



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

Karina Bettega Felipe

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA
E ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *Casearia sylvestris* E DE
FENILAMINONAFTOQUINONAS ASSOCIADAS OU NÃO AO
ASCORBATO DE SÓDIO**

Florianópolis

2014

Karina Bettega Felipe

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA
E ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *Casearia sylvestris* E DE
FENILAMINONAFTOQUINONAS ASSOCIADAS OU NÃO AO
ASCORBATO DE SÓDIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Felipe, Karina Bettega

Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de *Casearia sylvestris* e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio / Karina Bettega Felipe ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa - Florianópolis, SC, 2014.

168 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. atividade antiproliferativa. 3. atividade antitumoral. 4. *Casearia sylvestris*. 5. fenilaminonaftoquinonas. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Estudo do mecanismo de ação antiproliferativa e antitumoral de extratos de Casearia sylvestris e de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio"

por

Karina Bettge Felipe

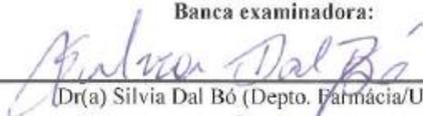
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 03/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



Dr(a) Rozangela Curi Pedrosa (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)

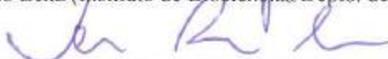
Banca examinadora:



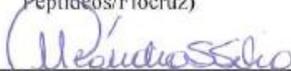
Dr(a) Silvia Dal Bó (Depto. Farmácia/UNESC)



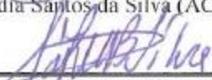
Dr(a) Guido Lenz (Instituto de Biociências/Depto. de Biofísica/UFRGS)



Dr(a) Floriano Paes Silva Junior (Lab. de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos/Fiocruz)

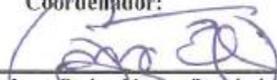


Dr(a) Maria Cláudia Santos da Silva (ACL/CCS/UFSC)



Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2014

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, cunhado Alexandre e sobrinho Nicolas pela amizade, companhia e apoio durante a realização desse trabalho.

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.

Aos integrantes do GTOX: prof. Dr. Pedro Buc Calderón, Manuel Valderrama, Julien Verrax, Brice Sid, Christophe Glorieux, Isabelle Blave, Veronique Allaeys, Luc Geshe e Patrícia Debluts pelo auxílio na execução dos experimentos referentes as fenilaminonaftoquinonas, amizade e apoio durante todo o período em que realizei um estágio em Bruxelas.

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.

Aos colegas e ex colegas do laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX): Fabiana Ourique, Luiza Castro, Valdelúcia Grineviscius, Nádia Motta, Carina Sardá, Marjorie Marin e Tânia Fischer Gunter pela convivência, amizade, discussões, apuros e momentos agradáveis que passamos. Bene, também aproveite este espaço para lhe agradecer a paciência e auxílio na formação desse trabalho.

Aos amigos Nádia Falcão-Bucker, Eduardo Benedetti Parisotto, Maicon Kwiecinski, Silvia Dal Bó, Andressa Pereira Bettega, Anele Trentin, pela amizade, companhia, compreensão e ajuda nos momentos conturbados. Anele, um agradecimento especial a ajuda nas fotos das células! Maicon, nem se eu te agradecer todos os dias, retribuirei tudo o que você fez por mim nesse período! Desde ajuda a fazer BO em francês, até inúmeros almoços de domingo com polenta! Nádia Falcão-Bucker, Eduardo Benedetti Parisotto obrigada por estarem presentes

todos os dias me escutando, me aconselhando e rindo das minhas indiasdas.

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 - Atividades Biológicas de diferentes partes de <i>Casearia sylvestris</i>	48
Tabela 2 - Atribuições dos sinais de RMN ¹ H e ¹³ C de amostra de constituinte isolado de f-CHCl ₃	74
Tabela 3 - Valores de CI ₅₀ (μM) determinadas para extrato bruto (EB-ETOAc), fração clorofórmica (f-CHCl ₃), fração acetato de etila (f-EtOAc) e fração metanólica (f-MeOH) de <i>C. sylvestris</i> em cultura de células MCF-7 tratadas por 24 h com os respectivos extratos (7,8 – 250 μg/mL).	78
Tabela 4 - Valores de CI ₅₀ (μM) determinadas para fenilaminonaftoquinona Q7 e fenilaminonaftoquinona Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC) em cultura de células T24 e fibroblastos BALB 3T3 sob incubação de 24 h.	106
Tabela 5 - Atividade DEVDase obtidos após o tratamento de células T24 com as fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μM) associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM), pelos períodos de 4 e 24 horas.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- As duas principais vias apoptóticas.	31
Figura 2 - <i>Checkpoints</i> envolvidos na progressão do ciclo celular.	35
Figura 3 - Proteínas envolvidas no controle da progressão do ciclo celular.	36
Figura 4 - <i>Casearia sylvestris</i> Swarts.	46
Figura 5 - Estrutura química das casearinas, casearvestrinas, caseargrevina F e sylvestrisídeos identificados em <i>C. sylvestris</i>	52
Figura 6 - Estrutura química dos caseariasídeos e derivados do ácido gálico identificados em <i>C. sylvestris</i>	53
Figura 7- Estrutura química de derivados do ácido elágico identificados em <i>C. sylvestris</i>	54
Figura 8 - Ciclo redox induzido por quinonas.	56
Figura 9 - Estrutura química das fenilaminonaftoquinonas sintetizadas e submetidas a um <i>screening in vitro</i> para a seleção dos compostos mais promissores.	58
Figura 10 - Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo <i>in vitro</i> do extrato bruto (EB-ETOH) e das frações clorofórmica (f-CHCl ₃), acetato de etila (f-EtOAc) e metanólica (f-MeOH) de <i>C. sylvestris</i> sobre células MCF-7, bem como dos mecanismos envolvidos na mediação destes efeitos.	68
Figura 11- Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial antitumoral <i>in vivo</i> do extrato bruto (EB-ETOH) e da fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i> sobre o carcinoma sólido de Ehrlich.	72
Figura 12 - Estrutura química da casearina C identificada na fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i>	74

Figura 13- Efeito citotóxico do extrato bruto (EB-ETOH) e das frações clorofórmica (f-CHCl ₃), acetato de etila (f-EtOAc) e metanólica (f-MeOH) de <i>C. sylvestris</i> (7,8 – 250 µg/mL) sobre células MCF-7 após 24 horas de tratamento.	77
Figura 14 - Efeito anticlonogênico do extrato bruto (EB-ETOH) de <i>C. sylvestris</i> administrado nas concentrações de 9 e 18 µg/mL sobre células MCF-7 cultivadas <i>in vitro</i> , após 24 horas de tratamento.	79
Figura 15 - Efeito anticlonogênico da fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i> administrada nas concentrações de 2 e 4 µg/mL sobre células MCF-7 cultivadas <i>in vitro</i> , após 24 horas de tratamento.	81
Figura 16 - Efeito do extrato bruto (EB-ETOH - 56,4 µg/mL) e fração clorofórmica (f-CHCl ₃ - 26,4 µg/mL) de <i>C. sylvestris</i> sobre a progressão do ciclo celular de células MCF-7 cultivadas <i>in vitro</i> após 48 horas de tratamento.	82
Figura 17 - Efeito do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f-CHCl ₃) de <i>C. sylvestris</i> sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular e a indução de senescência.	83
Figura 18 - Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 3 h de tratamento com o EB-ETOH (31,25 – 500 µg/mL) de <i>C. sylvestris</i>	86
Figura 19 - Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 3 h de tratamento com f-CHCl ₃ (31,25 – 500 µg/mL) de <i>C. sylvestris</i>	87
Figura 20 - Inibição do crescimento tumoral promovido pelos tratamentos (9 dias - i.p.) com doxorrubicina (DOX – 1,2 mg/Kg), EB-ETOH (150 mg/Kg) e f-CHCl ₃ (150 mg/Kg) em camundongos	

portadores do tumor sólido de Ehrlich, com base na espessura da pata.	88
Figura 21 - Inibição do crescimento tumoral promovido pelos tratamentos (9 dias - i.p.) com doxorubicina (DOX – 1,2 mg/Kg), EB-ETOH (150 mg/Kg) e f-CHCl ₃ (150 mg/Kg) em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, com base na razão da massa tumoral/área do osso.....	89
Figura 22 - Necrose induzida pelos extratos de <i>C. sylvestris</i> em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.	91
Figura 23 - Apoptose induzida pelos extratos de <i>C. sylvestris</i> em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.	92
Figura 24 - Hipótese do mecanismo de ação antiproliferativa do extrato bruto e fração clorofórmica de <i>Casearia sylvestris</i>	96
Figura 25 - Reação de síntese e estrutura química das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9	98
Figura 26 - Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo <i>in vitro</i> de fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio sobre células T24, bem como dos mecanismos envolvidos na mediação destes efeitos.....	104
Figura 27 - Efeito citotóxico das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (0 - 50 µM) ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.	107
Figura 28 - Efeito citotóxico das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (0 – 50 µM) ou em associação ao ascorbato	

de sódio (ASC – 1 mM) sobre células BALB 3T3 após 24 horas de tratamento.	108
Figura 29 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (10 µM) ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre a viabilidade de células T24 após 24 horas de tratamento.	109
Figura 30 - Imunoeletroforese para a detecção da clivagem da proteína PARP em homogenato total de células T24 tratadas por 24 h com as fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 µM) associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM).	112
Figura 31 - Efeito anticlonogênico das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 µM) e Q9 (1,0 µM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC- 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.	114
Figura 32 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 µM) e Q9 (2,0 e 4,0 µM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 24 horas de tratamento.	116
Figura 33 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 µM) e Q9 (2,0 e 4,0 µM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 48 horas de tratamento.	118
Figura 34 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 µM) e Q9 (2,0 e 4,0 µM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 72 horas de tratamento.	119

Figura 35- Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona Q7 sobre células T24. As figuras mostram a coloração citoquímica adquiridas pelas células T24 após seu tratamento com veículo (CTRL), ASC (1 mM), Q7 (10 μ M) e Q7 (10 μ M) + ASC (1 mM) pelo período de 24 horas.....	121
Figura 36 - Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona Q9 sobre células T24. As figuras mostram a coloração citoquímica adquiridas pelas células T24 após seu tratamento com veículo (CTRL), ASC (1 mM), Q9 (4 μ M), Q9 (4 μ M) + ASC (1 mM) pelo período de 24 horas.....	122
Figura 37 - Efeito da fenilaminonaftoquinona Q7 (5 μ M) administrada isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1mM) sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular.	124
Figura 38 - Efeito da fenilaminonaftoquinona Q9 (4 μ M) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC) sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular.....	125
Figura 39 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (5 μ M) e Q9 (4 μ M) administradas isoladamente ou em associação a ASC (1 mM) sobre a ativação de MAPKs.....	127
Figura 40 - Papel da via das MAPKs sobre a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μ M) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.....	128
Figura 41 - Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona 9 (Q9) sobre células T24 e o bloqueio deste efeito pelo pré-tratamento das células com o inibidor de JNK SP600125.....	129

Figura 42 - Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células T24 pelo período de 1 hora com a fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 – 10 μ M) e associação fenilaminonaftoquinona Q7 + ascorbato de sódio (1 mM) (Q7 + ASC).	131
Figura 43 - Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células T24 pelo período de 1 hora com a fenilaminonaftoquinonas Q9 (2,5 – 10 μ M) e associação fenilaminonaftoquinona Q9 + ascorbato de sódio (1 mM) (Q9 + ASC).	132
Figura 44 - Espectro de RPE referente a intensidade do radical livre ascorbil gerado pelas associações de fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 e 100 μ M) ao ASC (1 mM).	133
Figura 45 - Efeito da enzima antioxidante catalase (CAT) sobre a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μ M) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento..	134
Figura 46 - Hipótese do mecanismo de ação citotóxica e antiproliferativa das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio.	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC	7-amino-4-trifluorometil cumarina
AIF	Fator indutor de apoptose
Apaf-1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas
ASC	Ascorbato de sódio
ATP	Nucleotídeo de adenina trifosfato
BRAF	Raf cinase do tipo B
CAT	Catalase
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
CDKis	Inibidores de cinases dependentes de ciclina
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CI ₂₀	Concentração inibitória 20%
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DEVD	Sequência aspartato-glutamato-valina-aspartato
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
EB-ETOH	Extrato bruto de <i>Casearia sylvestris</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
Endo G	Endonuclease G
EROs	Espécies reativas do oxigênio
f-EtOAc	Fração acetato de etila de <i>Casearia sylvestris</i>
FADD	Proteína adaptadora com domínio de morte associada a FAZ
f-CHCl ₃	Fração clorofórmica <i>Casearia sylvestris</i>
FLIP	Proteína inibidora da enzima conversora de

	interleucina 1-b tipo FADD
f-MeOH	Fração metanólica de <i>Casearia sylvestris</i>
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT-1	Transportador de glicose do tipo 1
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
HtrA2/Omi	Proteína A2 dependente de alta temperatura/endoprotease regulada por estresse Omi
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IGDE	Isobutil galato 3,5-dimetil éter
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
MGDE	Metil galato-3,5-dimetil éter
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5-difeniltetrazolil
NADPH	Fosfato de Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli ADP ribose polimerase
Q7	Fenilaminonaftoquinona 7
Q9	Fenilaminonaftoquinona 9
RIPK1	Receptor de interação proteína-cinase 1
RIPK3	Receptor de interação proteína-cinase 3
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
Rpm	Rotações por minuto
SASP	Senescência associada a fenótipo secretório

SMAC/DIABLO	Segundo ativador mitocondrial de caspases/ proteína inibidora direta de IAP de baixo ponto isoeletrico
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAF2	Receptor associado ao fator-2
TRAIL	Fator de necrose tumoral relacionado a apoptose induzida por ligante

RESUMO

Casearia sylvestris é uma planta utilizada popularmente no tratamento de tumores. Quinonas tratam-se de compostos que apresentam significativo efeito antitumoral. Evidências indicam que o efeito antineoplásico de quinonas pode ser elevado pela associação destas com o ascorbato de sódio (ASC). Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos antiproliferativo e antitumoral mediados pelo extrato bruto (EB-ETOH) e frações de *Casearia sylvestris*, bem como pelas fenilaminonaftoquinonas 7 (Q7) e 9 (Q9) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio. A análise fitoquímica demonstrou a presença de casearina C na fração clorofórmica (f-CHCl₃) e EB-ETOH de *C. sylvestris*. EB-ETOH e f-CHCl₃, apresentaram importante citotoxicidade sobre células MCF-7. Quando administrados em doses sub-tóxicas (\geq CI₂₀), EB-ETOH e f-CHCl₃ exerceram atividade antiproliferativa sobre células MCF-7, sendo capazes de promover a parada do ciclo celular em G1, devido ao aumento da expressão de p53 e p16, bem como da redução da expressão de CDK2. Além disso, os extratos elevaram a fosforilação de γ H2Ax. EB-ETOH e f-CHCl₃ apresentaram significativa atividade antitumoral *in vivo* em camundongos isogênicos Balb-C portadores do tumor sólido de Ehrlich, reduzindo a razão área da massa tumoral/área do osso em torno de 18 e 40%, respectivamente. Q7 e Q9 mostraram citotoxicidade seletiva sobre células T24, a qual foi potencializada pela associação destes compostos a ASC (CI₅₀ Q7 = 27,1; CI₅₀ Q9 = 44,3; CI₅₀ Q7 + ASC = 14,5; CI₅₀ Q9 + ASC = 16,9 μ M). Fenilaminonaftoquinonas (10 μ M) isoladas ou associadas à ASC não foram capazes de promover a ativação de caspases e a clivagem da PARP, sugerindo-se que o mecanismo de morte induzido pelas associações trata-se de necrose, visto que ambos tratamentos promoveram lise celular. Q7, Q9, Q7 + ASC e Q9 + ASC reduziram a proliferação de células T24 em torno de 29,7; 3,5; 36,7 e 88,8 %, respectivamente. Além disso, fenilaminonaftoquinonas associadas ao ASC modificaram o número de células presentes na fase G2/M e elevaram a atividade da β -galactosidase ácida, sugerindo que tais tratamentos são capazes de induzir senescência. Os efeitos citotóxico e antiproliferativo promovidos pela associação de fenilaminonaftoquinonas ao ASC envolve modificações na sinalização mediada por MAPKs. Os resultados obtidos permitem sugerir que tanto a associação de fenilaminonaftoquinonas ao ASC, quanto os extratos de

C. sylvestris tratam-se de promissores coadjuvantes na terapêutica do câncer quando administrados juntamente a agentes citotóxicos.

