aumento do tempo médio de sobrevida e percentual de longevidade observado no tratamento dos animais com os extratos de *C. sylvestris*, está diretamente relacionado à redução do volume de líquido ascítico, circunferência abdominal e peso corporal dos animais, bem como ao aumento da proporção de células inviáveis/células viáveis, induzidos pelos respectivos tratamentos. Por fim, pode-se sugerir que a melhora dos parâmetros cronomorfofisiológicos e histocitológicos observada após o tratamento dos animais com o extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila de *C. sylvestris*, são reflexo da atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica apresentadas

pelos referidos extratos sobre células do carcinoma de Ehrlich cultivadas *in vitro*.

Os resultados obtidos nesse estudo, concordam com outros dados encontrados na literatura, onde camundongos previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com derivados do ácido gálico (IGDE, MGDE) isolados das folhas de *C. sylvestris*, apresentaram um aumento significativo do tempo de sobrevida, quando comparados ao grupo controle negativo (DA SILVA et al., 2009). Já Da Silva, Figueiredo e Yano (2007), observaram que animais previamente inoculados com TAE e posteriormente tratados com α humuleno e β -cariofileno isolados do óleo volátil das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium*, apresentaram um aumento significativo do tempo de sobrevida em relação ao grupo controle negativo. Dessa forma, pode-se sugerir fortemente, que a atividade antitumoral *in vivo* apresentada pelo extrato e frações de *C. sylvestris*, está diretamente relacionada à presença de compostos com atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica (diterpenos clerodânicos, derivados do ácido gálico e sesquiterpenos) nas folhas da planta.

Em relação aos ensaios para a avaliação do efeito dose-dependente promovido pelos extratos de *C. sylvestris*, a administração de extrato bruto e fração clorofórmica nas concentrações de 75 e 150 mg/kg promoveu um aumento da proporção de células inviáveis/células viáveis em torno de 50; 66,7; 33,34; 75%, respectivamente, o que indica o efeito citotóxico dos extratos *in vivo* nas concentrações testadas (Tabela 6). Além disso, o tratamento com esses extratos, nas concentrações indicadas atuou reduzindo o volume de líquido ascítico e, conseqüentemente, o peso e circunferência abdominal dos animais tratados (Tabelas 5 e 6). Outra conseqüência da redução do volume de líquido ascítico nutricional observada nesses tratamentos, refere-se ao aumento no tempo médio de sobrevida dos animais e percentual de longevidade, onde o extrato bruto e fração clorofórmica nas concentrações de 75 e 150 mg/kg, promoveram um aumento no percentual de longevidade de 39,1; 56,5; 39,1 e 47,8%, respectivamente (Tabela 5).

Os tratamentos com extrato bruto e fração clorofórmica na concentração de 37,5 mg/kg não foram efetivos em relação aos parâmetros histocitológicos e cronomorfofisiológicos avaliados, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (Tabelas 5 e 6). Dessa forma, a análise dos resultados obtidos com os tratamentos com extrato bruto e fração clorofórmica nas

concentrações de 37,5, 75 e 150 mg/kg permite observar que o efeito antitumoral promovido por esses extratos é dose-dependente, sendo mais eficaz, quanto maior a concentração administrada.

Uma vez que um dos eventos característicos da morte celular por apoptose refere-se à fragmentação do DNA (STRASSER, O'CONNOR, DIXIT, 2000), considerou-se importante avaliar o potencial genotóxico induzido pelo tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica nas concentrações de 37,5, 75 e 150 mg/kg sobre células do TAE, através da realização do ensaio do cometa.

O ensaio do cometa é um método atraente por sua simplicidade, versatilidade, rapidez e economia na determinação do grau de danos às moléculas de ácido desoxirribonucléico de células eucarióticas, como quebras de fita dupla e simples e alquilações (COLLINS, 2004b). Esse ensaio tem sido utilizado para diversas finalidades: como teste padrão para avaliar a segurança de novos fármacos (HARTMANN et al., 2003), no biomonitoramento ambiental (DIXON et al., 2002), como ferramenta básica em estudos de reparo de DNA, na avaliação de danos ocupacionais a compostos químicos, radiação, substâncias oxidantes presentes nos alimentos e na associação de estresse oxidativo com várias doenças (COLLINS, 2004b).

Em relação a este parâmetro, o tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica nas concentrações de 75 e 150 mg/kg, foram capazes de elevar o índice de dano ao DNA em torno de 69; 70; 67 e 68%, respectivamente, indicando que a administração desses extratos, nessas concentrações, foi capaz de causar uma fragmentação efetiva do DNA, levando à morte celular (Figuras 21 e 22). Esses resultados coincidem diretamente com a redução do volume de líquido ascítico, da circunferência abdominal e do peso corporal dos animais, bem como ao aumento da proporção de células inviáveis/células viáveis e do percentual de longevidade observados nesses tratamentos. Além disso, esses resultados confirmam diretamente os dados obtidos *in vitro*, sendo então a fragmentação do DNA observada no tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica nas concentrações de 75 e 150 mg/kg, conseqüência da atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica exercida por esses extratos em células do carcinoma de Ehrlich cultivadas *in vitro*.

Apesar da realização do ensaio do dano ao DNA plasmidial não ter evidenciado a fragmentação do DNA induzida pelo tratamento *in vitro* com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris*, os resultados obtidos neste ensaio, não invalidam as evidências de

fragmentação do DNA observada pela realização do teste do cometa, uma vez que a fragmentação do DNA observada através da realização do ensaio do dano ao DNA plasmidial, estaria diretamente associada à interação e dano direto ao DNA, como é o caso de agentes alquilantes. Provavelmente, a fragmentação do DNA mediada pelo tratamento dos animais com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris*, seria induzida pela interação e /ou modulação da expressão de elementos envolvidos no desencadeamento e controle das vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados no sentido de se esclarecer qual a via e/ou moduladores ativados.

Estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2009), revelaram que o extrato etanólico obtido das folhas de *C. sylvestris* e a caseargrewiina F, um diterpeno clerodânico isolado de tal extrato, promoveram dano ao DNA em células sanguíneas de camundongos, quando administrados nas concentrações de 50 e 3,8 mg/kg, respectivamente. Dessa forma, a fragmentação do DNA induzida pelo tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* nas concentrações de 75 e 150 mg/kg, poderia estar diretamente associada à presença de compostos com atividade citotóxica, antiproliferativa e pró-apoptótica (diterpenos clerodânicos, derivados do ácido gálico e sesquiterpenos) presentes nas folhas da planta.