Palavras-chave: Antitumoral. Antiproliferativo. *C. sylvestris*. Fenilaminonaftoquinonas. Ascorbato.

ABSTRACT

The branches and leaves of *Casearia sylvestris* tree has medicinal properties comproved through ethnobotanical surveys reporting plant extracts has being used in traditional therapy as first approaches to several conditions, including cancer. Evidences indicate that quinones antineoplastic effect could be raised up through sodium ascorbate association (ASC). Thus, this study aims to evaluate some mechanisms related to *in vitro* antiproliferative and antitumor effects mediated by *C. sylvestris* ethanol crude extract (EB-EtOH) and fractions, as well mediated only by synthetic phenylaminonaphthoquinones or co-administered with ASC. EB-EtOH and its chloroformic fraction (f-CHCl₃) had casearin C, a clerodane diterpene with chemopreventive activity. Consequently, both extracts showed significant cytotoxicity over MCF-7 cells. Furthermore, using subtoxic concentrations ($\geq IC_{20}$), EB - EtOH and f-CHCl₃ exerted antiproliferative activity on MCF - 7 cells, being able to promote cell cycle arrest in G1 due to increased expression of p53 and p16, as well as reducing CDK2 expression. Additionally, these extracts were still able to increase the γ H2Ax expression. EB-EtOH and f-CHCl₃ had significant *in vivo* antitumor activity throught Ehrlich carcinoma-bearing Balb-c mice model causing reduction in the ratio tumor over bone area about 18 and 40 %, respectively. On the other hand, synthetic phenylaminonaphthoquinone 7 (Q7) and phenylaminonaphthoquinone 9 (Q9) showed selective cytotoxicity for T24 cells, which enhanced in the ASC presence ($IC_{50 Q7} = 27.1$; $IC_{50 Q9} = 44.3$; $IC_{50 Q7 + ASC} = 14.5$; $IC_{50 Q9 + ASC} = 16.9 \mu M$). Take into account that both phenylaminonaphthoquinones (10 μM) isolated or associated with ASC were not able to activate caspase 3 or PARP cleavage, ours results suggest that necrosis occurs instead apoptosis as cell death mechanism possible induced by the ASC association, since both treatments showed cytolytic effect. Q7, Q9, Q7 + ASC and Q9 + ASC reducing cell proliferation about 29.7; 3.5; 36.7 and 88.8%, respectively. Besides, phenylaminonaphthoquinones associated with ASC augment G2 / M phase cells and also increase acid β -galactosidase activity, suggesting senescence induction capability. Moreover, cytotoxic and antiproliferative effects promoted by the ASC association involves changes in MAPK signaling pathways. These results suggest that *C. sylvestris* extracts and the association between phenylaminonaphthoquinones and ASC are promising adjuvants in

cancer therapy and could be administered together with conventional quimioterapic agents.

Key words: Antitumor. Antiproliferative. *C. sylvestris*. Phenylaminonaphthoquinones. Ascorbate.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- Considerações iniciais.....	26
1.INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Câncer: aspectos gerais	26
1.2 Mecanismos de morte celular.....	29
1.3 Ciclo celular	34
1.4 Senescência celular.....	37
1.5 Plantas como fontes de medicamentos quimioterápicos	44
1.6 <i>Casearia sylvestris</i>	45
1.7 Quinonas como agentes quimioterápicos	54
1.8 Fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 como promissores compostos antitumorais.....	57
1.9 Associação de quinonas ao ascorbato de sódio: terapia eficaz eseletiva para o tratamento do câncer.....	59
2. OBJETIVOS.....	62
2.1 Objetivo geral.....	62
2.2 Objetivos específicos	62
CAPÍTULO 2- Estudo da atividade antiproliferativa e antitumoral .	
do extrato bruto e frações de <i>Casearia sylvestris</i>	63
1. MATERIAIS E MÉTODOS	63
1.1 Reagentes e anticorpos.....	63
1.2 Material vegetal.....	63
1.3 Obtenção do extrato bruto e frações de <i>C. sylvestris</i>	63
1.4 Identificação de compostos com ação antitumoral.....	64
1.5 Cultura de células	64
1.6 Animais	64
1.7 Ensaio biológicos.....	65

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
2.1 Identificação de compostos com ação antitumoral.....	73
2.2 Atividade antitumoral do extrato bruto e frações de <i>C. sylvestris</i>	75
CAPÍTULO 3- Estudo da atividade antiproliferativa e antitumoral de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio	97
1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
1.1 Reagentes e anticorpos.....	97
1.2 Síntese das fenilaminonaftoquinonas.....	97
1.3 Cultura de células.....	98
1.3 Ensaios biológicos.....	98
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
2.1 Avaliação da viabilidade celular	106
2.2 Avaliação do tipo de morte celular induzida	110
2.3 Atividade de caspases.....	111
2.4 Clivagem da PARP	111
2.5 Avaliação da atividade antiproliferativa	113
2.6 Avaliação da participação e ativação de MAPKs nos efeitos citotóxico e antiproliferativo induzidos por fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio	126
2.7 Participação do estresse oxidativo nos efeitos citotóxico e antiproliferativo induzido pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio.....	130
CAPÍTULO 4 - Considerações finais.....	138
1. CONCLUSÕES	138
2. PERSPECTIVAS	140

REFERÊNCIAS.....	141
ANEXO A	166
ANEXO B	167
ANEXO C	168

CAPÍTULO 1- Considerações iniciais

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: aspectos gerais

Nas últimas décadas, o câncer ganhou grande dimensão, convertendo-se num evidente problema de saúde pública mundial e sendo considerado a segunda maior causa de mortes no mundo (ESPINA et al, 2013). A Organização Mundial da Saúde estima que, até o ano de 2030, ocorrerão cerca de 17 milhões de óbitos por câncer e cerca de 27 milhões de novos casos da doença (OMS, 2013) Em relação ao Brasil, as estimativas do INCA para os anos de 2012/2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer no país, sendo os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata (60 mil) e de pulmão (17 mil) no sexo masculino e de mama (53 mil) e de colo de útero (18 mil) no sexo feminino (INCA, 2013).

Do ponto de vista clínico, o termo câncer refere-se a um conjunto de mais de cem doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, através de um processo conhecido como metástase (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009; INCA, 2013). Já do ponto de vista bioquímico, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada pelo descontrole do ciclo celular, que resulta em uma perda progressiva dos processos de diferenciação, proliferação e morte (VÁSQUES et al., 2010).

A perda do controle sobre o ciclo e indução de processos de morte celular observados no câncer são decorrentes de mutações (mutações pontuais, rearranjos, deleções, inserções) no DNA. Dependendo do tipo de câncer, o número de tais mutações pode variar de poucas para centenas ou milhares. Atualmente, mais de 100 mil tipos diferentes de mutações somáticas foram encontradas em células malignas (DUFFY, 2013; ZAIDI et al., 2013).

As mutações gênicas associadas ao câncer podem ter origem genética (mutações herdadas) ou serem adquiridas ao longo da vida (mutações adquiridas e/ou externas). Cerca de 80% dos casos de câncer estão relacionadas às mutações adquiridas, ou seja, aquelas associadas

ao meio ambiente (por exemplo, a radiação ionizante e a poluição), hábitos sociais ou culturais do indivíduo (por exemplo, o tabagismo, o alcoolismo, a desnutrição, a excessiva exposição ao sol, tipo de alimentação), bem como a exposição a agentes infecciosos (por exemplo, a virose causada pelo vírus do papiloma humano) e o uso de medicamentos, dentre outros (INCA, 2013). Além disso, tem sido observado que as mutações relacionadas ao processo carcinogênico acometem genes-chave envolvidos no controle da proliferação celular, apoptose e sobrevivência sendo os mesmos classificados como oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais (WOLF; RAMIREZ, 2001; AUDIC; HARTLEY, 2004; PELÚZIO et al., 2006; ZAIDI et al., 2013).

A ocorrência de mutações nesses genes pode ter duas consequências principais: a ativação de proto-oncogenes em oncogenes e a inativação dos genes supressores tumorais (BERTRAM, 2001; RANG et al., 2004). Como os genes supressores de tumor e os proto-oncogenes estão envolvidos em vias reguladoras do ciclo celular, a alteração de um único elemento participante dessas vias de controle pode ser suficiente para interferir na função das mesmas, levando ao descontrole do ciclo celular (KAMB, 1995). Assim, a ocorrência dessas mutações pode acarretar na superexpressão de diversas proteínas, fatores de crescimento e receptores responsáveis pela proliferação celular; pela inativação dos genes envolvidos na parada do ciclo celular e no reparo do DNA; bem como pela falha da ativação de mecanismos de morte celular programada, favorecendo o processo carcinogênico (RAK et al., 1995; MCDONALD; EL-DEIRY, 2000; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005).

Como exemplos de genes mutados em células tumorais, pode-se citar os genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, p16, Ras, família Bcl-2 (Bax, Bid), CDKs, ciclinas, dentre outros (SERRANO et al., 1993; BOGUSKI; MCCORMICK, 1993; REED, 1998; COLMAN; AFSHARI; BARRET, 2000; KAMB, 1995; RANG et al., 2004; OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004). 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, o qual induz a produção da proteína Bcl-2, que atua como bloqueadora do processo apoptótico (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).

O tratamento do câncer é realizado basicamente através de 3 abordagens: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo que o papel, bem como a escolha do tratamento a ser realizado, depende do tipo do tumor, e do seu estágio de desenvolvimento (INCA, 2013). A intervenção cirúrgica associada ou não à radioterapia é indicada nos casos em que o tumor está localizado, ou seja, situações que não envolvem a ocorrência de metástase, onde a radioterapia pode ser efetuada a fim de elevar a eficácia do tratamento (INCA, 2013). Entretanto, quando observa-se o desenvolvimento de micrometástases, o tratamento mais indicado é a quimioterapia, a qual trata-se de uma abordagem terapêutica sistêmica (ENGERS; GABBERT, 2000).

As principais classes de fármacos utilizados na quimioterapia do câncer atualmente incluem: os antimetabólitos, que inibem principalmente a síntese de purinas (ex: mercaptopurina, tioguanina); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxauréia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (ex: cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, etoposídeo); e agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) (RANG et al., 2004; RICHARDSON, 1992). 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).

Nos últimos anos, pesquisas têm avançado no sentido de produzir fármacos que apresentam como alvo específico proteínas derivadas de genes envolvidos no controle do desenvolvimento e progressão tumoral. Pode-se citar como por exemplo, o imatinibe utilizado para o tratamento de leucemia mielóide crônica e que apresenta como alvo a tirosina cinase Bcr-Abl; terapias anti-HER2 (trastuzumabe, pertuzumabe e lapatinibe) utilizadas para o tratamento de câncer de mama; inibidores de tirosina- cinase anti-EGFR (gefitinib e erlotinib) utilizados para o tratamento de câncer de pulmão e agentes anti-BRAF (vemurafenibe e dabrafenibe) usados para tratar melanomas (DUFFY, 2013).

O tratamento do câncer pode envolver ainda a utilização de imunoterápicos. Nesse contexto, a imunoterapia do câncer consiste em utilizar anticorpos e/ou imunotoxinas para rejeitar e/ou destruir o tumor, podendo ser realizada através da imunização do paciente (por intermédio da vacinação do indivíduo), onde nesse caso o sistema imune do mesmo passa a reconhecer células tumorais como alvos para serem

destruídos (PEPPERCORN et al., 2012); ou através da administração de fármacos que têm como alvo proteínas essenciais envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer, possibilitando dessa forma, a destruição e eliminação das células tumorais (NAHTA, 2012).

Por fim, ressalta-se que o tratamento do câncer também é baseado no perfil genético dos tumores. Tal abordagem é utilizada para prever o prognóstico do paciente, bem como para selecionar o tipo de tratamento mais adequado para o mesmo (PATEL et al., 2012).

1.2 Mecanismos de morte celular

1.2.1 Apoptose

Definida por Kerr, Wyllie e Curie (1972), a apoptose trata-se de um fenômeno de morte celular programada caracterizada por diversas alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação dos corpos apoptóticos (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996; EDINGER; THOMPSON, 2004; SU; MEI; SINHA, 2013). Outra característica importante da apoptose refere-se ao fato de que este processo envolve a ativação de endonucleases que clivam o DNA em fragmentos que apresentam o tamanho de 50 a 200 pares de bases. Esta clivagem do DNA mediada pelas endonucleases é conhecida como padrão *laddering* de DNA e pode ser visualizada mediante a realização da corrida eletroforética deste ácido nucleico (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

O processo apoptótico ocorre tanto em situações fisiológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual; quanto em situações patológicas, onde se observa a mutação, superexpressão, supressão/subexpressão de genes que regulam o mesmo. Além disso, a apoptose pode ser considerada como um mecanismo de defesa do organismo, uma vez que protege as células da ação de agentes tóxicos (THATTE; DAHANUKAR, 1997; ISRAELS; ISRAELS, 1999; SU; MEI; SINHA, 2013).

Normalmente a apoptose é desencadeada por cisteíno-proteases denominadas caspases, as quais exercem papel central nesse processo de morte celular, sendo as mesmas ativadas em decorrência de duas vias: a via extrínseca ou citoplasmática e a via intrínseca ou mitocondrial (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; GHOBRIAL, WITZIG, ADJEI, 2005). Tais vias são ativadas por diversos sinais celulares. A via intrínseca inclui sinais intracelulares produzidos em resposta ao estresse celular

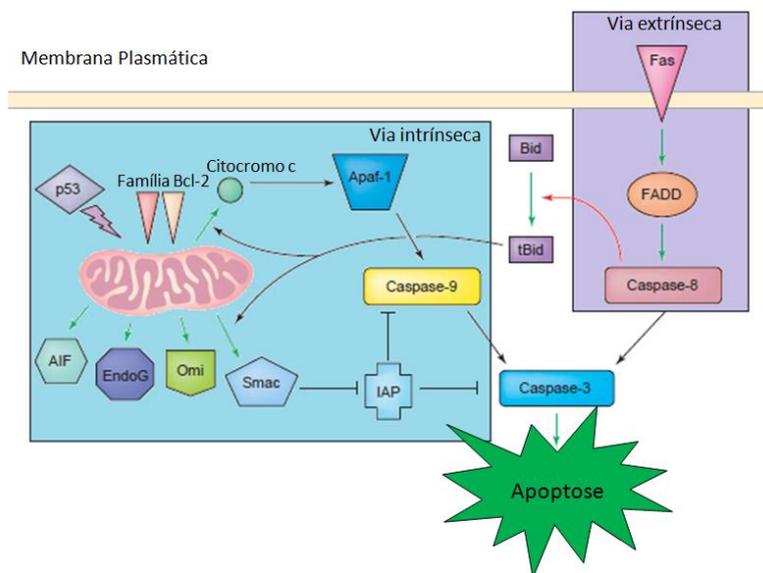
como o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio e hipóxia. Sinais extrínsecos indutores de apoptose incluem: patógenos bacterianos, toxinas, óxido nítrico, fatores de crescimento e hormônios (SU; MEI; SINHA, 2013).

A via extrínseca inicia-se com a ativação dos chamados receptores de morte. Uma vez ativados, esses receptores associam-se a proteínas adaptadoras, as quais por sua vez, conectam-se a pró-caspases iniciadoras (particularmente a pró-caspase 8), ativando-as e levando a formação do complexo indutor de morte (DISC). As caspases iniciadoras promovem a clivagem e a ativação das caspases efetoras (normalmente a caspase 3) induzindo a ocorrência de apoptose. Essa via pode ser regulada pela proteína FLIP (proteína inibidora da enzima conversora de interleucina 1- β associada ao FADD) a qual atua impedindo a formação do DISC e a ativação da pró-caspase 8, uma vez que liga-se às proteínas adaptadoras associadas aos receptores de morte ativados (IGNEY; KRAMMER, 2002; FAVALORO et al., 2012).

Já a via intrínseca envolve a permeabilização mitocondrial, acarretando no extravasamento de proteínas pró-apoptóticas para o citosol, como o citocromo c, SMAC/DIABLO e serina protease HtrA2/Omi. Uma vez no citoplasma, o citocromo c associa-se a Apaf-1, pró-caspase 9 e ao ATP, levando a formação do apoptossomo, desencadeando na ativação da cascata de caspases e induzindo a ocorrência da apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002; GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; MUKHTAR et al, 2012). É relatado que SMAC / DIABLO e HtrA2/Omi auxiliam na promoção da apoptose ao inibirem a atividade de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) (MUKHTAR et al, 2012).

O controle da via intrínseca é realizado por membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), os quais atuam promovendo e inibindo, respectivamente, a formação de poros na membrana mitocondrial, favorecendo ou impedindo a liberação do citocromo c para o citosol e regulando o desencadeamento dessa via (GREEN; REED, 1998; BORNER, 2003). O gene supressor antitumoral p53 atua na regulação da expressão de membros da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bax), entretanto, os exatos mecanismos envolvidos nesse controle não estão completamente elucidados (MUKHTAR et al, 2012). Ainda em relação ao controle do processo apoptótico, proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) e a survivina previnem a ocorrência desse processo ao inibirem as caspases 9 e 3 (JENDROSSEK, 2012).

Figura 1- As duas principais vias apoptóticas.



As vias intrínseca e extrínseca são ativadas em resposta a estímulos apoptóticos internos e externos, respectivamente. A mitocôndria contém diversas proteínas pró-apoptóticas que exercem papéis fundamentais na apoptose. O desencadeamento da via intrínseca leva à liberação de citocromo c e Smac no citoplasma. O citocromo c liga-se diretamente e ativa Apaf-1, o qual promove a ativação de caspase-9 e consequentemente ativação da caspase-3. Já Smac associa-se a proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) evitando a inibição das caspases 9 e 3. O desencadeamento da via extrínseca leva à ativação de caspase-8, a qual ativa a caspase executora 3. Assim, ambas as vias convergem na ativação da caspase-3. A ativação da via extrínseca pode desencadear a via intrínseca através da clivagem do Bid (tBid) mediada pela caspase 8. Truncado tBid por sua vez, induz a liberação de proteínas mitocondriais e a ocorrência da via intrínseca. Outras proteínas, tais como o fator indutor de apoptose (AIF), Endo G e Omi (também conhecido como HtrA2), também são liberados da mitocôndria para o citoplasma com o intuito de facilitar a morte celular durante a apoptose. Fonte: Adaptado de SHIOZAKI; SHI, 2004.

As vias intrínseca e extrínseca não são completamente independentes: em algumas células a ativação da caspase 8 resulta no desencadeamento da via mitocondrial. Neste caso, a caspase 8 cliva a proteína Bid, gerando um fragmento (tBid) que pode permeabilizar a mitocôndria e levar a ativação da via intrínseca (FAVALORO et al., 2012).

Como mencionado anteriormente, o desencadeamento da via intrínseca e extrínseca leva a ativação de caspases executoras, as quais

por sua vez, atuam ativando endonucleases e proteases, mediando a clivagem de diversos substratos (citoqueratina, PARP, proteína alfa fodrina, proteína nuclear NuMA) e levando às alterações morfológicas e bioquímicas características do processo apoptótico (MUKHTAR et al, 2012).

Cabe ressaltar que a apoptose pode ser ativada por um mecanismo independente de caspase, o qual ocorre quando as células, por determinados motivos, não conseguem promover a ativação dessas cisteíno-proteases. Este processo envolve a permeabilização da mitocôndria através da ocorrência da via intrínseca, a qual culmina na ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 e na formação de poros mitocondriais; bem como através da ocorrência da via extrínseca, onde a caspase 8 pode atuar promovendo a clivagem de Bid, sua ativação, e conseqüentemente a oligomerização de Bax e Bak na membrana mitocondrial, acarretando na permeabilização da mitocôndria. Em ambos os casos, ocorrerá a liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G (endo G), do espaço mitocondrial para o citoplasma (CHIPUK; GREEN, 2005). Uma vez no citosol, AIF e endo G podem se translocar para o núcleo, interagir com outros fatores e desencadear a fragmentação do DNA (FANG et al., 2010). A fragmentação do DNA promovida pela ação de AIF ocorre em larga escala, ou seja, não se apresenta na forma de *laddering*, que se trata do perfil de fragmentação característico de apoptose (PARONE; JAMES; MARTINOU, 2002; CHIPUK; GREEN, 2005). Além disso, a morte promovida por AIF pode estar associada ao fato dessa flavoenzima participar da regulação da fosforilação oxidativa, onde a diminuição da concentração intramitocondrial da mesma está vinculada a redução da formação e da atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, prejudicando a síntese de ATP (CHIPUK; GREEN, 2005).

1.2.2 Necrose

A necrose, também conhecida como morte celular passiva, trata-se de um processo de morte celular traumático, podendo ser ou não regulado (OKADA; MAK, 2004; EDINGER; THOMPSON, 2004; GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011). Morfologicamente, é caracterizada por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo para o espaço extracelular, levando a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e morte

de células vizinhas. Nesta condição, um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo, e devido ao desencadeamento do processo inflamatório ocorrem alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ANAZETTI; MELO, 2007; HENRIQUEZ et al., 2008).

A necrose usualmente ocorre em consequência de condições fisiopatológicas como infecção, inflamação e isquemia, podendo ainda ser decorrente da exposição a agentes térmicos, químicos ou condições que levam a anóxia (OKADA; MAK, 2004; MCHUGH; TURINA, 2006). Dentre as várias patologias associadas à morte celular por necrose, pode-se citar: zigomicose, cirrose hepática, doenças neoplásicas, distúrbios neurodegenerativos, isquemia neuronal, distrofia muscular, diabetes, dentre outras (HENRY, 1999; McCALL, 2010). O trauma resultante causa extensivas falhas em vias fisiológicas normais, que contribuem para a manutenção da homeostasia celular, como regulação do transporte iônico, produção energética e balanço de pH (OKADA; MAK, 2004).

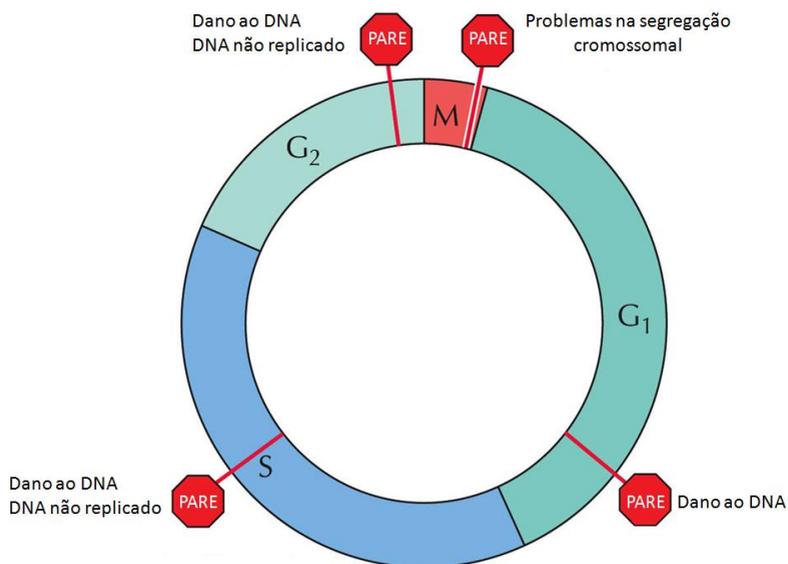
Evidências crescentes sugerem que genes específicos evoluíram para regular a morte celular por necrose. Estudos genéticos identificaram o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), os receptores de interação proteína-cinase 1 e 3 (RIPK1 e RIPK3) e o receptor associado ao fator-2 (TRAF2), como reguladores essenciais da morte celular necrótica induzida pela ativação de receptores de morte (AMARAVADI; THOMPSON, 2007; GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011). Tem sido demonstrado que a ligação do fator de necrose tumoral ao seu respectivo receptor, é capaz de promover a ativação do complexo RIPK1/RIPK3, levando à indução da necrose (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011; HAN; ZHONG; ZHANG, 2011). Outros estímulos que podem induzir necroptose (necrose regulada) via ativação do complexo RIPK1/RIPK3, tratam-se da ativação dos receptores de morte Fas e TRAIL, estresse genotóxico, bem como a presença de patógenos (HAN; ZHONG; ZHANG, 2011; OUYANG et al., 2012). Os mecanismos moleculares envolvidos na necrose associada à ativação de RIPK1/RIPK3 ainda não foram totalmente elucidados, embora tenha sido sugerido que RIPK3 possa desencadear uma catástrofe bioenergética pela hiperativação de várias enzimas envolvidas na glicogenólise e glutaminólise (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011; OUYANG et al., 2012). Além disso, tem sido observado que RIPK3 pode elevar a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), através da indução da atividade da NADPH oxidase, desencadeando necrose (OUYANG et al., 2012).

Outro mediador chave do processo necrótico trata-se da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), uma proteína nuclear cuja ativação por danos no DNA leva à depleção dos níveis intracelulares de NAD^+ , (o cofator essencial para a glicólise aeróbica), e à redução drástica do conteúdo intracelular de ATP, induzindo a morte celular por necrose. A crise bioenergética que ocorre com a depleção aguda de NAD^+ e de ATP em células glicolíticas está associada com o acúmulo de elevadas concentrações intracelulares de cálcio e espécies reativas do oxigênio, que por sua vez, cooperam para ativar proteases calpaínas citosólicas dependentes de Ca^{2+} . Calpaínas ativadas decompõe canais de extrusão de Ca^{2+} e permeabilizam lisossomos, proporcionando o extravasamento de catepsinas. Altas concentrações intracelulares de cálcio e de espécies reativas do oxigênio podem também ativar a fosfolipase A2. Posteriormente ocorrem proteólise e peroxidação lipídica, levando a permeabilização generalizada da membrana e morte celular irreversível por necrose (AMARAVADI; THOMPSON, 2007).

1.3 Ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de eventos organizados e monitorados, responsável pela divisão celular. É um processo que exige uma alta demanda energética e que abrange uma série ordenada de eventos para garantir a duplicação e segregação corretas do genoma (DIAZ-MORALLI et al., 2013). Este ciclo compreende quatro fases sequenciais: Gap1 (G1), síntese (S), Gap 2 (G2) e mitose (M). Indiscutivelmente as fases mais importantes desse processo, tratam-se da fase S, caracterizada pela ocorrência da replicação do DNA, e da fase M, período no qual ocorre a segregação dos cromossomos e a citocinese. As fases S e M são separadas pelas duas fases Gap. G1 ocorre após a mitose e trata-se de uma fase em que a célula responde a estímulos emitidos por vias de sinalização relacionadas ao crescimento celular. Já G2 refere-se ao período posterior a fase S, no qual a célula prepara-se para a entrada em mitose. Além disso, a ocorrência desta fase permite a reparação de erros que podem eventualmente terem ocorrido durante a duplicação do DNA. Por fim, G0 representa um estado em que as células mantêm-se quiescentes, ou seja, período no qual as células não se dividem em resposta a uma elevada densidade celular ou à privação de fatores mitógenos (DE FALCO; DE LUCA, 2010; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Figura 2 - *Checkpoints* envolvidos na progressão do ciclo celular.



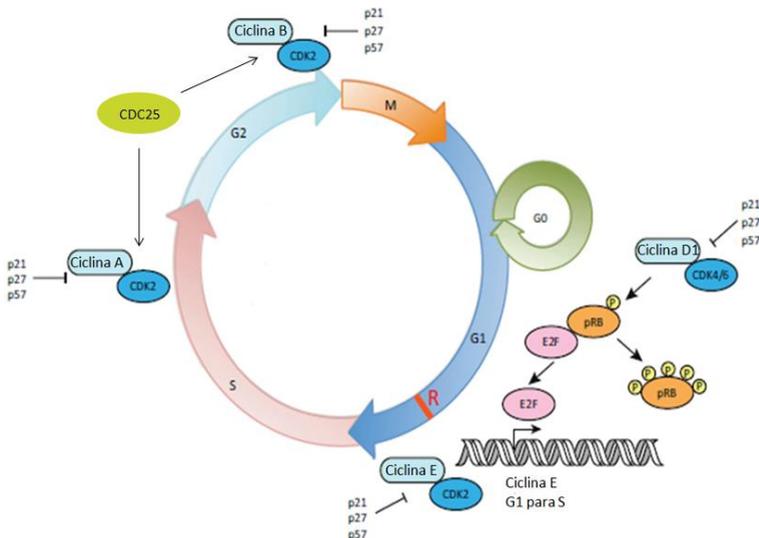
O primeiro *checkpoint* (checkpoint em G₁) avalia a integridade do DNA, bem como tamanho e ambiente celular. O segundo e terceiro *checkpoints*, os quais ocorrem na fase S e G₂, respectivamente, verificam a fidelidade da replicação e integridade do DNA. Por fim, o quarto e último *checkpoint*, também chamado de *checkpoint* mitótico, além de avaliar a integridade do DNA, garante a correta segregação dos cromossomos e a estabilidade genética. Fonte: Adaptado de ALBERTS et al, 2004.

A progressão por cada fase do ciclo celular e a transição a partir de uma fase para a seguinte, são monitoradas por mecanismos sensores, chamados *checkpoints* ou pontos de verificação, os quais mantêm a ordem correta dos eventos e assim, asseguram a fidelidade da replicação e segregação cromossomal (WILLIAMS; STOEBER, 2012; DIAZ-MORALLI et al., 2013). Há três tipos de *checkpoints* descritos: *checkpoint* de dano ao DNA, que ocorre nas 4 fases do ciclo; *checkpoint* de replicação, o qual monitora a progressão pela fase S e assegura a ocorrência da duplicação correta do DNA; e *checkpoint* do fuso mitótico, que ocorre durante a fase M e monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos, a fim de garantir a segregação idêntica do DNA entre as células-filha e a estabilidade genética (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Se os mecanismos sensores detectarem eventos do ciclo celular aberrantes ou incompletos (por exemplo, danos no DNA), as vias de *checkpoint* emitem sinais para

proteínas efetoras, podendo provocar a parada ou bloqueio do ciclo celular até que o problema seja resolvido, ou então, se o reparo não for bem sucedido, as células são conduzidas à senescência ou apoptose (WILLIAMS; STOEBER, 2012; DIAZ-MORALLI et al., 2013).

As proteínas efetoras incluem os inibidores de CDKs (CDKIs), que podem conter de forma reversível, a progressão do ciclo celular (WILLIAMS; STOEBER, 2012). Há duas famílias de CDKIs: a família INK4 (p16^{ink4a}, p15^{INK4b}, p18^{ink4c}, p19^{ink4d}) que inibem a CDK4 e CDK6 e a família Cip / Kip (p21^{WAF1}, p27^{Kip1} e p57^{kip2}) que suprimem a atividade de CDK2 (DE FALCO; DE LUCA, 2010; WILLIAMS; STOEBER, 2012). Outra importante proteína envolvida no controle do ciclo celular trata-se da proteína supressora tumoral p53, a qual atua principalmente no *checkpoint* G1/S, em resposta à mediação de dano ao DNA. Nesse caso, p53 estimula a transcrição de p21, o qual atua inibindo a atividade de CDK e promovendo o bloqueio do ciclo celular em G1, evitando dessa forma, a replicação de DNA não intacto (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Figura 3 - Proteínas envolvidas no controle da progressão do ciclo celular.