As administrações de EB-ETOH e f-CHCl₃ na concentração de 37,5 mg/kg, não foram capazes de induzir uma fragmentação significativa do DNA, uma vez que tais tratamentos apresentaram um índice de dano ao DNA de 68 e 88 respectivamente, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle negativo, e não sendo capazes de induzir a morte celular (Figuras 21 e 22).

Já o tratamento com doxorrubicina (utilizada neste estudo como o fármaco referência para a atividade antitumoral), foi capaz de causar total inibição no desenvolvimento do tumor (Tabelas 3, 4, 5 e 6), apresentando um perfil semelhante ao controle normal.

Outro processo celular frequentemente associado ao câncer é a angiogenese. A partir do momento que a angiogênese consiste em um processo que contribui para a progressão e o desenvolvimento de tumores e metástases, a inibição desse processo pode ser considerada como uma importante estratégia para a prevenção e inibição do crescimento de tumores (TONG et al., 2004). Assim, diversas substâncias e compostos que apresentam atividade anti-angiogênica como o resveratrol, fitoestrógenos isolados da soja e cefarantina, também

apresentam atividade antitumoral (HARADA et al., 2009; HARIKUMAR et al., 2009; KANG, JIN, ZHANG, 2009).

Neste estudo, o ensaio da CAM, realizado em embriões de *Gallus domesticus*, foi realizado para analisar a atividade inibitória do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* no desenvolvimento vascular, uma vez que esses extratos apresentaram uma importante atividade antitumoral no modelo do TAE.

Modelos de estudo da vascularização em embriões de *Gallus domesticus* têm sido amplamente utilizados na avaliação da atividade vasculogênica e angiogênica de diversos compostos (RIBATTI et al., 1987; CHAPMAN et al., 2001; LEE et al., 2003). Este modelo experimental apresenta diversas vantagens como: acesso facilitado às membranas vascularizadas anexas aos embriões; ausência do contato com tecidos maternos e das influências placentárias, uma vez que cada ovo corresponde ao ambiente individual de um único embrião; a obtenção rápida de resultados, visto que os primórdios da topografia e dos sistemas orgânicos, como o sistema cardiovascular, estabelecem-se no período de apenas 1 a 4 dias de incubação; a possibilidade de se calcular com boa precisão, o número necessário de ovos e as doses a serem administradas, o que provê um controle mais racional das condições e dos procedimentos na pesquisa (DIAS et al., 2002).

Neste estudo, o tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* nas concentrações de 15; 7,5 e 3,25 µg/disco apresentaram um importante efeito antiangiogênico, uma vez que foram capazes de reduzir o número de vasos em torno de 71; 61,4 e 54,5% e 70,9; 59,1 e 42,1% respectivamente. Além disso, deve-se levar em consideração que tal efeito antiangiogênico promovido por ambos tratamentos ocorreu de maneira dose-dependente, uma vez que se observou um aumento proporcional desse efeito, de acordo com o aumento da dose administrada. Entretanto, o tratamento com esses extratos não foi mais efetivo que o tratamento realizado com AR (controle positivo), o qual causou uma inibição da angiogênese em torno de 85,7%, quando comparada ao grupo controle negativo (Figuras 23, 24 e 25). Por fim, cabe ressaltar que o tratamento dos embriões com extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris*, não se apresentou tóxico, a partir do momento que tais tratamentos não afetaram o desenvolvimento dos embriões, nem a morfogênese externa, os quais apresentaram tamanho médio, razão CCV/CVC e razão CCV/CCV+CVC, semelhantes aos apresentados pelos embriões tratados com etanol- CN (Figuras 26 e 27).

Os mecanismos através dos quais diversos compostos atuam promovendo a inibição da angiogênese *in vivo*, ainda não estão completamente elucidados, mas podem envolver a indução da apoptose, inibição da sinalização dos receptores dos fatores de crescimento e a inibição da expressão e/ou ativação das metaloproteinases (LU et al., 1996; JIMENEZ et al., 2000; NELSON et al., 2000; VINCENT et al., 2001; BENELLI et al., 2002). Outra possibilidade pela qual substâncias exercem efeito antiangiogênico, refere-se à inibição da expressão e atividade da isoforma 1 da COX (COX-1), uma vez que essa enzima atua na regulação do processo de formação de vasos nas células endoteliais vasculares (TSUJII, 1998). Desta forma, diversos antiinflamatórios não esteroidais (indometacina, ácido acetil salicílico) e glicocorticóides, vêm apresentando efeito antiangiogênico (TONG et al., 2004; DIAS et al., 2008).

De acordo com Liu e colaboradores (2006), compostos moduladores da angiogênese, podem atuar de três formas: prevenindo o início da angiogênese, inibindo o crescimento de vasos sanguíneos recém-formados e inibindo diversas etapas da cascata de sinalização da angiogênese. Estudos prévios têm demonstrado que o ácido gálico exerce efeito antiangiogênico ao atuar prevenindo a iniciação da angiogênese, bem como inibindo o crescimento de vasos sanguíneos recém-formados (LIU et al., 2006).

Dentro desse contexto, a atividade antiangiogênica apresentada pelos extratos de *C. sylvestris* testados nesse estudo, poderia estar diretamente relacionada à presença de sesquiterpenos de atividade antiinflamatória comprovada (β -cariofileno e δ -humuleno) e derivados do ácido gálico (IGDE, MGDE) nas folhas da planta (DA SILVA et al., 2008b; DA SILVA, CHAAR, YANO, 2009). Cabe ressaltar a necessidade da realização de estudos mais aprofundados com o objetivo de se estabelecer o mecanismo de ação pelo qual esses extratos realizam o efeito antiangiogênico.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com o presente trabalho, é possível concluir que:

- O extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila de *C. sylvestris* apresentaram efeito citotóxico e antiproliferativo sobre células do carcinoma de Ehrlich cultivadas *in vitro*, sendo a citotoxicidade induzida por estes tratamentos concentração- e tempo-dependente;
- A coloração com BE/LA revelou que o provável tipo de morte celular promovido pelo tratamento com extrato bruto, fração clorofórmica e fração acetato de etila de *C. sylvestris*, é através da indução de apoptose;
- O mecanismo com que o extrato bruto, fração clorofórmica e acetato de etila exercem seus efeitos citotóxico e antiproliferativo não ocorre através da interação direta com o DNA (como é o caso dos agentes alquilantes) e indução de estresse oxidativo no núcleo;
- A fração clorofórmica foi considerada o extrato mais efetivo *in vitro* com respeito ao efeito citotóxico e antiproliferativo;
- Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral *in vivo* demonstraram que o extrato bruto e a fração clorofórmica foram os extratos que apresentaram melhor atividade antitumoral, uma vez que foram capazes de reduzir o ganho de peso e a circunferência abdominal, o volume de líquido ascítico, além de aumentar a proporção de células inviáveis/células viáveis, bem como a sobrevivência média dos animais tratados e portadores do tumor ascítico de Ehrlich;
- O extrato bruto e a fração clorofórmica, quando administrados nas concentrações de 150 e 75mg/kg, foram capazes de induzir a fragmentação do DNA de células do carcinoma de Ehrlich *in vivo*;
- A atividade antitumoral promovida pelo tratamento com extrato bruto e fração clorofórmica sob o modelo experimental do TAE é

dose-dependente, sendo maior, quanto mais alta a concentração administrada;

- Sugere-se que o efeito antitumoral promovido pelo tratamento com o extrato bruto e fração clorofórmica, esteja diretamente associado à capacidade destes extratos em promover a inibição da angiogênese, sendo o potencial antiangiogênico apresentado por estes extratos, dose-dependente;
- O tratamento com extrato bruto e fração de *C. sylvestris* não foi tóxico para os embriões, uma vez que não promoveram alterações na morfogênese e crescimento embrionário;
- A inexistência de efeitos embriotóxicos aparentes em oposição a atividade citotóxica em células tumorais, sugere a ocorrência de alguma especificidade dos extratos em estudo, sobre o microambiente do tumor ascítico de Ehrlich.

7. PERSPECTIVAS

Após o desenvolvimento deste trabalho, ficam algumas propostas para estudos futuros mais aprofundados como:

- Os extratos e frações promissores devem ser melhor avaliados fitoquimicamente. Suas constituições fitoquímicas devem ser elucidadas, para assim, permitir fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e frações e suas atividades biológicas;
- A citotoxicidade *in vitro* deve ser melhor avaliada em cultura sobre outras linhagens de células normais e/ou transformadas, incluindo linhagens celulares humanas;
- Complementar o estudo da atividade pró-apoptótica *in vitro* através da avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: expressão de marcadores de apoptose (p53, Bcl-2, Bax e citocromo C); atividade da caspase 3; fragmentação do DNA por citometria de fluxo; e incorporação de anexina;
- Sugere-se avaliar se a possível atividade pró-apoptótica do extrato bruto e frações de *C. sylvestris* está relacionada à inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2, através da avaliação da expressão e atividade dessas enzimas, bem como da obtenção de curvas concentração-resposta na presença e ausência de AINEs.
- Avaliar se os extratos de *C. sylvestris* promovem seus efeitos antiproliferativos e citotóxicos ao afetarem o ciclo celular, o que pode ser observado através da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da distribuição das células nas diferentes fases do mesmo;
- Finalmente, pode-se isolar e caracterizar as casearinas do extrato bruto e frações de *C. sylvestris* e avaliar os mesmos com respeito à atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSY, M.L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *C. sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, p. 641-676, 1973.
- AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RE'ME'SY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship Between Flavonoid Structure and Inhibition of Phosphatidylinositol-3-kinase and Protein Kinase C Inhibitor. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p.1649-1657, 1997 .
- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.
- ALISSON, M.R. The cancer Handbook. 1ed. – 2 volumes- New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.
- ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 463-499, 2000.
- ALONSO, J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Rosario: Corpus Libros, 2004. p. 577–579.
- ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **American Journal of Pathology**, v. 136, p. 593-608, 1990.
- AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.
- BARON J. A.; SANDLER R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. **Annual Reviews of Medicine**, v.51, p.511–523, 2000.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *C. sylvestris* –I: preventive

anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.

BENELLI, R.; MORINI, M.; CARROZZINO, F.; FERRARI, N.; MINGHELLI, S.; SANTI, L.; CASSATELLA, M.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. **FASEB Journal**, v.16(2), p.267-269, 2002.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. 1059 p.

BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; MORBIDELLI, L.; ZICHE, M.; SANTONI, A.; CAPOGROSSI, M.C. & NAPOLITANO, M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. **Journal of Immunological Methods**, v.273(1-2), p.83-101, 2003.

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

BERTRAM J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p.167-223, 2001.

BISO, F. I. Avaliação Da atividade mutagênica e fitoestrogênica das plantas *Davilla nítida* Vahl e *Davilla elliptica* St. Hil (Dilleniaceae), 2008, 164f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

BLAISE, G.A.; GAUVIN, D.; GANGAL, M. AUTHIER, S. Nitric oxide, cell signaling and cell death, **Toxicology**, v. 208, p. 177-192, 2005.

BLANCO, R.A. Guaçatonga (*C. sylvestris*). Disponível em: <http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A34guaçatonga.htm>. Acesso em: 15 set. 2009.

BLOCK, L. C., SANTOS, A.R.; DE SOUZA, M.M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R.A.; SANTOS, M.A.; MONACHE, F.D.; FILHO, V.C.

Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61(1), p. 85-89, 1998.

BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M.C.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA D.H.; LOPES, M.N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71 (2), p. 181-187, 1999.

BORGES, M. H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ESCARSO-ANDRIÃO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUSHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *C. sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 127, p. 21-30, 2000.

BORGES, M.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., OLIVEIRA, F., FRANSCHESCHI, A.M., RUCAVADO, A., GIGLIO, J.R., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *C. sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p. 1863–1869, 2001.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 615-647, 2003.

BOYLES, R. J.; BAIR, M.C.; CAMPLING, B.G.; JAIN, N. Enhanced anti-cancer activities of some derivatives of titanocene dichloride. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 84, p. 159-162, 2001.