O ciclo inicia-se com a ativação dos complexos ciclina D-Cdk4 e/ou ciclina D-Cdk6, os quais atuam inativando parcialmente pRb para liberar seus efeitos inibitórios sobre E2F, favorecendo a transcrição de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (ciclina E e A) e fazendo com que as células saiam da quiescência (G0) e entrem na fase G1 do ciclo celular. O aumento dos níveis dos complexos ciclina D-Cdk4 e/ou ciclina D-Cdk6 favorecem a passagem das células pelo checkpoint em G1 (denominado como R), uma vez que promovem a inibição de

p27, liberando CDK2 e facilitando a ativação de complexos ciclina E-CDK2, os quais por sua vez, promovem a hiperfosforilação de pRb. A ativação de E2F conduz à transcrição de ciclina E, c-Myc (inibe a atividade de p21 e p27) e de outros genes fundamentais para a síntese de DNA, promovendo a elevação dos níveis de complexos ciclina E-CDK2 e a transição da fase G1 para a fase S. A subsequente expressão da ciclina A e ciclina B leva a transição de S para G2 e G2 para fase M, respectivamente. A fosfatase CDC25, atua ao remover a fosforilação inibitória sobre Cdk1 e Cdk2, ativando os complexos ciclina A-Cdk1, ciclina B-Cdk1 e ciclina E-Cdk2 e conduzindo a entrada na fase M. Inibidores de CDKs (CDKIs) como p21, p27 e p57 sequestram CDKs e bloqueiam sua atividade de quinase. Fonte: Adaptado de CHIU; DAWES, 2012.

A progressão do ciclo celular é controlada por duas classes de proteínas: cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas. Essas proteínas interagem entre si, formando um complexo CDK-ciclina, cuja ativação desencadeia na progressão do ciclo celular. A degradação das ciclinas inativa este complexo (COLLINS; GARRET, 2005). A progressão em G1 e a transição para a fase S é controlada pelos complexos CDK4-ciclina D, CDK6- ciclina D e CDK2- ciclina E. A transição de G1 para S também é mediada parcialmente pela fosforilação do retinoblastoma (Rb - proteína supressora de tumor), o que permite a transcrição de genes dependentes do fator de transcrição E2F e a transição G1/S (DURONIO; XIONG, 2013). A transição da fase S para G2 é realizada pelo complexo CDK2-ciclina A. Já o complexo CDK1-ciclina B regula a progressão de G2 para M (WILLIAMS; STOEBER, 2012). Finalmente, a fim de sair da mitose, é necessária a inativação do complexo CDK1/ciclina B. Esta inativação é promovida pela degradação da ciclina B via ubiquitinação mediada pelo complexo promotor de anáfase (APC), uma ubiquitina-ligase E3, que controla a destruição de vários reguladores importantes ubiquitino-dependentes. A atividade contínua de CDK1 durante os últimos estágios da mitose impede a citocinese e provoca regressão mitótica, assim a inativação de CDK1 é absolutamente necessária nesta fase (DE FALCO; DE LUCA, 2010).

1.4 Senescência celular

O termo senescência celular foi primeiramente descrito por Hayflick e Moorhead (1961) e trata-se de uma resposta celular ao estresse, na qual se observa o bloqueio irreversível da proliferação celular associado à perda da habilidade das células retornarem ao ciclo celular (RAMAKRISHNA et al., 2012; GU et al., 2013). Assim como a apoptose, a senescência pode ser causada por vários tipos de estímulos: disfunção e encurtamento dos telômeros, dano ao DNA, perturbações na cromatina, estresse oxidativo, radiação UV, condições inadequadas de

cultivo celular (como por exemplo, depleção de nutrientes e de fatores de crescimento), ação de fármacos quimioterápicos (exemplo doxorubicina, cisplatina, taxol, vincristina), ativação de oncogenes, estímulos mitóticos intensos e persistentes, dentre outros (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; COLLADO; SERRANO, 2006; CAMPISI; FAGAGNA, 2007).

Em razão de suas causas, a senescência pode ser classificada em dois tipos: senescência replicativa, a qual está relacionada ao encurtamento/disfunção dos telômeros; e senescência prematura, a qual refere-se a senescência induzida por outros tipos de estresse, que não envolvem dano aos telômeros. A senescência prematura inclui ainda a senescência induzida pela superexpressão de oncogenes, bem como a senescência induzida pela perda de supressores tumorais (como por exemplo, PTEN) (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; MARUYAMA et al., 2009; COLLADO; SERRANO, 2010; NARDELLA et al., 2011; CAMPISI, 2013).

Células senescentes, ao contrário de apoptóticas, permanecem viáveis, metabolicamente ativas e apresentam características morfológicas típicas: tratam-se de células grandes (aumento do tamanho do núcleo e citoplasma), achatadas e vacuolizadas (CHIANTORE et al., 2009; MARUYAMA et al., 2009; GU et al., 2013). Essas células também têm a tendência de agregar proteínas no retículo endoplasmático, apresentar mitocôndrias alargadas e funcionalmente defeituosas, bem como lisossomos não funcionais (RAYESS; WANG; SRIVATSAN, 2012).

Além disso, normalmente apresentam uma alta expressão e atividade da β -galactosidase ácida (senescência associada à β -galactosidase), podendo ainda secretar diversas proteínas como citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas em um processo conhecido como senescência associada ao fenótipo secretório (SASP), o qual contribui para o desenvolvimento de inflamação crônica observada em diversos organismos durante o envelhecimento (COLLADO; SERRANO, 2010; KUILMAN et al., 2010; GU et al., 2013). Por fim, cabe ressaltar que células senescentes são resistentes a apoptose, bem como podem apresentar alterações epigenéticas que resultam na formação de heterocromatina em diferentes *loci* pelo genoma, processo este chamado de senescência associada à heterocromatina (COLLADO; SERRANO, 2010; KUILMAN et al., 2010; CAMPISI, 2011).

Como mencionado anteriormente, outra característica importante das células senescentes, refere-se ao fato de que geralmente, a perda da habilidade das células se proliferarem, está associada ao bloqueio do ciclo celular, bem como a alterações na expressão de

proteínas chave que atuam no controle da progressão do mesmo (CAMPISI; FAGAGNA, 2007). Assim, proteínas que atuam na regulação do ciclo celular, também estão envolvidas no controle do processo de senescência. Nesse sentido, duas proteínas chave (que também tratam-se de supressores tumorais) regulam este processo: p53 e pRb (CAMPISI, 2005; CHIANTORE et al., 2009; MARUYAMA et al., 2009). Estas duas vias de sinalização interagem entre si, em diversos pontos, e cooperam para controlar a transcrição de inúmeros genes necessários para indução da senescência celular (MARUYAMA et al., 2009).

A via do p53 é acionada quando ocorre dano ao DNA, o qual pode ser decorrente do encurtamento/disfunção de telômeros ou da ação direta de outros agentes, como por exemplo EROs e quimioterápicos (MARUYAMA et al., 2009). A indução de dano ao DNA leva a ativação das quinases ATM/ATR e CHK1/2, culminando então, na fosforilação e ativação de p53. Uma vez ativada, p53 exerce sua função transcripcional e induz a expressão de p21. Este último trata-se de um inibidor de quinase dependente de ciclina, o qual bloqueia a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S ao inibir principalmente, a formação do complexo ciclina E-quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), prevenindo a fosforilação de pRb, a ativação do fator de transcrição E2F e a passagem para a fase S do ciclo celular (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; MARUYAMA et al., 2009).

A ativação de oncogenes como *Ras* e *Myc*, também pode levar a indução de senescência celular através da estabilização de p53. Nesse caso, oncogenes induzem a transcrição de p19^{ARF}, a qual por sua vez associa-se à ubiquitina E3 ligase Mdm 2, sequestrando a mesma, e impedindo a degradação proteossomal de p53 (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005). A via do pRb pode ser ativada mediante acionamento de p53/p21^{CIP1} (como mencionado anteriormente), ou via dependente de p16^{INK4a}. Estudos apontam que o p16^{INK4a} pode mediar tanto senescência prematura, quanto senescência replicativa, uma vez que sua expressão é induzida por diversos estímulos como dano ao DNA, superexpressão de oncogenes e condições subótimas de cultivo (ex. deficiência de nutrientes e fatores de crescimento). p16^{INK4a} é um inibidor das quinases dependente de ciclina D CDK4 e CDK6, e atua prevenindo a hiperfosforilação de pRb (pela ação das CDKs) e sua inativação. Uma vez ativo e em sua forma hipofosforilada, pRb se associa a proteína E2F e reprime a sua atividade transcripcional, bem como a progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; MARUYAMA et al., 2009).

Em relação a seus efetores *upstream*, as vias do p53/p21, bem como do p16/pRb podem ser ativadas por MAPKs (CHIANTORE *et al.*, 2009). As MAPKs mais envolvidas na senescência tratam-se das chamadas quinases ativadas por estresse: JNK e p38. Tais MAPKs respondem a diversos estresses celulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias, dano ao DNA, radiação UV, EROs, choque osmóticos, dentre outros. Entretanto, o envolvimento das MAPKs na indução de senescência, depende do tipo e do contexto celular, visto que diferentes tipos celulares respondem ao mesmo estresse de maneiras diferentes, e que diferentes tipos de estresse são capazes de ativar diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo de células (ARIVAZHAGAN; AYUSAWA, 2007; MARUYAMA *et al.*, 2009).

Em relação à via da p38 na indução de senescência, diversos trabalhos têm sugerido que esta via está envolvida no controle negativo da progressão do ciclo celular, bem como apresenta um papel central na indução de senescência prematura e replicativa. Tem sido demonstrado que p38 pode elevar a expressão de p16^{INK4a}, através de mecanismos desconhecidos, e dessa forma, inibir a atividade de CDKs, a hiperfosforilação de pRb e a progressão do ciclo celular. Além disso, p38 pode atuar ativando p53, ao promover a fosforilação da Ser 33 e Ser 46 desse fator de transcrição, o que implica em uma maior expressão de p21^{CIP1}, bloqueio do ciclo celular e indução de senescência (MARUYAMA *et al.*, 2009).

Já o papel da via mediada pela JNK na senescência é bastante controverso, existindo relatos que apontam que a ativação de JNK é capaz de suprimir a senescência celular dependente de p53, enquanto outros afirmam que a ativação de JNK é capaz de modular positivamente a ocorrência de senescência replicativa e prematura (HÜTTER *et al.*, 2002 ; MARUYAMA *et al.*, 2009; DASGUPTA *et al.*, 2010). JNK por sua vez, atua fosforilando diversos fatores de transcrição das famílias ATF e Jun, o que acarreta em mudanças na expressão gênica celular. Entretanto é necessária a realização de novos estudos para elucidar o papel dos genes alvo de JNK na indução de senescência (DASGUPTA *et al.*, 2010).

Ainda em relação a seus efetores *upstream*, há relatos de que a via p53/p21 pode ser acionada em decorrência da ativação de PI3K/AKT. Chen *et al* (2005) verificaram que a ativação de PI3K/AKT (desencadeada pela perda de PTEN), resultou na indução de senescência *in vivo* dependente de p53. Já Astle *et al* (2012) demonstraram o envolvimento da via PI3K/AKT na indução de senescência independente de Ras, onde a AKT estaria atuando de duas formas: ao

promover a estabilização de p53 via sequestro de MDM2, bem como ao promover a ativação de mTORC 1, o qual por sua vez, atuaria aumentando a transcrição e síntese de p53.

1.4.1 Senescência como mecanismo antitumoral

Diversas evidências mostram que a senescência pode ser considerada um mecanismo antitumoral. A primeira evidência a ser citada, refere-se ao processo senescente em si, o qual, ao limitar a capacidade proliferativa das células através da indução permanente do bloqueio do ciclo celular, previne o acúmulo de mutações necessárias para a ocorrência da carcinogênese (CHIANTORE et al., 2009; LEE; UM; KIM, 2013). Outra importante evidência relaciona-se ao fato de que, a presença de mutações nas vias de indução da senescência, ou seja, nas vias do p53 e pRb, aumentam substancialmente a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer por parte de cobaias e humanos (CAMPISI, 2011).

Ainda nesse contexto, tem se observado o acúmulo de células senescentes em estágios pré-malignos do desenvolvimento de tumor em diversos modelos experimentais tumorais, bem como em lesões pré-malignas de pacientes humanos. Em contraste, a presença de células senescentes em tumores decorrentes dessas lesões pré-malignas, é rara, o que indica mais uma vez, que a senescência pode ser considerada uma barreira contra o câncer (COLLADO; SERRANO, 2010; CAMPISI, 2011; PAN et al., 2012). Entretanto, em relação à sinalização relacionada à indução de senescência, foi demonstrado que a mesma está ativada tanto em lesões pré-malignas, bem como em estágios mais avançados da doença, além de ter sido restaurada em um modelo bem estabelecido de carcinoma de fígado. Esses dados confirmam o papel supressor tumoral da senescência, e sugerem que a ativação deste processo ocorre, mesmo em níveis limiares, durante a tumorigênese (CAIRNEY et al., 2012).

Além disso, a supressão da resposta senescente (como por exemplo, através da inativação de p53) acelera marcadamente o desenvolvimento de tumores malignos a partir de lesões pré-malignas (CAMPISI, 2011).

Adicionalmente, agentes quimioterápicos genotóxicos (normalmente administrados em concentrações subletais) e radiação ionizante induzem senescência em alguns tipos de células tumorais, estando essa senescência associada com a paralisação do crescimento e eventual regressão tumoral (COLLADO; SERRANO, 2010; CAMPISI, 2011; PAN et al., 2012; CAIRNEY et al., 2012; ACOSTA; GIL, 2012).

Por fim, cabe-se ressaltar que alguns fatores secretados pelas células durante a SASP, como as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, bem como as proteínas apoptóticas IGFBP-7 e PAI-1, podem contribuir para supressão do crescimento tumoral observado na senescência. Nesse caso, os componentes da SASP atuam na indução do bloqueio do crescimento, e não na manutenção da paralisação devidamente estabelecida (CAMPISI, 2011; CAMPISI, 2013). Outra particularidade interessante relacionada à SASP, refere-se ao fato de ocorrer nesse processo, a ativação de células do sistema imune como células natural killer, linfócitos T e macrófagos. Têm-se observado que ativação do sistema imune durante a SASP apresenta duas funções: matar e remover células senescentes, bem como eliminar células que estejam superexpressando oncogenes, incluindo-se aqui células que adquiriram fenótipo senescente pela ação desses oncogenes e células transformadas que superexpressam os mesmos, as quais escaparam da indução de senescência. Assim, além de suprimirem a tumorigênese pelo bloqueio da proliferação celular, células senescentes podem evitar e/ou regredir a expansão tumoral através da estimulação do sistema imune de células pré-malignas e malignas (CAIRNEY et al., 2012).

1.4.2 Senescência e estresse oxidativo

O estresse oxidativo exerce um importante papel na indução de senescência celular. Tem sido demonstrado que o acúmulo intracelular de EROs, decorrente do aumento da pressão parcial do oxigênio, do tratamento com H₂O₂ ou da inibição de enzimas antioxidantes (como por exemplo a SOD); é capaz de induzir senescência prematura em fibroblatos humanos. Além disso, foi observado que, altos níveis intracelulares de EROs, são capazes de induzir senescência associada ao encurtamento dos telômeros e inativação da telomerase, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na promoção de senescência replicativa (HÜTTER et al., 2002; BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; SHEN et al., 2013). Já Armeni et al (2012) demonstraram que EROs podem atuar mediando a senescência associada a expressão de oncogenes, uma vez que verificaram que a redução de defesas antioxidantes, a depleção de GSH, bem como modificações pós traducionais (S-glutationação) de proteínas envolvidas no controle do ciclo e morte celular (ex. ATP sintase), contribuem para a indução do bloqueio do ciclo celular e uma alta atividade da β -galactosidase ácida observadas em fibroblastos humanos transfectados com H-Ras V12.

Por fim, outra evidência que demonstra que a resposta senescente pode ser ativada por estresse oxidativo, refere-se ao fato de que o tratamento de fibroblastos humanos com H_2O_2 foi capaz de promover o bloqueio do ciclo celular, aumentar a atividade da β -galactosidase ácida, bem como induzir o aparecimento de outras características típicas do fenótipo senescente (HÜTTER et al., 2002).

Uma das justificativas para que EROs sejam passíveis de induzir senescência celular, trata-se do fato dessas espécies reativas serem capazes de promover dano ao DNA (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; CAMPISI, 2013). Outra justificativa que pode ser apontada, refere-se ao fato de que EROs podem atuar como segundo mensageiros regulando algumas vias de sinalização (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005). Em relação à sinalização envolvida na indução de senescência, tem sido sugerido que o estresse oxidativo pode atuar promovendo a ativação da via do p53/p21, bem como da via do pRb/p16 (HÜTTER et al., 2002; BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; CHOI et al., 2012). Gambino et al (2013) verificaram que o estresse oxidativo pode promover senescência celular através da indução de uma resposta transcricional específica de p53, mediada pela ativação de p66 e p44/p53.

Estudos realizados com fibroblastos embrionários de ratos (MEFS) demonstram que um dos efetores upstream envolvido na senescência mediada por p53 e induzida por EROS, trata-se de p19^{ARF}. Já as MAPKs induzidas por estresse (nesse caso por estresse oxidativo), particularmente a MAPK p38, parecem estar envolvida na ativação de p16 (HÜTTER et al., 2002; BEN-PORATH; WEINBERG, 2005, LI et al, 2013a). A via da p38 MAPK também pode ser ativada em decorrência do acionamento da via Raf1-MEK-ERK. Sugere-se nesse caso, que a superexpressão de Ras induziu a ativação de MEK-ERK em um processo dependente do acúmulo intracelular de EROs, as quais por sua vez, atuaram promovendo a ativação de p38 MAPK e induzindo senescência celular (MARUYAMA et al., 2009).

Estudos mais recentes têm revelado ainda que o estresse oxidativo é capaz de induzir senescência ao promover o acúmulo de laminina B1 e consequente alteração da forma nuclear. Foi reportado ainda que este acúmulo de laminina B1 ocorre em um processo independente de ATM, sendo mediado pela MAPK p38 (BARASCU et al., 2012).

Outro trabalho particularmente interessante reportou que o estresse oxidativo é capaz de promover senescência celular ao induzir a expressão HtrA1, uma serina protease que é subexpressa em diversos tipos de câncer, particularmente em sítios metastáticos, e que atua na

degradação de proteínas da matriz extracelular como a fibronectina. Nesse estudo, foi demonstrado também que a senescência induzida pela superexpressão de HtrA1 é mediada pela ativação da p38 MAPK (VIERKOTTEN; MUETHER; FAUSER, 2011; SUPANJI et al., 2013).

Finalmente, Chularojmontri; Gerdprasert; Wattanapitayakul (2013) demonstraram que o extrato do fruto de toranja, devido ao seu alto poder antioxidante, é capaz de reverter a senescência relacionada à cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, uma vez que o mecanismo de cardiotoxicidade associado a utilização deste fármaco envolve a geração de EROs via ciclo redox entre essa antraquinona e NADPH redutases.

1.5 Plantas como fontes de medicamentos quimioterápicos

Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades humanas. Grande parte dos medicamentos encontrados no mercado é derivada direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, observa-se que 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos, ao passo que 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais. Portanto, mais da metade dos novos medicamentos lançados no referido período são derivados de produtos naturais, mostrando que essa fonte é muito importante nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos (BRANDÃO, 2010).

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). Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida também como Vinca, que é utilizada pela população de Madagascar no tratamento de diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário

e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil. Outra descoberta importante na área de câncer foi a das substâncias presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, tais como *P. peltatum* e *P. emodii*, utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica, foram obtidos o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução desses na terapia do câncer. Estas descobertas encorajaram o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) a realizar o programa de *screening*, para agentes antitumorais, com vegetais. Entre 1960 e 1982 foram avaliadas 35.000 amostras vegetais. O resultado mais importante foi a descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt.) em 1971. Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (BRANDÃO, 2010).

Apesar de várias substâncias naturais com importância terapêutica terem sido isoladas das plantas da flora brasileira, as investigações científicas relacionadas aos estudos fitoquímicos, bioquímicos e farmacológicos destas plantas com atividade antitumoral ainda estão aquém do potencial de nossa flora (BLOCK et al., 1998). Poucos também são os estudos etnofarmacológicos e relatos científicos a respeito de plantas medicinais nativas do Brasil de uso popular no tratamento de tumores (FERREIRA et al., 2012). Nesse sentido, o Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), vem tentando ao longo dos anos, validar o potencial antitumoral de plantas medicinais popularmente utilizadas no Brasil para este fim. Até o presente momento, nosso grupo de pesquisa já comprovou a atividade antitumoral de quatro plantas inseridas nessas condições, ou seja, pertencentes à flora brasileira e popularmente utilizadas para o tratamento de câncer: *Bidens pilosa* (KVIECINSKI et al., 2008; KVIECINSKI et al., 2011); *Croton celtidifolius* (BISCARO et al., 2013); *Cordia verbenaceae* (PARISOTTO et al., 2012) e *Casearia sylvestris* (FELIPE, 2010; FALCÃO-BUCKER, 2012).

1.6 *Casearia sylvestris*

Casearia sylvestris Swartz (Salicaceae) (Figura 4), trata-se de uma espécie vegetal muito comum nas Américas. No Brasil, é amplamente distribuída por todo território nacional, desde o Estado do Amazonas (região do rio Tapajós) até o Estado do Rio Grande do Sul

(FERREIRA et al., 2011), sendo popularmente conhecida no nosso pelo nome de guaçatonga (FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2011).

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 (FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2011).

Figura 4 - *Casearia sylvestris* Swart. (A) Árvore de *C. sylvestris* (B) Inflorescência de *C. sylvestris* (C) Frutos de *C. sylvestris* (D) Folhas de *C. sylvestris*.



Fonte: BLANCO, 2009 *apud* FERREIRA, 2006.

Algumas aplicações populares de *C. sylvestris* incluem o uso da planta como agente antisséptico, anestésico local, cicatrizante, antitérmico, antitumoral, anti-ulcerativo, antiofídico, 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 et al, 2005). Muitos desses usos populares já foram corroborados pela comunidade científica, estando as principais propriedades farmacológicas de extratos e compostos isolados de *C. sylvestris* descritos na Tabela 1.

Além disso, como mencionado anteriormente, uma das linhas de pesquisa do nosso grupo tem como objetivo validar o potencial antitumoral de plantas medicinais popularmente utilizadas no Brasil para o tratamento de câncer. Dentre as plantas estudadas pelo grupo encontra-se a *C. sylvestris*. Até o presente momento, os resultados obtidos acerca de tal investigação demonstraram que o extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* apresentaram importante efeito citotóxico e antiproliferativo sobre células do carcinoma ascítico de Ehrlich cultivadas *in vitro* (FELIPE, 2010). Já Falcão-Bucker (2012) mostrou a citotoxicidade do extrato supercrítico da planta sobre células MCF-7 e T24. Além disso, foi verificado que extrato bruto, fração clorofórmica e extrato supercrítico de *C. sylvestris* exercem significativo efeito antitumoral *in vivo*, sendo capazes de reduzir o tamanho do tumor, ao terem promovido a melhora (redução) de parâmetros histocitológicos (proporção de células inviáveis/viáveis, volume de líquido ascítico e de células compactadas) e morfofisiológicos (variação de peso e de circunferência abdominal), bem como elevar a sobrevivência de camundongos isogênicos Balb-C inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (FELIPE, 2010; FALCÃO-BUCKER, 2012).

Tabela 1 - Atividades Biológicas de diferentes partes de *Casearia sylvestris*

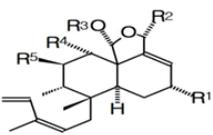
Parte da planta	Atividade Biológica	Extrato, composto, preparação	Referências
Folhas	Antitumoral	Extrato Etanólico, Casearinas (A-F) Derivados do Ácido Gálico	Itokawa et al (1988, 1990) da Silva; Chaar; Yano (2009)
	Citotoxicidade <i>in vitro</i> sobre células normais/tumorais	Casearinas (A-X)	Morita et al (1991) Wang et al (2009 a) Ferreira et al (2010) Santos et al (2010)
	Antiviral contra <i>Herpes simplex</i>	Casearvestrinas A, B e C Óleo essencial Extrato Etanólico Infusão	Oberlies et al (2002) Da Silva et al (2008b) Camargo et al (1993) Ruppelt et al (1991)
	Antiinflamatória	Extrato Hidroetanólico	Almeida (2000)
		Decocção 5% Óleo Essencial Extrato Metanólico	Albano et al (2013) Sassioto et al (2004) Esteves et al (2005) Alves (2000)
	Antifúngica	Casearinas G, S e T Casearinas A, B e C	Carvalho et al (1998) Oberlies et al (2002)

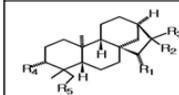
Inibição de fosfolipase A2	Derivados do Ácido elágico Extrato aquoso	Da Silva et al (2008a) Borges et al (2000, 2001) Cavalcante et al (2007)
Anti-úlceras	Derivados do ácido elágico Extrato Etanólico	Da Silva et al (2008a) Basile et al (1990) Sertié; Carvalho; Panizza (2000) Fialho et al (2010)
Citotóxica contra molúsculos	Óleo essencial Extrato Metanólico	Esteves et al (2005) Alves (2000)
Antioxidante	Extrato Aquoso Extrato Hidroalcoólico	Menezes; Schwarz; Santos (2004) Albano et al (2013)
Citotóxica contra <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	Extratos etanólico e hexânico	Mesquita et al (2005, 2007)
Analgésica	Extrato Hidroalcoólico	Mattos et al (2007)

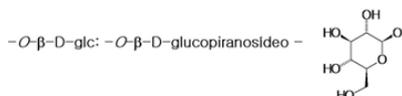
	Hipocolesterolêmica	Extrato Metanólico	Schoenfelder et al (2008)
Caule	Citotóxica contra <i>L. donovani</i> e <i>T. cruzi</i>	Extratos etanólico e hexânico	Mesquita et al (2005)
	Citotóxica contra <i>Aedes aegypti</i>	Extrato hexânico	Rodrigues et al (2006)
	Citotóxica contra <i>P. falciparium</i>	Extrato hexânico	Mesquita et al (2007)
Raízes	Analgésica	Infusão da casca e folhas	Ruppelt et al (1991)
	Citotóxica contra <i>T. cruzi</i>	Diterpenos clerodânicos	Espíndola et al (2004)
	Citotóxica contra <i>L. donovani</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>P. falciparium</i>	Extratos etanólico e hexânico	Mesquita et al (2005, 2007)

Análises fitoquímicas revelaram a presença de diterpenos clerodânicos, diterpenos kauranos, derivados do ácido gálico, sesquiterpenos e derivados do ácido elágico nas folhas da planta. Os diterpenos clerodânicos mais encontrados nas folhas de *C. sylvestris* são chamados de casearinas. Já foram isolados e identificados mais de 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), incluindo-se as casearinas U, V (WANG et al., 2009a) e X (SANTOS et al., 2010) (Figura 5). Tais moléculas vem apresentando importante citotoxicidade sobre microorganismos e linhagens celulares (principalmente linhagens de células tumorais), o que justifica o uso popular da planta como agente antitumoral, bem como sugere uma ação antineoplásica desses compostos isolados da planta (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al. 1999; FERREIRA et al 2010; SANTOS et al, 2010). Outros diterpenos clerodânicos que também já foram identificados nas folhas de *C. sylvestris* incluem: casearvestrinas (OBERLIES et al., 2002) (Figura 5), caseargrevina F (OLIVEIRA et al., 2009) (Figura 5), caseariasídeos A-E (WANG et al., 2009b) (Figura 6), 2-beta-metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olidio; 15 xi-metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olidio e 15-oxo-equinofillina A (WANG et al., 2009c) (Figura 6).

Figura 5 - Estrutura química das casearinas, casearvestrinas, caseargrevina F e sylvestrisídeos identificados em *C. sylvestris*.

Estrutura geral	Clerodano	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
 <p>Abreviações: ODc: decanoato EtMeAcO₂: 2-metil-butirato OCap: caproato</p>	Casearina A	OMe	OAc	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina B	OMe _(O)	OAc	Ac	OAc	n-PrCO ₂
	Casearina C	OH	OAc	Ac	OAc	-ODc
	Casearina D	OH _(O)	n-OBu	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina E	OH	OEt	Ac	OH	-ODc
	Casearina F	OH	OEt	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina G	OMe	OAc	Ac	H	n-PrCO ₂
	Casearina H	OH	OAc	Ac	H	n-PrCO ₂
	Casearina I	OH	OAc	n-PrCO	H	n-PrCO ₂
	Casearina J	OMe	n-PrCO ₂	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina K	OAc	OAc	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina L	OMe	n-PrCO	Ac	OAc	OH
	Casearina M	OH	n-PrCO	n-PrCO	OAc	OH
	Casearina N	OMe	OAc	n-PrCO	OAc	n-PrCO ₂
	Casearina O	OMe	n-PrCO	Ac	OAc	n-PrCO ₂
	Casearina P	OMe	OAc	Ac	OAc	OAc
	Casearina Q	OH	OAc	Ac	OAc	n-PrCO ₂
	Casearina R	O=	OAc	Ac	OH	n-PrCO ₂
	Casearina S	OMe _(O)	O=	Ac	H	n-PrCO ₂
	Casearina T	OMe _(O)	OAc	Ac	OAc	n-PrCO ₂
	² Casearina U	OMe _(O)	OMe	Ac	OH	EtCO ₂
	² Casearina V	OH _(O)	OMe	Ac	OH	EtCO ₂
	Casearina X	n-PrCO ₂ (O)	n-PrCO ₂	Ac	OH	H
	Caseargrevina F	n-PrCO ₂ (O)	OAc	Ac	OH	H
	Casearvestrina A	i-PrCO ₂ (O)	OAc	Ac	OH	H
	Casearvestrina B	EtMeAcO ₂ (O)	OAc	Ac	OH	H
	Casearvestrina C	-OCap _(O)	OAc	Ac	OH	H

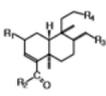
Ent-kaurano	Constituinte	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
	Sylvestrisídeo A	H		OH	-O-b-D-glc	H
	Sylvestrisídeo B	-O-b-D-glc	=CH ₂	-CH ₂ OH		H
	Sylvestrisídeo C	OH	=CH ₂		OH	-O-β-D-glc
	Sylvestrisídeo D	OH	=CH ₂		-O-b-D-glc	OH
	Sylvestrisídeo E	OH	=CH ₂		OH	-O-β-D-glc



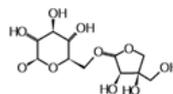
Fonte: Adaptado de MORITA et al., 1991; OBERLIES et al, 2002; OLIVEIRA et al, 2009; WANG et al, 2009a; WANG et al, 2009b; SANTOS et al., 2010.