BRASSARD, D. L.; MAXWELL, E.; MALKOWSKI, M.; NAGABHUSHAN, T. L.; KUMAR, C. C.; ARMSTRONG, L. Integrin $\alpha\beta3$ - mediated activation of apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 251, p. 33-45, 1999.

BRIGATI C., NOONAN D. M., ALBINI A. E BENELLI R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clinical and Experimental Metastasis**, v.19, p. 247–258, 2002.

BROOKS, P. C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32, p. 2423-2429, 1996.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67(12), p. 2141-2153, 2004.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v.55 (3), 2003.

CAMARGO, F.G.; GOMES,E.; PANNUNZIO, E.; BUENO, V.S. Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*C. sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de estomatite herpética. **LECTA- Universidade de São Francisco (USF) de Bragança Paulista**, v. 1, p.121-127, 1993.

CAMPOS, A. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. **Investigação das propriedades antitumorais do elatol obtido da alga vermelha *Laurencia microcladia***. Florianópolis, 2009, 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2009.

CARBONARI, K.A. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. **Avaliação do potencial antioxidante (*in vitro e in vivo*) e antiinflamatório de *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia e marliera obscura***. Florianópolis, 2005, 108f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2005.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T.O.; PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P.S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES , A.M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *C. sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.490 – 497, 2007.

CHAPMAN, S. C.; COLLIGNON, J.; SCHOENWOLF, G. C.; LUMSDEN, A. Improved method for chick whole-embryo culture using

a filter paper carrier. **Developmental Dynamics**, v. 220, p.284 – 289, 2001.

CHEN X, THAKKAR H, TYAN F, GIM S, ROBINSON H, LEE C, PANDEY SK, NWOKORIE C, ONWUDIWE N, SRIVASTAVA RK. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. **Oncogene**, v.20, p.6073–6083, 2001.

CHEN, C.; CHENG, Y.; CHEN, S.; CHIEN, C.; KUO, Y.; GUH, J.; KHALIL, A. T.; SHEN, Y. New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Roots of *Casearia membranacea*. **Chemistry & Biodiversity**, v.5, p.162-167, 2008.

CHEN, H.M.; WU, Y.C.; CHIA, Y.C.; CHANG, F.R.; HSU, H.K.; HSIEH, Y.C.; CHEN, C.C.; YUAN, S.S. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v.286(2), p.161-171, 2009.

CHERESH, D. A. Death to a blood vessel, death to a tumor. **Natural Medicine**, v. 4, p. 395-396, 1998.

CHING YU, P; CALDERARO,D; IKEOKA,D.T; DEMARCHI,L.M.M.F.; CARAMELLI,B. Toxicidade miocárdica por doxorubicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51,n. 3, p.67-74, 2005.

CHIPPERFIELD H., KULDIP S.B., SIMON M.C., NURCOMBE V. Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **International Journal of Developmental Biology**, v.46, p. 661 – 670, 2002.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO Y. Antithrotophic action of *C. sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytotherapy Research**, v.22 (6), p. 784-790, 2008.

CLARKSON, B.D.; BURCHENAL, J.H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Program Clinical Cancer Research**, v.1, p.625-629, 1965.

COLLINS J. Letters from editor: The history of cancer. **Seminars in Roentgenology**, v.39(3), p. 341-342, 2004a.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004b.

COLMAN, M. S.; AFSHARI, C. A., BARRET, J. C. Regulation of p53 and activity in response to genotoxic stress. **Mutation Research**, v.462, p. 179-188, 2000.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; Robbins. *Patologia Estrutural e Funcional*, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996.

CONZEN, S.D.; GOTTLÖB, K.; KANDEL, E.S.; KHANDURI P.; WAGNER, A.J.; O'LEARY, M.; HAY, N. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20(16), p.6008-6018, 2000.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**, v.2, p.647-656, 2002.

COUSSENS L.M., WERB Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420(19/26), p.860-867, 2002.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. *IL Fármaco*: Elsevier, p. 2-8, 2003.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**, v.17, p.153-163, 1999.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, n. 265, p. 49-72, 2002.

DA SILVA, A.C.; BALZ, D.; DE SOUZA, J.B.D'A. ; MORSCH, V.M. CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D. ; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase, 50-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *C. sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13 , p. 509–514, 2006.

DA SILVA, S. L. ; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *C. sylvestris* (Flarcortinaceae). **European Journal of Pharmacology**. v. 608 (1-3), p. 76-83, 2009.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *C. sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008a.

DA SILVA, S.I.; FIGUEIREDO, P. M. S.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *C. sylvestris* on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazon**, v. 38, p.107-112, 2008b.

DA SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p. 180-188, 2007.

DA SILVA, T. H. A; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43 (1), p. 1-16, 2007.

D'AMORE, P.A., THOMPSON, R.W. Mechanisms of angiogenesis. **Annual Review of Physiology**, v.49, p.453-464, 1987.

DARMANIN, S.; WISMAYER, P.S.; CAMILLERI PODESTA, M.T.; MICALLEF, M.J.; BUHAGIAR, J.A. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55 (18), p.7359-7365, 2007.

DE CARVALHO, P.R.F.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; KINGSTON, D.G.I.; BOLZANI, V.S. Acetylated DNA-damaging

clerodane diterpenes from *C. sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49 (6), p. 1659-1662, 1998.

DE MATTOS, E.S.; FREDERICO, M.J.S. ; COLLE, T.D. ; DE PIERI, D.V. ; PETERS, R.R.; PIOVEZAN, A.P. Evaluation of antinociceptive activity of *C. sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.1-6, 2007.

DEMPKE, W. et al. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.127, p. 411-417, 2001.

DE 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 783–787, 2005.

DE MESQUITA, M.L.; DE PAULA, J.E; PESSOA C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123 (3), p. 439-445, 2009.

DE VITA, V.T; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Ed. 5th, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1998.

DIAS, P. F., J. M. SIQUEIRA-JUNIOR, L. F. VENDRUSCO, T. J. NEIVA, M. MARASCHIN, A. GAGLIARDI, R. M. RIBEIRO-DO-VALLE. Antiangiogenic and antitumoral properties of polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.56(4), p.436-446, 2005.