Até o presente momento não foi elucidada nenhuma atividade biológica dos sylvestrisídeos identificados nas folhas de *C. sylvestris* (WANG et al., 2009a; WANG et al., 2009b) (Figura 5). Já os dois derivados do ácido gálico (isobutil galato-3,5-dimetil éter - IGDE e o metil galato-3,5- dimetil éter - MGDE) isolados das folhas da planta (Figura 6) demonstraram efeito antitumoral *in vivo* sobre o tumor ascítico de Ehrlich e o carcinoma de pulmão de Lewis (DA SILVA; CHAAR; YANO, 2009).

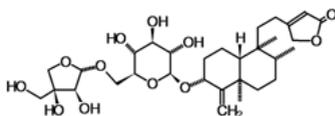
Figura 6 - Estrutura química dos caseariásídeos e derivados do ácido gálico identificados em *C. sylvestris*.

Estrutura geral Caseariásídeo	Clerodano	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
	2β-methoxy-cleroda-3,13-dien-18-carboxy-15,16-olide	OMe	OH	H	
	15ξ-methoxy-cleroda-3,12-dien-18-carboxy-15,16-olide	H	OH	H	
	15-oxo-echinophyllin A	H	OH	H	
	Caseariásídeo A	OH	-O-b-D-glc	H	
	Caseariásídeo B	H	-O-b-D-glc	OH	
	Caseariásídeo C	H	Acuminosídeo	H	
	Caseariásídeo E	H	-O-b-D-glc	H	

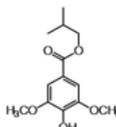
Acuminosídeo (6-O-D-apio-β-D-furanosil-β-D-Glucopiranosídeo):



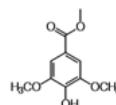
Outros constituintes:



Caseariásídeo D



IGDE



MGDE

Fonte: Adaptado de DA SILVA; CHAAR; YANO, 2009; WANG et al, 2009b; WANG et al 2009c.

Análises fitoquímicas do extrato aquoso obtido das folhas da planta revelaram a presença de derivados do ácido elágico (ácido 3'-O-metil-elágico; ácido 3, 3'-O-dimetil-elágico e ácido 3-O-metil-3',4'-metilenodioxielágico) (Figura 7), os quais foram capazes de inibir a ação da fosfolipase A2 encontrada no veneno de *Bothrops jararacussu*, justificando o efeito antiofídico conferido ao uso popular da planta (DA SILVA et al., 2008a).

Figura 7- Estrutura química de derivados do ácido elágico identificados em *C. sylvestris*.



Por fim, análises do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, revelaram a presença de biciclogermacreno (um composto que apresenta atividade antitumoral) e sesquiterpenos (β -cariofileno, δ -humuleno, α -zingibereno), os quais apresentam atividade citotóxica, antitumoral e/ou antiinflamatória comprovadas (ESTEVES et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; DA SILVA; FIGUEIREDO, YANO, 2007 ; DA SILVA et al., 2008b; BOU et al., 2013).

1.7 Quinonas como agentes quimioterápicos

As quinonas são dienonas cíclicas conjugadas, sendo estruturalmente classificadas de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico em: benzoquinonas, as quais possuem um anel benzênico, naftoquinonas, que apresentam um anel naftalênico e antraquinonas, que possuem um anel antracênico linear ou angular (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; SELVA, 2010).

Várias quinonas possuem ou já possuíram grande importância na área econômica como corantes (SELVA, 2010). Atualmente, o interesse nessa classe de substâncias está relacionado ao seu potencial uso medicinal, visto que quinonas naturais e sintéticas apresentam propriedades farmacológicas comprovadas, atuando como agentes antiinflamatórios, bactericidas, fungicidas, antivirais, antitumorais, dentre outros (BENITES et al., 2008a; SELVA, 2010).

Em relação a atividade antitumoral, algumas quinonas chegaram a ser produzidas em escala industrial, sendo extensivamente utilizadas na clínica, trata-se do caso das mitomicinas e antraciclinas. Dentre os principais representantes da classe das mitomicinas, pode-se citar a mitomicina C, a qual tem origem natural, tendo sido isolada da cultura de *Streptomyces caespitosus*, e utilizada na clínica para o

combate a diversos tipos de tumores sólidos (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Já os principais representantes da classe das antraciclina tratam-se da daunorrubicina e da doxorrubicina. Clinicamente a daunorrubicina é utilizada para o tratamento de leucemias agudas, enquanto que a doxorrubicina é utilizada para o tratamento de câncer de mama, linfomas e sarcomas (MINOTTI et al., 2004).

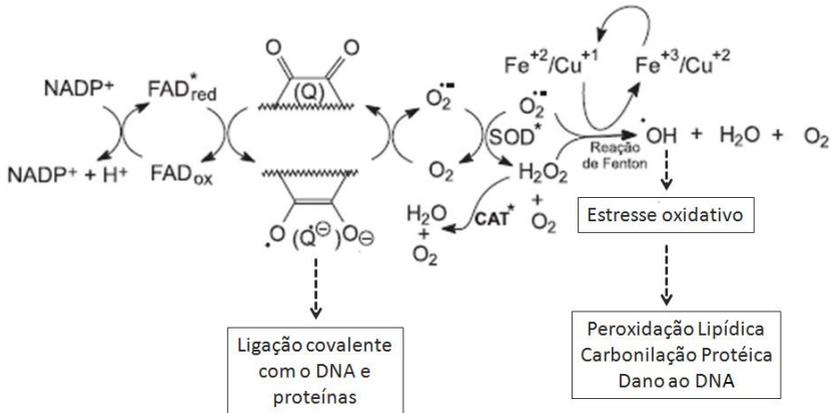
Outras quinonas com efeito antitumoral foram retiradas de mercado devido a ocorrência importante de efeitos adversos. É o caso da primina, a qual apresenta atividade antileucêmica comparável à daunorrubicina, entretanto apresenta alto potencial alergizante. Já o lapachol, que chegou a ser produzido industrialmente no Brasil, apresenta baixa biodisponibilidade, o que faz com que este fármaco tenha que ser administrado em doses muito elevadas para promover efeito, acarretando efeitos colaterais relacionados à coagulação sanguínea (DUKE, 1985; GIRARD et al. 1988; DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; BRONDANI et al., 2005).

Ainda no que concerne ao potencial antitumoral de quinonas, diversos compostos pertencentes a essa classe, encontram-se em fase pré-clínica de estudo. Pode-se citar quinonas de origem natural (por exemplo, polihidroxi-antraquinona), semissintética (por exemplo, β -lapachona, derivados da primina) e sintética (por exemplo, furilquinonas e hidroquinonas) (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; BRONDANI et al., 2005; BENITES et al., 2008a).

No que se refere ao mecanismo de ação pelo qual as quinonas exercem efeitos tóxicos e antitumorais, é amplamente relatado na literatura que essas atividades podem ser decorrentes da forte ativação do ciclo redox. Este ciclo inicia-se com a redução de um substrato quinonoídico a um radical semiquinona, sendo este processo catalisado por flavoenzimas (NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase) que utilizam NADPH como doador de elétrons (Figura 8). Uma vez formado, o radical semiquinona pode interagir com macromoléculas (DNA e proteínas) através da formação de ligações covalentes, ou pode ser oxidado pelo oxigênio molecular, ocorrendo nesse caso, a regeneração da quinona original e a formação de radical ânion superóxido e outras EROs (VERMA, 2006; GUTIERREZ, 2000). Sob determinadas condições, a taxa de formação de EROs pode exceder a capacidade de defesas antioxidantes das células, resultando no estabelecimento do estresse oxidativo, o qual culmina em dano a macromoléculas e na ativação de vias de sinalização celular, podendo disparar mecanismos de morte em células tumorais susceptíveis. Sabe-se

que a capacidade de biorredução dos derivados quinóides e consequente produção de EROs é influenciada pelo potencial redox desses compostos, bem como pela natureza de substituintes associados ao núcleo quinóide (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; KVIECINSKI et al., 2012).

Figura 8 - Ciclo redox induzido por quinonas.



Fonte: Adaptado de: DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003.

Outro mecanismo envolvido na atividade antitumoral de quinonas, particularmente aquelas pertencentes à classe das antraciclina, trata-se da inibição das topoisomerases (MINOTTI et al., 2004). As enzimas nucleares topoisomerases I e II são críticas para o funcionamento normal de qualquer célula, visto que controlam o estado topológico do DNA intracelular, permitindo que as funções de transcrição, reparo, replicação e estruturação dos cromossomos ocorram normalmente (CHAMPOUX, 2001).

Os inibidores de topoisomerases podem atuar de duas formas: estabilizando o complexo topoisomerase - DNA ou promovendo a inibição catalítica da enzima. Em relação aos inibidores catalíticos da enzima, podem-se citar as bis - 2,6 - dioxopiperazinas, que atuam inibindo a topoisomerase II pelo bloqueio do sítio catalítico da mesma (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Já as antraciclina (por exemplo, doxorubicina, andamicina e daunorrubicina) inibem geralmente a ação da topoisomerase II ao promover a estabilização do complexo topoisomerase - DNA. Na realidade, as antraciclina ligam-se ao DNA

ou a topoisomerase, levando a formação de um trímero constituído pela antraciclina, DNA e enzima. Este trímero é estabilizado, levando a formação do chamado complexo clivável, o que acarreta no aprisionamento da topoisomerase, visto que o inibidor atua após a indução de cortes e antes que a enzima desconecte-se do DNA. A estabilização do trímero interrompe a separação das bases nitrogenadas do DNA, necessária à transcrição e à replicação, sendo disparados mecanismos que induzem a morte das células neoplásicas (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003, MINOTTI et al., 2004; DE ALMEIDA et al., 2005).

Como as antraciclinas tratam-se de agentes intercalantes, tem sido postulado que esses compostos interagem com o DNA através de sua intercalação nessa macromolécula, promovendo a estabilização do complexo topoisomerase - DNA. Entretanto, a correlação entre a intercalação e a interação com a topoisomerase II ainda não foi definida, apesar de ter sido objeto de muitos estudos. Dessa forma, a intercalação ao DNA realizada pelas antraciclinas, deve ser considerada mais um dos possíveis mecanismos com que as quinonas exercem efeito antitumoral (DE ALMEIDA et al., 2005).

Estudos evidenciam que, além da intercalação, as antraciclinas também podem atuar na formação de adutos de estrutura complexa por ligações covalentes com o DNA, o que demonstra a capacidade alquilante desta classe de compostos (DE ALMEIDA et al., 2005).

1.8 Fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 como promissores compostos antitumorais

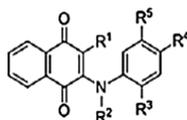
Sabe-se que o principal mecanismo com que quinonas exercem atividade antitumoral envolve uma forte ativação do ciclo redox, onde alguns estudos têm evidenciado que o efeito antineoplásico induzido por estes compostos, além de estar relacionado a uma propriedade química intrínseca da unidade quinonoídica, está associada a outros fatores estruturais, os quais determinam a intensidade com que estes compostos exercem este efeito (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003). Tem sido relatado que a presença do núcleo quinóide é fundamental para a ocorrência de reações que levam à redução das quinonas, com conseqüente geração de EROs (NICOTERA et al., 1990). Outros estudos realizados têm demonstrando que o efeito citostático e citotóxico apresentado por quinonas depende diretamente da natureza dos substituintes associados ao grupo quinonoídico, uma vez que os mesmos podem interferir no equilíbrio do sistema quinóide afetando a ocorrência

do ciclo redox e consequentemente, a produção de EROs (GARUTI, et al., 2004; BENITES et al., 2008a e b; BENITES et al., 2009).

Baseados nessas evidências e com o intuito de identificar moléculas antitumorais promissoras, a equipe coordenada pelo professor Dr. Júlio Benites associada a outros grupos de pesquisa (LABIOEX e GTOX), vêm sintetizando diversos tipos de quinonas (juglona, menadiona, 3-acil-2-amilamino-1,4-naftoquinonas), tentando modular o efeito de substituintes associados ao grupo quinóide na facilitação da ocorrência do ciclo redox e consequentemente, mediação de um efeito antitumoral mais potente.

O trabalho em questão trata-se de um exemplo desta tentativa, o qual iniciou-se previamente com síntese de 12 fenilaminonaftoquinonas (denominadas de Q3 a Q14) que variavam em relação aos substituintes presentes em R1, R2, R3, R4 e R5 (Figura 9), com o intuito de se verificar a influência dos grupos cromóforos (substituintes ligados ao radical fenil) e dos substituintes ligados diretamente ao núcleo naftoquinona, na modulação das propriedades eletrônicas do átomo de nitrogênio presente nessas moléculas, facilitando ou dificultando a ocorrência do ciclo redox.

Figura 9 - Estrutura química das fenilaminonaftoquinonas sintetizadas e submetidas a um *screening in vitro* para a seleção dos compostos mais promissores.



Composto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Q3	H	H	H	H	H
Q4	Cl	H	H	H	H
Q5	H	H	CH ₃	H	H
Q6	Cl	H	CH ₃	H	H
Q7	H	H	H	OH	H
Q7A	H	H	H	OCOCH ₃	H
Q8	Cl	H	H	OH	H
Q9	H	H	H	OCH ₃	H
Q10	Cl	H	H	OCH ₃	H
Q11	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃
Q12	Cl	H	OCH ₃	H	OCH ₃
Q13	H	CH ₃	H	H	H
Q14	Cl	CH ₃	H	H	H

Fonte: adaptado de Benites et al, 2010.

Dessa forma, esses compostos foram primeiramente submetidos a um *screening* para a seleção das fenilaminonaftoquinonas mais citotóxicas e seletivas. Das 12 fenilaminonaftoquinonas avaliadas, Q7 e Q9 foram os compostos mais promissores, uma vez que apresentaram importante toxicidade sobre 3 linhagens de células tumorais humanas (células MCF-7, T24 e DU-145), bem como os melhores índices de eficácia e segurança. Além disso, Q7 e Q9 foram capazes de reduzir a proliferação celular e a síntese de ATP em células T24, a partir da concentração de 10 µg/ML, demonstrando então, o efeito antitumoral destas duas moléculas.

A síntese das 12 fenilaminonaftoquinonas, bem como os ensaios realizados para selecionar os compostos mais promissores fazem parte deste trabalho possibilitaram a confecção de um artigo científico intitulado “Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents”, publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry* (Anexo B).

1.9 Associação de quinonas ao ascorbato de sódio: terapia eficaz e seletiva para o tratamento do câncer

Quando comparadas as células normais, células tumorais exibem elevados níveis intracelulares de EROs. A alta concentração de EROs apresentada pelas células neoplásicas está relacionada ao desenvolvimento da tumorigênese, visto que estes radicais livres atuam promovendo instabilidade genética, bem como estimulando os processos de proliferação celular e angiogênese, favorecendo o crescimento tumoral (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Em relação às defesas antioxidantes, há relatos de que células tumorais em cultura apresentam uma redução na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase, comparativamente as células normais (VERRAX et al., 2011b). Já outros dados, apontam que as células tumorais, uma vez que apresentam uma resposta adaptativa ao estresse, são capazes de superexpressar enzimas antioxidantes, as quais, entretanto, atuam neutralizando o excesso de EROs produzidas pelo metabolismo da célula tumoral há um determinado nível que não alcance o limiar de toxicidade (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Assim, a alta geração de EROs torna as células tumorais mais dependentes dos sistemas de defesa antioxidante, deixando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo induzido por agentes pró-oxidantes ou compostos que inibem os sistemas antioxidantes (VERRAX et al., 2011b).

Apesar do ascorbato de sódio ser em geral considerado um potente antioxidante, estudos têm demonstrado que quando administrada em doses elevadas, essa vitamina pode apresentar efeito paradoxal. Tem sido observado que o ascorbato de sódio é capaz de induzir a quebra oxidativa do DNA, bem como gerar radicais livres via reação de Fenton ao interagir com íons metálicos de transição (CARR; FREL,1999; VENOGUPAL et al.,1996). Além disso, tem sido reportado que o ascorbato de sódio apresenta efeito citotóxico sobre uma diversidade de linhagens de células tumorais incluindo mielomas, células leucêmicas humanas, neuroblastomas, células de tumor ascítico e carcinoma epidermóide (DE LAURENZI et al, 1995).