DIAS, P. F.; BERTI, F. V.; SIQUEIRA JR, J. M.; MARASCHIN, M; GAGLIARDI, A. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Trans-Resveratrol Inhibits Early Blood Vessel Formation (Vasculogenesis) Without Impairment of Embryonic Growth. **Journal of Pharmacological Sciences**. v.107, p. 118 – 127, 2008.

DIAS, P. F.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, R. P. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.25, p. 28-34, 2002.

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

DUESBERG,P.; RASNICK,D. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.47, p.81-107, 2000.

DVORAK H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New England Journal of Medicine*, v.315, p.1650–1659, 1986.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p. 663-669, 2004.

EISINGER, F.; JACQUEMIER, J.; CHARPIN, C.; STOPPA-LYONNET, D.; BRESSAC-DE-PAILLERETS, B.; PEYRAT, J. P.; LONGY, M.;GUINEBRETIERE, J. M.; SAUVAN, R.; NOGUCHI, T.; BIRNBAUM, D.; SOBOL, H. Mutations at BRCA1: the medul-lary breast carcinoma revisited, **Cancer Research**. v. 58, p.1588-1592, 1998.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. Adhesion events in angiogenesis. **Current Opinion Cell Biology**, v. 13(5), p. 563-568, 2001.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.126, p.682-692, 2000.

ESTEVEES, I.; SOUZA, I.R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L.G.V.; SANTOS, L.S.; SERTIE, J.A.A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L.M.; SCHNEDORF, J.M.; BASTOS, J.K.; CRAVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *C. sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 191-196, 2005.

FACHINGER G., DEUTSCH U., RISAU W. Functional interaction of vascular endothelialprotein- tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. **Oncogene**, v.18 (43), p.5948-5953, 1999.

FELLOWS, L.E. **Pharmaceuticals from traditional medical plants and other: Future prospects:** In: J. D. Coomers, ed. New drugs from natural sources. 1ª Ed. London: IBC technical Services, 1992.

FERREIRA, M.A.N.D. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. **Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO).** Belo Horizonte, 2006,114 f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2006a.

FERREIRA, P. M. P. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. **Determinação do Potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz.** Fortaleza, 2006, 105f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2006.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569(3), p.228-236, 2007.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p. 876-885, 2005.

FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v.1, p.27 – 31, 1995b.

FOLKMAN J. Clinical applications of research on angiogenesis. **New England Journal of Medicine**, v.333, p.1757 – 1763, 1995a.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v.285, p. 1182-1186, 1971.

FRESHNEY, R. I. **Freshney's Culture of animal cell- a multimedia guide**. New York, 1999. CD-ROOM.

GARCIA-RODRIGUEZ L.A. E HUERTA-ALVAREZ C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Epidemiology**, v.12., p.88-93, 2001.

GENG, C.X.; ZENG, Z. C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**,v. 9, p. 696-700, 2003.

GHOBRIL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.55, p. 178-194, 2005.

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy.. **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 36(6), p. 588-590, 1997.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria as targets for chemotherapy. **Apoptosis**, v. 14, p.624-640, 2009.

GOMES, C. A.; DA CRUZ, T. G.; ANDRADE, J.L.; MILHAZES, N.; BORGES,F.; MARQUES, M.P.M. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5395-5401, 2003.

GORMAN, A., MCGOWAN, A., COTTER, T.G., Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. **FEBS Letters**.v. 404 (1), p.27-33, 1997.

GREEN D.R., REED J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p.1309-1312, 1998.

GRETARSDOTTIR, S.; THORLACIUS, S.; VALGARDSDOTTIR, R.; GUDLAUGSDOTTIR, S.; SIGURDSSON, S.; STENARSDOTTIR, M.; JANASSON, J. G.; ANAMTHAWAT-JOHSSON, K.; BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability, **Cancer Research**, v. 58, p.859-862, 1998.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacological intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 237-268, 2000.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, p. 177-184, 2004.

HANGAI, M.M. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Farmácia . **Envolvimento do óxido nítrico nos mecanismos de resistência tumoral em células l infoblásticas leucêmicas**. Florianópolis, 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2007.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development, **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 858–880, 2004.

HARADA, K.; FERDOUS, T.; ITASHIKI, Y.; TAKII, M.; MANO, T.; MORI, Y.; UEYAMA, Y. Cepharanthine inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. **International Journal of Oncology**, v.35(5), p.1025-1035, 2009.

HARIKUMAR, K.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SETHI, G.; DIAGARADJANE, P.; ANAND, P.; PANDEY, M.K.; GELOVANI, J.; KRISHNAN, S.; GUHA, S.; AGGARWAL, B.B. Resveratrol, a multi-targeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro

and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer.

International Journal of Cancer, [Epub ahead of print], 2009.

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

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 36, p. 1374-1389, 1997.

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

HIRSCHMANN, G.A.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 158-172, 1990.

HOCKENBERY, D.; OLTAVI, Z.; YIN, X.; MILLIMAN, C.; KERSMEYER, B. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v.75, p.241-251, 1993.

HOEHNE, F.C. Plantas e substância vegetais tóxicas e medicinais. Ed. Graphicas: São Paulo, 1939. p. 196-199

HOSTETTMAN, K; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152 p.

HOU, J., SUN, T.; HU, J.; CHEN, S.; CAI, X.; ZOU, G. Chemical composition , cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chemistry**, v. 133, p. 355-358, 2006.

HSU, C.L.; LO, W.H.; YEN, G. C. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas- and mitochondrial-mediated pathway.

Journal of Asian Natural Products Research, v.23(6), p.561-571, 2009.

HUANG, D.; SHEN, Y.; WU, C.; HUANG, Y.; KUNG, F.; TENG, C.; GUH, J. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells.

European Journal of Pharmacology, v. 503, p.17-24, 2004.

HUNTER, M. S.; CORLEY, D. G.; CARRON, C. P.; ROWOLD, E.; KILPATRICK, B. F.; DURLEY, R. C.; **Journal of Natural Products**, v. 60 (9), p.894-899, 1997.

HWANG, E.Y.; HUH, J.; CHOY, M.; CHOY, S. Y.; HONG, H.; CHO, S. Inhibitory effects of gallic acid and quercetin on UDP-glucose dehydrogenase activity. **FEBS Letters**, v.582, p.3793-3797, 2008.

IGNEY, F.H; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature**, v. 2, p. 277-288, 2002.

INCA – Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 24 maio 2009.

ISHIBASHI, M.; OHTSUKI, T. Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis. **Medicinal Research Reviews**, v. 28 (5), p.688 -714, 2008.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, v.17, p. 306-313, 1999.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles casearins A-F for *C. sylvestris* (Flacortinaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38 (12), p. 3384- 3388, 1990.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. Antitumor principles from *C. sylvestris* Sw (Flacortinaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36 (4), p. 1585-1588, 1988.

JACOBY, R. F.; SEIBERT, K.; COLE, C.E.; KELLOFF, G.; LUBET, R.A. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the Min mouse model of adenomatous polyposis. **Cancer Research**, v. 60, p. 5040–5044, 2000.

JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; ANANDAKUMAR, P.; KAMARAJ, S.; DEVAKI, T. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 319, p.51–59, 2008.

JENDIROBA, D. B.; KLOSTERGAARD, J.; KEYHANI, A.; PAGLIARO, L.; FREIREICH, E. J. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. **Leukemia Research**, v.26, p.301-310, 2002.

JIMENEZ, B.; VOLPERT, O.V.; CRAWFORD, S.E.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN, R.L. & BOUCK, N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. **Nature Medicine**, v.6(1), p.41-48, 2000.

JONES N.; ILJIN K.; DUMONT D.J.; ALITALO K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v.2, p.257 – 267, 2001.

JUNGLES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. **Caderno de Farmácia “I”**, p. 95-101, 1985.

JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumour-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, p. 305-319, 2003.

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

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A.F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and

lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food and Chemical Toxicology**, article in press, 2004.

KANG, X.; JIN, S.; ZHANG, Q. Antitumor and antiangiogenic activity of soy phytoestrogen on 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced mammary tumors following ovariectomy in Sprague-Dawley rats. **Journal of Food Science**, v.74(7), p.237-242, 2009.

KANG, M. K.; KANG, N. J.; JANG, Y. J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Gallic Acid Induces Neuronal Cell Death through Activation of c-Jun N-Terminal Kinase and Downregulation of Bcl-2. Natural Compounds and Their Role in apoptotic cell signaling pathways: **Annals of The New York Academic of Sciences.**, v.1171, p.514–520, 2009.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from Fruits of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70 ,p. 1122-1126, 2007.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANARSA, T.; BUAYAIRAKSA, M. New Bioactive Clerodane Diterpenoids from the Bark of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.183-188, 2005.

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; RAJESH AGARWAL, R; AGARWAL, C. Gallic Acid, an Active Constituent of Grape Seed Extract, Exhibits Anti-proliferative, Pro-apoptotic and Anti-tumorigenic Effects Against Prostate Carcinoma Xenograft Growth in Nude Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 26 (9), p. 2133-2140 , 2009.

KAWAMORI T.; RAO, C.V.; SEIBERT, K.; REDDY, B. S. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase- 2 inhibitor, against colon carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 58, p. 409–412, 1998.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURIE, A. H.; BRIT, J. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p.239-257, 1972.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; SADLER, I. H.; WATERMAN, P. G. **Phytochemistry**, v.29 (11), p. 3591-3595, 1990.

KIECHLE, F.; ZHANG, X. Apoptosis: a brief review. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 21, p.58-61, 1998.

KROEMER, G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. **Cell Death Differentiation**, v. 4, p.443-456, 1997.

KRUEGER, A.; BAUMMAN, S.; KRAMMER, P.H.; KIRCHHOFF, S.; FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor mediated apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8247-8254, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. ROBBINS, S.L., CONTRAN, R.S. **Pathology basis of disease**. 7ed. China:WB Saunders, 2004, 1552p.

KVIECINSKI, M.R., FELIPE, K. B.; SCHOENFELDER, T.; WIESE, L.P.L.; ROSSI, M. H.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 69–75, 2008.

LAMPRONTI, I.; SAAB, A.M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **International Journal of Oncology**, v.29, p.989–995, 2006.

LEE, Y. S.; YANG, H. O.; SHIN, K. H.; CHOI, H. S.; JUNG, S. H.; HOON, S.; KIM, Y. M.; OH, D. K., LINHARDT, R. J., KIM, Y. S. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. **European Journal of Pharmacology**, v.465, p.191-198, 2003.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, p.402–407, 2003.

- LENNON, S.V., MARTIN, S.J., COTTER, T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferation**, v.24 (2),p. 203-214, 1991.
- LEPLEY, D. M.; LI, B.; BIRT, D. F.; PELLING, J. C. The Chemopreventive Flavonoid Apigenin Induces G2/M Arrest in Keratinocytes. **Carcinogenesis**, v.17, p. 2367-2375, 1996.
- LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.
- LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STELLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-336, 1991.
- LIU, Z.; SCHWIMMER, J.; LIU, D.; LEWIS, J.; GREENWAY, F.L.; YORK, D.A.; WOLTERING, E.A. Gallic Acid is Partially Responsible for the Antiangiogenic Activities of *Rubus* Leaf Extract. **Phytotherapy Research**, v.20, p. 806–813, 2006.
- LOBO, C.; RUIZ-BELLIDO, M.A.; ALEDO, J.C.. MÁRQUEZ, J.; NÚÑEZ DE CASTRO, I.; ALONSO, F.J. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. **Biochemical Journal**, v. 348, p. 257-261, 2000.
- LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A.M.; STATI, G.A.; MENICHINI, F. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Research**, v. 27, p.3293–3299, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, p.115.
- LORENZO, P.I.; ANOLDUSSEN, Y.J.; SAATCIOGLU, F. Molecular Mechanisms of apoptosis in prostate cancer. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 13, p.1-38, 2007.
- LU, H.; MABILAT, C.; YEH, P.; GUITTON, J.D.; LI, H.; POUCHELET, M.; SHOEVAERT, D.; LEGRAND, Y.; SORIA, J.;

SORIA, C. Blockage of urokinase receptor reduces in vitro the motility and the deformability of endothelial cells. **FEBS Letters**, v.380(1-2), p.21-24, 1996.

MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K.A.; GRUNKEMEYER, J.A.; ERICKSEN, M.B.; HOPFER, H.; XIAO, Y.; STILLMAN, I.E.; KALLURI, R. (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.275(28), p. 21340-21348, 2000.