Baseados nestas evidências, o grupo de pesquisa coordenado pelo professor Pedro Buc Calderón do *Toxicology and Cancer Biology Research Group* da *Université Catholique de Louvain* (GTOX – UCL – Bélgica) associado a outros laboratórios de pesquisa, desenvolveram uma estratégia particular de indução de morte celular, a partir da exposição de células tumorais ao estresse oxidativo induzido pela associação de dois agentes pró-oxidantes: o ascorbato de sódio (em elevada dose) e uma quinona sintética (menadiona ou vitamina K₃, por exemplo).

De fato, diversos estudos realizados por estes grupos de pesquisa têm demonstrado que a associação do ascorbato de sódio a quinonas potencializa os efeitos citotóxicos, antiproliferativo e antitumoral exercidos por estes compostos quando administrados isoladamente (TAPER; KEYEUX; ROBERFROID, 1996; VERRAX et al., 2007; BENITES et al., 2008b; VÁSQUEZ et al, 2011; KVICINSKI et al, 2012).

Na busca pelo mecanismo de ação relacionado a este efeito sinérgico, tem sido proposto que o ascorbato de sódio pode potencializar o ciclo redox de quinonas, levando a indução de um estresse oxidativo letal para as células tumorais. Nesse processo, o ascorbato em excesso, atuaria reduzindo de forma não enzimática a quinona, levando a geração exarcebada de EROs e desencadeando uma cascata de reações (peroxidação lipídica, protéica e dano ao DNA) que culmina na morte celular (TAPER; KEYEUX; ROBERFROID, 1996).

Tem sido observado que a associação de quinonas ao ascorbato de sódio promove seus efeitos de maneira seletiva sobre células tumorais, onde tal seletividade está associada ao fato de que células neoplásicas, captam uma maior quantidade de ascorbato de sódio comparativamente as células normais. Além disso, tem sido demonstrado que a captação de ascorbato por parte das células tumorais ocorre principalmente através do transportador de glicose GLUT-1, o qual é superexpresso em células

neoplásicas devido ao fenótipo essencialmente glicolítico apresentado pelas mesmas (VERRAX et al, 2005).

Mediante o potencial antitumoral apresentado pela *C. sylvestris*, bem como pela associação de quinonas ao ascorbato de sódio, ressalta-se o fato de que essas abordagens terapêuticas devem ser mais bem exploradas tanto do ponto de vista do mecanismo de ação, quanto da proposição de novas terapias para o tratamento do câncer. Dentro deste contexto a proposta do presente estudo é elucidar, através de ferramentas bioquímicas e de biologia molecular, o potencial antiproliferativo e antitumoral do extrato bruto e frações de *C. sylvestris*, bem como de diferentes quinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos antiproliferativo e antitumoral mediados pelo extrato bruto e frações de *C. sylvestris*, bem como pelas fenilaminonaftoquinonas 7 e 9 administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar, de forma preliminar, a presença de diterpenos clerodânicos (casearinas) na fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris*;
- Avaliar a citotoxicidade e atividade antiproliferativa do extrato bruto (EB-ETOH), e fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* sobre a linhagem de células tumorais MCF-7;
- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* do EB-ETOH e fração f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, em modelo sólido do carcinoma de Ehrlich, através da avaliação da variação da espessura da pata e da realização de avaliações histológicas que visam determinar o tipo de morte celular induzido;
- Avaliar comparativamente a citotoxicidade das fenilaminonaftoquinonas 7 (Q7) e 9 (Q9) administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio sobre a linhagem de células tumorais T24;
- Avaliar comparativamente o potencial antiproliferativo de Q7 e Q9 administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio sobre a linhagem de células tumorais T24;
- Investigar o mecanismo de ação citotóxico e antiproliferativo do EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, bem como das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio sobre células tumorais MCF-7 e T24, respectivamente, através da avaliação do tipo de morte celular induzido, da distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular, da indução de senescência e estresse oxidativo, bem como através da análise de modificações na sinalização mediada por MAPK e marcadores envolvidos nesses processos.

CAPÍTULO 2- Estudo da atividade antiproliferativa e antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Reagentes e anticorpos

O meio de cultura modificado de Eagle (DMEM), soro fetal bovino e os antibióticos para a cultura de células foram obtidos da Gibco (EUA). A albumina de soro bovino, a doxorubicina, o nocodazol e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O coquetel inibidor de fosfatases foi originário da da Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos para p16 e CDK2 foram adquiridos da Cell Signaling Technology (EUA). Os anticorpos para detecção de p53 e para γ H2Ax foram originários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (EUA). Os anticorpos secundários foram adquiridos da Dako (Dinamarca) e Chemicon (Millipore, EUA). Todos os demais produtos químicos foram obtidos de reagentes de grau de pureza ACS.

1.2 Material vegetal

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.

1.3 Obtenção 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).

1.4 Identificação de compostos com ação antitumoral

A presença de compostos com ação antitumoral foi avaliada na fração clorofórmica, a qual foi submetida a um refraçãoamento através da realização de cromatografia em coluna de sílica (70 - 230 e 200 - 300 de malha, Merck) e utilizando-se uma mistura de hexano-acetato de etila como gradiente de eluição. As subfrações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (gel de sílica 60F254; Merck), sendo as manchas na placa visualizadas por pulverização de vanilina-H₂SO₄, seguida de aquecimento. O material contido na mancha majoritária da subfração mais pura foi coletado e ressolubilizado em metanol P.A. Após centrifugação (14.000 rpm durante 15 min), evaporou-se o solvente da solução sobrenadante, a qual foi dissolvida em DMSO-d₆ e submetida à espectroscopia de RMN. Os espectros obtidos foram registados em um espectrofotômetro Brucker AC 200, utilizando-se TMS como padrão interno. A identificação de compostos com possível efeito antitumoral foi realizada através da comparação entre os resultados obtidos e dados da literatura.

1.5 Cultura de células

Células da linhagem tumoral MCF-7 (carcinoma humano de mama) foram procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas e mantidas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

1.6 Animais

Para a realização dos experimentos referentes à avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g 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 6 e mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-

escuro de 12 h, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ~ 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.

1.7 Ensaios biológicos

1.7.1 Ensaios biológicos *in vitro*

1.7.1.1 Avaliação da viabilidade celular – ensaio do MTT

Para a realização deste ensaio, células foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma densidade celular de 1×10^5 células/mL e incubadas em estufa. 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro contendo extratos de *C. sylvestris* (7,8 - 250 $\mu\text{g/mL}$). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

Após o tratamento das células pelo período de 24 horas, o meio de cultura contendo os extratos foi retirado e as células foram lavadas por duas vezes, com tampão fosfato-salina (PBS) a 37°C . Logo após, foi adicionado 100 μl de uma solução de MTT (0,5 mg/mL), seguido de incubação por 2 horas. Decorrido esse período, o MTT excedente foi removido. Com o intuito de solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação, foi adicionado 100 μl de DMSO (PA). Em seguida, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente com o auxílio de um leitor de placas (540 nm) para se determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os valores obtidos foram expressos em percentual de redução do MTT de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Redução do MTT (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$$

Considerou-se os valores dos controles negativo como 100% de redução do sal. Os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) foram determinados a partir do software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

1.7.1.2 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Placas de cultura de 6 poços contendo 500 células/poço e 2 mL de meio suplementado foram incubadas por 24 h. Transcorrido este período, o meio de cultura foi substituído por outro contendo EB-ETOH (4,4 – 70,5 µg/mL) ou f-CHCl₃ (2,1 – 33 µg/mL) e as placas foram incubadas por 24 h. O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%). Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS a 37°C (3x) e o meio foi novamente substituído por meio fresco, seguido de uma nova incubação, agora com duração de cerca de 8-10 dias, ou até a verificação da presença de colônias (pelo menos uma colônia com cerca de 50 células), quando o ensaio foi finalizado. O meio foi retirado e as colônias coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para serem posteriormente visualizadas e quantificadas, sendo os resultados expressos comparativamente ao controle negativo (FRANKEN et al., 2006).

1.7.1.3 Análise do ciclo celular

Para a avaliação de modificações induzidas no ciclo celular pelo tratamento com EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, utilizou-se o kit PI/RNASE solution (Immunostep), seguindo as instruções do próprio fabricante. Previamente, células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 6 poços (2,0 X 10⁵ células) pelo período de 24 h. A seguir, as mesmas foram sincronizadas com nocodazol (30 ng/mL) por 14 h. Decorrido este intervalo de tempo, as células foram tratadas por 48 h com EB-ETOH (56,4 µg/mL) e f-CHCl₃ (26,4 µg/mL). Posteriormente, as mesmas foram cuidadosamente coletadas, lavadas e ressuspensas em etanol (70%) gelado, seguido de incubação *overnight* a -20°C. Uma vez fixadas, as células foram lavadas novamente em PBS + BSA 2% e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, em uma solução contendo iodeto de propídeo e RNase. Por fim, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando-se o software *Flowing Software 2.5* e foi determinada a porcentagem de células agrupadas em cada fase do ciclo celular.

1.7.1.4 Imunodeteção

Neste experimento, células MCF-7 foram plaqueadas (2,5 x 10⁵ células/mL) e 24 horas após, foram tratadas com EB-ETOH (56,4 µg/mL) ou f-CHCl₃ (26,4 µg/mL) pelos períodos de 24, 36 e 48 h. O

controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%). Uma vez efetuado o tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS e devidamente lisadas através da adição de tampão RIPA (Tris-Cl 25 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sódio 0,25% e fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM) a pH 7,4 suplementado com coquetel inibidor de fosfatases e proteases. A seguir, as células foram retiradas dos poços com o auxílio de um hastel e coletadas em microtubos. Uma vez obtidas as amostras, as mesmas foram desnaturadas em tampão Laemli pH 6,8 composto por Tris-Cl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2% (SDS), glicerol 10 %, β - mercaptoetanol 5 % e 0,01 % de azul de bromofenol (DEJEANS et al., 2010).

Quantidades equivalentes de proteínas (30 μ g) obtidas a partir dos extratos celulares foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e posteriormente transferidas por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. A seguir, foi realizado o bloqueio das membranas em solução de TBS contendo leite em pó desnatado (5%), por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram então incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpos primários específicos (CDK2, p16, γ H2Ax e p53) para cada proteína a ser analisada. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-TWEEN (0,1%) e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (monoclonais ou policlonais) por 1 h (DEJEANS et al., 2010). Os *blots* foram visualizados utilizando-se o sistema SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Para o controle da carga de proteínas, utilizou-se como marcador a β -actina. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi dosada pelo método de Bradford utilizando-se um kit comercial específico para este fim e seguindo as instruções do fabricante (BioRad).

1.7.1.5 Determinação da concentração intracelular de EROs

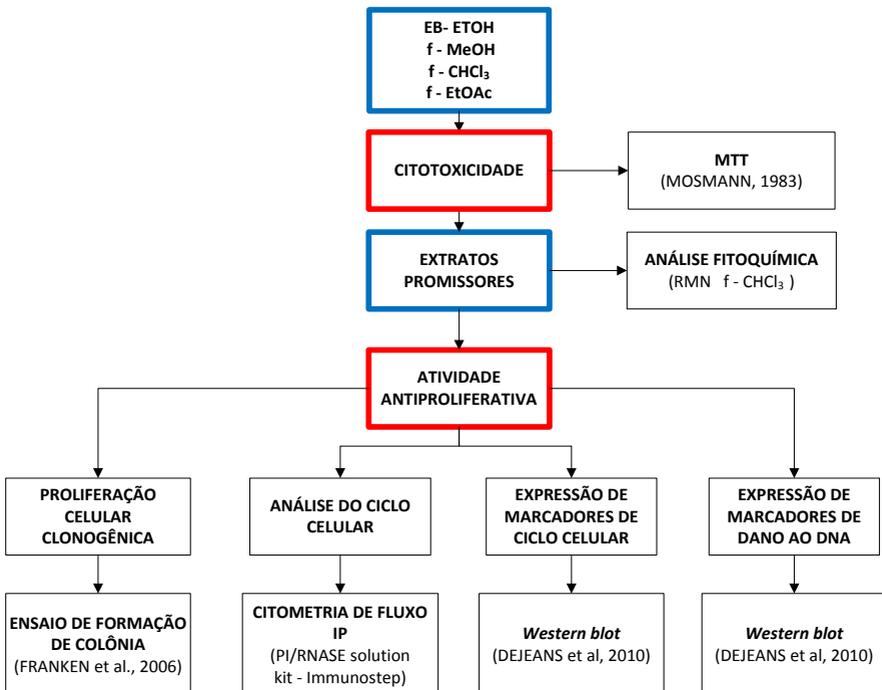
Para a determinação da concentração intracelular de EROs procedeu-se da seguinte forma: células MCF-7 na densidade celular de 15×10^4 células/mL foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Decorrido esse período, o meio de cultura foi retirado e adicionados 1 mL de uma solução de 20,70-diacetato de diclorofluoresceína (10 μ M) previamente diluída em HBSS (KCl 5,3 mM; KH_2PO_4 0,44 mM; NaHCO_3 4,2 mM; NaCl 137,9 mM; Na_2HPO_4 0,34 mM; D-glicose 5,55 mM; vermelho fenol 0,027 mM) à temperatura de 37°C e pelo intervalo de 30 min. As células foram lavadas duas vezes

em HBSS e tratadas com EB-ETOH (31,25 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou f- CHCl_3 (31,25 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pelo período de 3 h. Transcorrido esse intervalo de tempo, as células foram lavadas com HBSS e ressuspensas em seguida, em 100 μl de HBSS/poço. A intensidade de fluorescência foi avaliada usando-se filtros de excitação a 485 nm e emissão a 520 nm (KVICINSKI et al., 2012). Os resultados obtidos foram expressos como Unidades de fluorescência/ μg de proteína.

A dosagem de proteínas totais presentes foi mensurada pelo método de Bradford utilizando o kit Coomassie (Bradford) Protein Assay da Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante.

O controle negativo foi tratado com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO a 0,25%).

Figura 10 - Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo *in vitro* do extrato bruto (EB-ETOH) e das frações clorofórmica (f- CHCl_3), acetato de etila (f-EtOAc) e metanólica (f-MeOH) de *C. sylvestris* sobre células MCF-7, bem como dos mecanismos envolvidos na mediação destes efeitos.



Fonte: Dados do autor.

1.7.2. Ensaios biológicos *in vivo*

1.7.2.1 Modelo do tumor solido de Ehrlich

1.7.2.1.1 Protocolo Experimental

Para a realização desse modelo experimental, foram utilizados camundongos Balb/c distribuídos em quatro diferentes grupos experimentais (n= 6 por grupo experimental pesando 20 ± 2 g): I) controle negativo (CTRL - TAE + solução de DMSO a 10 %); II) controle positivo (DOX - TAE + Doxorubicina); III) grupo tratado com EB-ETOH (TAE + EB-ETOH); IV) grupo tratado com f-CHCl₃ (TAE + f-CHCl₃).

Inoculou-se em todos os camundongos, $2,5 \times 10^6$ células do tumor ascítico de Ehrlich, no coxim plantar direito 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, onde administrou-se doses dos extratos ou doxorubicina nas concentrações de 150 mg/kg e 1,2 mg/kg, respectivamente, durante 9 dias consecutivos. Os animais do grupo I 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, os animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical para a retirada da pata direita, a qual foi posteriormente descalcificada, possibilitando a execução das análises histológicas e morfológicas.

1.7.2.1.2 Descalcificação das patas

Após a eutanásia, as patas foram coletadas e mantidas em solução de formol a 4% por 1 semana, para serem descalcificadas em ácido nítrico 5% por 7 dias. Após este período, as patas foram lavadas em água corrente por aproximadamente 6 horas e transferidas para álcool 70%, para posteriormente serem incluídas em parafina e cortadas em fatias de 5 µm de espessura.