MAISTRO, E.L., CARVALHO, J.C., MANTOVANI, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *C. sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 337–342, 2004.

MANCIN F.; SCRIMIN P.; TECILLA P.; TONELLATO U. Artificial metallonucleases. **Chemical communications**, v.20, p.2540-2548, 2005.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p.1545-1556, 1995.

MASQUELIER, M., ZHOU, Q.F.; GRUBER, A.; VITOLS, S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p. 1047-1056, 2004.

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

MCGOWAN, A.J., FERNANDES, R.S., SAMALI, A., COTTER, T.G., Anti-oxidants and apoptosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 24 (1), p. 229-233, 1996.

MEDEMA R.H. E BOS J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. **Critical reviews in oncogenesis**, v.4, p.615-661, 1993.

MELO, P. S; JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; HAUN, M.. Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MOFFAT, J.; HASHIMOTO, M.; KOJIMA A.; KENNEDY, D.O.; MURAKAMI, A. KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; MATSUI-YUASA, I. Apoptosis induced by 1 -acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21 (12), p. 2151-2157, 2000.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *C. sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.39 (3), p. 693-697, 1991.

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

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

MOTA SIQUEIRA, J.M.; GAZOLA, A.C.; FARIAS, M.F.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; DE BRUM-FERNANDES; A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both *in vitro* and *in vivo* models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.64, p.529-538, 2009.

NAKAGAWA, Y.; AKAO, Y.; MORIKAWA, H.; HIRATA, I.; KATSU, K.; NAOE, T.; OHISHI, N.; YAGI, K. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. **Life Sciences**, v. 70, p. 2253–2269, 2002.

NAKAGAWA, W.T.; LOPES, A. Conceitos Básicos em Oncologia. In: AYOUB, A.; FRIAS, M.; BARROS, M.; KOBAYASHI, R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**, São Paulo: LEMAR, 2000, p.1-19.

NELSON, A. R.; FINGLETON, B.; ROTHENBERG, M. L.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. **Journal of Clinical Oncology**, v.18(5), p.1135-1149, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, J.M.; SNADER, K.M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

NGUYEN, M., Y. SHING, J. FOLKMAN. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvascular Research**, v.47 (1), p.31-40. 1994.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22 (8), p.299-306, 1997.

O' REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v.88(2), p.277-285, 1997.

OBERLIES, N.H., BURGESS, J.P., NAVARRO, H.N., PINOS, R.E., FAIRCHILD, C.G.R., PETERSON, R.W., SOEJARTO, D.D., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, D., WANI, M.C., WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *C. sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p.95-99, 2002.

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

OLIVEIRA, C.C.F.; DO NASCIMENTO, J.L.M.; MUELLER, A.H.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação in vitro do efeito anti-proliferativo das drogas BSA-1 e 32/26/2-B em linhagens cancerígenas de retinoblastoma Y79. **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v.1, p.1-9, 2001.

OMS-Organização mundial de saúde. Câncer. Disponível em:<<http://www.who.int/cancer/en/>>acesso em 13 maio 2009.

OTTO,S. **Enfermagem Prática:Oncologia**. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2002, p.526.

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

PRASAD, S. B.; GIRI, A. Antitumor effect of cisplatin against murine ascites Dalton's lymphoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, p.155-162, 1994.

PRITCHARD, D. M.; WATSON, A. J. M. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v.72, p.149-169, 1996.

QURESHI, S. O. A. et al. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 165, p. 1-11, 2001.

RAJESHKUMAR, N. V.; JOY, K.L.; KUTTAN, G.; RAMSEWAK, R.S.; NAIR, M.G.; KUTTAN, R. Antitumour and anticarcinogenic activity of Phyllanthus amarus extract, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 17-22, 2002.

RAK J., FILMUS J., FINKENZELLER G., GRUGEL S., MARME D., KERBEL R.S. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Reviews**, v.14, p.263-277, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M. RITTER, J. M. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M., MOORE, P.K. Farmacologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11 (1), p.57-69, 2001.

REBELLO, J. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas**. Florianópolis, 2005, 112f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2005.

REDDY L., ODHAV B., BHOOLA K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99(1), p.1-13, 2003.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v.17, p.3225–3236, 1998.

REYNOLDS JE, YANG T, QIAN L, JENKINSON JD, ZHOU P, EASTMAN A, CRAIG RW. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Research**, v.54(24), p.6348-6352, 1994.

RIBATTI, D.; RONCALI, L.; NICO, B.; BERTOSSI, M. Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. **Acta Anatomica.**, v.130, p. 257 – 263, 1987.

RICHARDSON, M. A. Complementary/alternative medicine use in comprehensive cancer center and the implications oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v.18, p.2505-2514, 2000.

ROCHA, B. A.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p.364-369,2001.

RODRIGUES, A.M., DE PAULA, J.E., DEGALLIER, N., MOLEZ, J.E., ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, p. 314–317, 2006.

ROY, S.; WESTMAAS, J. A.; BUDA, F.; REEDJIJK, J. Platinum (II) compounds with chelating ligands based on pyridine and pyrimidine : synthesis, characterizations, DFT calculations, cytotoxic assays and binding to a DNA model base. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.103, p. 1278-1287, 2009.

RUSTIGI, A. K.; PODOLSKY, D. K. The molecular basis of colon cancer. **Annual Review of Medicine**, v.43, p.61-68, 1996.

SASSIOTO, M.C.P.; CARDOSO FILHO, N.; FACCO, G.G.; SODRÉ, S.T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U.; FARIAS, A.G. Effect of *C. sylvestris* on bone repair with devitalized bovine bone matrix in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19 (6), p.637-641, 2004.

SCARPELLINI M.; NEVES A.; HÖRNER R.; BORTOLUZZI A. J.; SZPOGANICS B.; ZUCCO C.; NOME SILVA R. A.; DRAGO V.; MANGRICH A.S.; ORTIZ W. A.; PASSOS W. A.; DE OLIVEIRA M.C.; TERENCEZI H. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new cis-aqua/hydroxyl cooper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42(25), p. 8353-8365, 2003.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R.A.P.S. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19 (1), p.73-81, 1979.

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

SCHWARTZ, J. L.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KRONH, K. A. Effect of p53 activation on cell growth, thymidine kinase -1 activity, and 3'-deoxy-3'fluorothymidine uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 419-423, 2004.

SHEN, Y. CHENG, Y.; AHMED, A. F.; LEE, C. L.; CHEN, S.; CHIEN, C.; KUO, Y.; TZENG, G. Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia membranace.*, **Journal of Natural Products**, v. 68, 1665-1668, 2005.

SHEN, Y.; WANG, L.; WANG, C.; KHALIL, A. T.; GU, J. Two New Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 52(1), p.108—110, 2004.

SHIOZAKI, E.N.; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 39, p.486-494, 2004.

SILVA, M. C. ; CARVALHO, J. C. T.. **Plantas Mediciniais: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ª Ed. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

SINGAL, P.K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v.339, p.900-905,1998.

SINGH TR, SHANKAR S, CHEN X, ASIM M, SRIVASTAVA RK. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma *in vivo*. **Cancer Research**, v.;63, p. 5390–5400, 2003.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L.. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA JUNIOR, J.M. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. **Atividade antitumoral de dihidrocurbitacina B, um composto isolado de Wilbrandia ebracteata Cogn: estudos *in vitro* e *in vivo***. Florianópolis, 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Univesidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2007

SKAPER, S. D.; FABRIS, M.; FERRARI, V.; CARBONARE, M. D.; LEON, A. Quercetin Protects Cutaneous Tissue-associated Cell Types Including Sensory Neurons from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion: Cooperative Effects of Ascorbic Acid. **Free Radicals Biology & Medicine**, v.22, p. 669-678, 1997.

SOLIMENE A.C.C., BOSCARDIN S.B., FERRAZ M.G.C., CHAMMAS R. Angiogenesis in solid tumors. **Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, v.1, p. 9 – 20, 1999.

SORGATO, S. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Programa de Pós Graduação em Farmácia. **Atividade antileucêmica de chalconas sintéticas**. Florianópolis, 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Univesidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Farmácia, Florianópolis, 2007.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? **Bioassays**, v.26, p.1097-1107, 2004.

SREEDHARA A.; COWAN J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.4, p.337-347, 2001.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L., DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v.69, p. 217-245, 2000.

STROBER, W., 1996. **Common immunologic techniques: Trypan blue exclusion test of cell viability**. In: COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. (Eds.), *Current Protocols in Immunology*, vol.3. John Wiley, New York, A.3B.1–2.

SUBBARAMAIAH K., DANNENBERG A.J. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24(2), p.96-102, 2003.

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133, 1990.

SUZUKI, Y., ONO, Y., HIRABAYASHI, Y. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. **FEBS Letters**, v..425 (2), p.209-212, 1998.

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

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A; LONGTIN, A.; NAGAU, F.;
LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf
essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of
Ethnopharmacology**, v.103, p.99-102, 2006.

TALAPATRA, S. K.; CANGULY, N. C.; GOSWAMI, S.; TALAPRA,
B. **Chemical Journal of Natural products**, v. 46 (3), p.401-408, 1983.

TENG, B.; WANG, S.; FU, Z. ; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L.
Semiautomatic synthesis of 3'-Deoxy-3'-[18F]fluorothymidine using
three precursors. **Applied Radiation and Isotopes.**, v. 61, p. 187-193,
2006.

THOMPSON E, B. The many roles of c-Myc in apoptosis. **Annual
Review of Physiology**, v.60, p.575-600, 1998.

TONG, Y., ZHANG, X., ZHAO, W., ZHANG, Y., LANG, J., SHI, Y.,
TAN, W., LI, M., ZHANG, Y., TONG, L., LU, H., LIN, L., DING, J.
Anti-angiogenic effects of shiraiachrome A, a compound isolated from a
Chinese folk medicine used to treat rheumatoid arthritis. **European
Journal of Pharmacology** , v.494, p.101–109, 2004.

TSANG, W.P.; CHAU, S.P.; KONG, S.K.; FUNG, K.P.; KWOK, T.T.
Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53- independent
apoptosis. **Life Sciences**, v.73, p. 2047–2058, 2003.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.;DU
BOIS R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon
cancer cells. **Cell**, v.93, p.705–716, 1998.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.;
DODARO, D.; PASSALACQUA, N.G.; STATTI, G.; MENICHINI, F.
In vitro cytotoxic effects of *Senecio stabianus* Lacaita (Asteraceae) on
human cancer cell lines. **Journal of Asian Natural Products Research**,
v.23(18), p.1707-1718, 2009.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, p.165-175, 2003.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v. 84, p.627-639, 2005.

VIEIRA JR., G. M.; GONÇALVES, T. O.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, P.M.P.; PESSOA, C. O. ; LOTUFO, L. V. C.; BUZANELLI TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, J.A. Cytotoxic Clerodane Diterpenoids from *Casearia obliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 72 ,p. 1847–1850, 2009.

VINCENT, L.; CHEN, W.; HONG, L.; MIRSHAHI, F.; MISHAL, Z.; MIRSHAHI-KHORASSANI, T.; VANNIER, J.P.; SORIA, J.; SORIA, C. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. **FEBS Letters**, v.495(3), p.159-166, 2001.

WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Investigation**, v, 19, p. 621-629, 2001.

WOLFE, J.T., ROSS, D., COHEN, G.M. A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. **FEBS Letters**, v.352 (1), p.58-52, 1994.

YANCOPOULUS G.D., DAVIS S., GALE N.W., RUDGE J.S., WIEGAND S.J., HOLASH J. Vascular - specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v.407, p. 242 –247, 2000.

YOO J.; LEE, Y. J. Aspirin enhances TRAIL-mediated apoptosis in hormone refractory prostate cancer cells through survivin downregulation. **Molecular Pharmacology**, v.72, p.1586–1592, 2007.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M., HTAY, H.H.; IWATA, S.; TSUBOUCHI, R.; MURAKAMI, K. Prooxidant action of gallic acid compounds: cooper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Toxicology In Vitro**, v. 16, p. 705-709, 2002.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental:** In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. 1ª Ed. Chapecó: Argus, 2001, 523 p.

ZAMZAMI, N., MARCHETTI, P., CASTEDO, M., ZANIN, C., VAYSSIERE, J.L., PETIT, P.X., KROEMER, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.181 (5), p.1661-1672, 1995.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON C., GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology and Therapeutic**, v.92, p. 57-70, 2001.