1.7.2.1.3 Avaliação da inibição do crescimento do tumor

O crescimento do tumor foi avaliado através de duas formas: macroscopicamente, pela mensuração da diferença de espessura entre a pata em que foi inoculado o tumor e a pata sadia; e microscopicamente, pela determinação da razão área da massa tumoral/área do osso.

A variação da espessura das patas foi acompanhada durante os 10 dias subseqüentes à inoculação do tumor de Ehrlich no coxim plantar, com o auxílio de paquímetro, sendo devidamente registrada (PINTO, et al., 2009). Já a razão área da massa tumoral/área do osso, foi determinada em fotografias dos cortes histológicos corados com Casson, através da utilização do *software Cyclops Histopatological Tool* (CHPTool) desenvolvido pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Convergência Digital (INCoD, Brazil). Cabe ressaltar que optou-se por avaliar o crescimento tumoral microscopicamente pela razão área da massa tumoral/área do osso, com o intuito de se normalizar as mensurações, visto a existência da diferença de tamanho entre as patas dos animais.

1.7.2.1.4 Avaliação do tipo de morte celular induzido

1.7.2.1.4.1 Quantificação da porcentagem de necrose na área tumoral

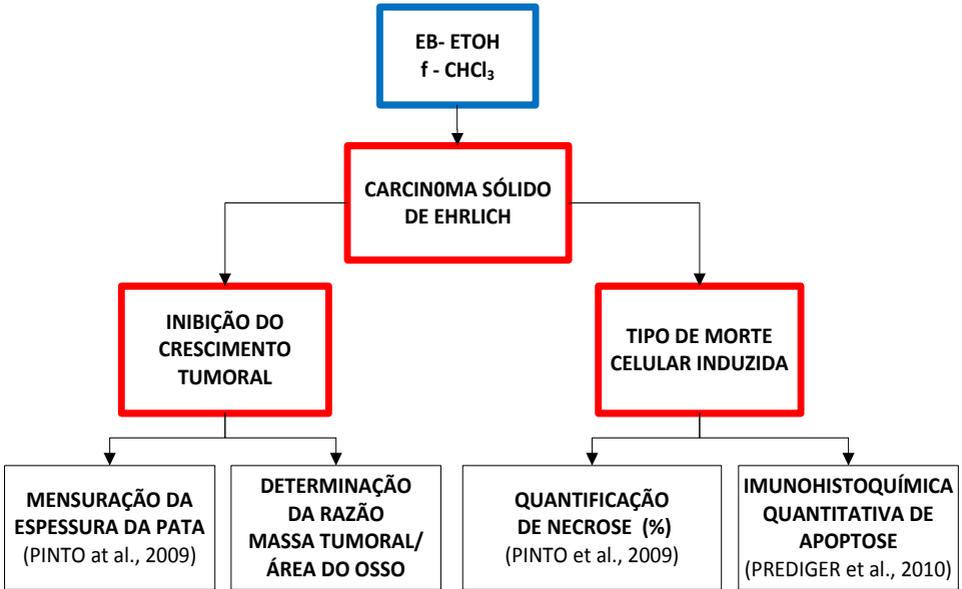
A quantificação das áreas de necrose na massa tumoral, foi realizada conforme metodologia descrita por Pinto et al. (2009) com algumas modificações, onde analisou-se fotos das lâminas contendo cortes do coxim plantar de camundongos, coradas com Casson. As imagens foram captadas por um sistema constituído por um microscópio óptico acoplado a uma câmara digital e a área necrótica foi determinada utilizando-se o *software Cyclops Histopatological Tool* (CHPTool).

1.7.2.1.4.2 Imunohistoquímica quantitativa de apoptose

A quantificação de apoptose na meio à massa tumoral foi realizada através do emprego de uma técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal de coelho anti-caspase-3 clivada (1:200). Cortes histológicos de espessura de 5 µm foram montados sobre lâminas carregadas positivamente, através da prévia imersão das mesmas em solução de ATPS (3-aminopropiltriétoxisilano). Em seguida, os cortes foram fixados pelo calor, através de sua incubação em estufa com temperatura de aproximadamente 50°C, pelo período de 1 h.

Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, o qual é realizado com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Procedeu-se então, com a incubação do anticorpo primário, onde as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12 - 16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente, e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG / IgM conjugado com um polímero de peroxidase. Essa incubação foi realizada em câmara úmida, durante 1 h, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente com solução de PBS por 5 min, em temperatura ambiente. Os cortes foram corados com uma solução cromógena constituída por 3,3'-diaminobenzidina (DAB-0,03%) e peróxido de hidrogênio (0,3%), e contra-corados com solução de Hematoxilina de Harris. Posteriormente, os cortes foram desidratados, através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanizados em xilol e montados em meio de montagem permanente. Para cada reação foi utilizado um controle negativo, com abolição do anticorpo primário nas reações. A contagem de células positivas para caspase-3 clivada foi realizada através de análise microscópica, levando-se em consideração 10 campos aleatórios do tecido neoplásico. Os campos de contagem foram devidamente fotografados, para o registro da quantificação. Os resultados foram expressos como percentual de células positivas para caspase-3 clivada por campo microscópico (PREDIGER et al., 2010).

Figura 11- Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial antitumoral *in vivo* do extrato bruto (EB-ETOH) e da fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* sobre o carcinoma sólido de Ehrlich.



Fonte: dados do autor

1.7.3 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do método de análise de variância *one-way* ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando apropriado, e admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

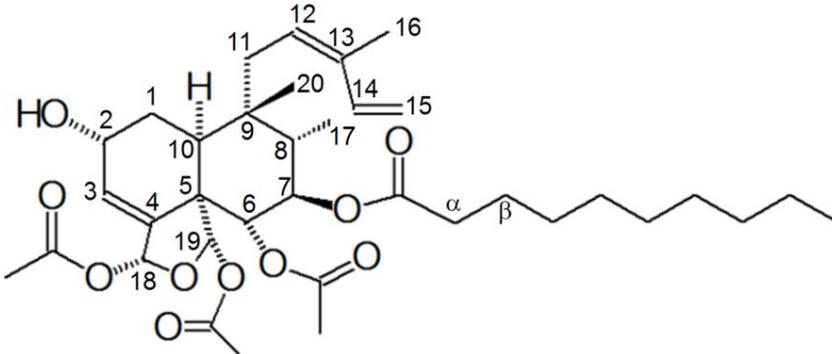
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Identificação de compostos com ação antitumoral

Os dados espectrais experimentais de RMN ^1H de um dos constituintes da fração clorofórmica obtida conforme descrito anteriormente, apresenta sinais de próton ligado a C sp^2 com variada multiplicidade em função de acoplamentos com prótons vizinhos, na faixa de deslocamento químico (δ) entre 5-6,5 ppm e cujas áreas relativas dos sinais contidos nessa região correspondendo a um próton. A desblindagem relatada para prótons de C sp^2 também se aplica aos prótons com vizinhança composta por heteroátomos eletronegativos, como ^{14}N e ^{16}O , e afetam a blindagem de prótons ligados ao ^{12}C vicinal dos grupos funcionais mencionados, deslocando a frequência de oscilação nuclear para campo magnético baixo. Assim aparece sinal multiplete centrado em δ 4,52 ppm e área relativa igual a um, estimando ser de próton geminado a ^{16}O e vicinal a olefina, verificado por cálculo com constantes de blindagem. Do mesmo modo, os sinais de multiplicidade singlete em δ 2,0 ppm com área relativa correspondendo a 9 prótons, indicando ser hidrogênios de metila de três grupos acetato (MeCO-). Destaca-se também no espectro sob análise, perfil de multiplicidade de sinais característico de hidrocarboneto com cadeia longa, linear e saturado, com um triplete centrado em δ 2,34 ppm, multiplete em δ 1,60 ppm, singlete largo em δ 1,25 ppm e triplete em δ 0,88 ppm, e áreas relativas correspondendo a 2, 2, 12 e 3 prótons, respectivamente. Os demais sinais de oscilação nuclear são consistentes com os relatados na literatura para estrutura molecular do tipo diterpeno clerodano, remetendo aos constituintes descritos como casearinas. Adicionalmente, as informações referentes aos números de grupos acetato e da presença de cadeia linear longa típico de hidrocarboneto saturado, levam a possibilidade de tratar-se do constituinte casearina C. Para confirmar a estrutura molecular do composto isolado, o espectro RMN de ^{13}C desacoplado mostra que a molécula contém 4 grupos funcionais carbonila de éster, na faixa de campo baixo entre δ 169 e 173 ppm, já que a maneira como o oxigênio se liga, proporciona desblindagem do carbono da carbonila, há um padrão característico de três núcleos de carbono de metilas de acetato em δ 21 ppm e sinais de carbono aglomerados em δ 29 ppm que, somado ao quarto carbono de éster, indica tratar-se do decanoato (Dec). Esses dados permitem concluir que o constituinte isolado da fração clorofórmica de fato é a

casearina C (Figura 12). A figura a seguir descreve as atribuições de sinais do composto citado (Tabela 2).

Figura 12 - Estrutura química da casearina C identificada na fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris*.



Fonte: Adaptado de ITOKAWA et al., 1990.

Tabela 2 - Atribuições dos sinais de RMN ¹H e ¹³C de amostra de constituinte isolado de f-CHCl₃, δ (ppm) a partir do tetrametilsilano (TMS) em DMSO-d₆ (200 MHz).

¹ H	δ (ppm)	¹³ C	δ (ppm)
H-2	4,52 (l, m)	1	29,5
H-3	6,07 (l, d)	2	63,6
H-10	2,44 (dd)	3	127,4
H-11	1,68 (l, d)	4	141,2
H-12	5,31 (l, d)	5	52,8
H-14	6,65 (dd)	6	74,0
H-15	5,1; 5,2	7	72,8
Me-16	1,81 (l, s)	8	41,1
Me-17	0,9 (d)	9	39,4
H-18	6,42 (s)	10	36,0
H-19	6,62 (s)	11	30,2
H-20	0,90 (s)	12	125,7
MeCO-	2,01;2,05;2,09 (s)	13	134,1
Me-Dec	0,88 (t)	14	133,3
-(CH ₂) ₆ -Dec	1,25 (l, s)	15	114,8
-CH ₂ (β)-Dec	1,60 (dt)	16	20,3
-CH ₂ (α)-Dec	2,34 (t)	17	11,1
		18	94,9

	19	97,6
	20	25,5
	Acetato	21,1
		169
		21,3
		169,5
		21,4
		170,1
	Decanoato	14,1
		22,7
		31,8
		29,4
		29,5
		29,2
		29,3
		29,4
		34,3
		172,7

(d): duplete; (dd): duplo duplete, (dt): duplo triplete, (l): sinal largo, (q): quarteto, (t): triplete, (s): singlete. Fonte: Dados do autor.

2.2 Atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *C. sylvestris*

Um dos grandes problemas da quimioterapia do câncer, a qual baseia-se na utilização de agentes citotóxicos com o objetivo de se destruir as células neoplásicas, refere-se à falta de especificidade dos fármacos, o que acarreta toxicidade para o paciente (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996; JENDIROBA et al, 2002). Além disso, a descoberta de novos compostos capazes de combater tumores sólidos é importante, pois vários tumores humanos comuns são resistentes aos fármacos disponíveis e a maior parte destes agentes têm limitada atividade contra tumores sólidos (YARBRO, 1992). Visando complementar as terapias citotóxicas convencionais, bem como minimizar os efeitos tóxicos causados ao paciente pelos quimioterápicos, vêm sendo desenvolvidos novos fármacos que possuem maior efeito citostático do que citotóxico, os quais podem atuar, por exemplo, bloqueando a invasão, a angiogênese, ou intermediários de vias de sinalização celular (KOHN; LIOTTA, 1995).

Um modelo experimental que vem sendo amplamente utilizado para investigar propriedades antitumorais de vários novos agentes

terapêuticos, trata-se do modelo experimental do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). 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 e apresenta como uma das principais vantagens experimentais, o fato de desenvolver-se rapidamente (RAJESHKUMAR et al., 2002; AJITH, JANARDHANAN, 2003; GUPTA et al., 2004; KANENO et al., 2004; MELO et al., 2004). Entretanto, uma das maiores críticas relacionadas ao modelo experimental do TAE, refere-se ao processo inflamatório que acompanha o desenvolvimento do tumor no peritônio dos animais. Assim, substâncias e/ou compostos com atividade antiinflamatória poderiam estar reduzindo parâmetros histocitológicos (volume de líquido ascítico) e morfofisiológicos (peso, circunferência abdominal), diminuindo o tamanho do tumor, e aumentando consequentemente, o tempo médio de sobrevivência dos animais, ao promoverem uma redução no edema característico do processo inflamatório.

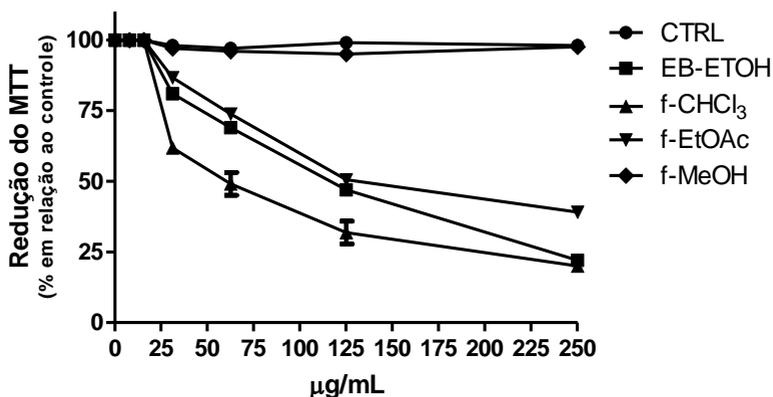
Levando-se em consideração o exposto acima e o fato de que a *C. sylvestris* possui atividade antiinflamatória comprovada (DA SILVA, 2008b; ALBANO et al., 2013), neste trabalho, procurou-se verificar se a melhora dos parâmetros cronomorfofisiológicos e histocitológicos promovido pelos tratamentos com extratos e frações dessa planta (e verificados por nosso grupo de pesquisa, como citado no capítulo 1 item 1.6) estaria relacionada às propriedades antiinflamatórias da mesma, bem como se tais extratos e frações seriam eficazes no combate de tumores sólidos, o que foi avaliado através da execução do modelo experimental do tumor sólido de Ehrlich. Além disso, no presente trabalho, procurou-se elucidar a atividade e o mecanismo de ação antiproliferativa desses extratos sobre células MCF-7.

2.2.1 Ensaios biológicos *in vitro*

2.2.1.1 Avaliação da viabilidade celular

Os resultados referentes à atividade citotóxica apresentada pelo extrato bruto e frações de *C. sylvestris* sobre células MCF-7 estão apresentados na Figura 13 e Tabela 3.

Figura 13- Efeito citotóxico do extrato bruto (EB-ETOH) e das frações clorofórmica (f-CHCl₃), acetato de etila (f-EtOAc) e metanólica (f-MeOH) de *C. sylvestris* (7,8 – 250 µg/mL) sobre células MCF-7 após 24 horas de tratamento.



Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 3. Fonte: Dados do autor.

Segundo Suffines e Pezzuto (1990), em relação à citotoxicidade, somente extratos que apresentam valor de $CI_{50} < 200$ µg/mL podem ser considerados ativos. Essa preconização foi considerada e, nesse sentido, partindo-se dos valores de CI_{50} obtidos, pode-se observar que, com exceção da fração metanólica ($CI_{50} > 250$ µg/mL), todos os extratos causaram importante efeito citotóxico sobre células MCF-7 (Tabela 3). Esses resultados corroboram a literatura, uma vez que tem sido comprovado o efeito citotóxico de extratos obtidos de diferentes partes (casca, frutos e folhas), bem como do óleo essencial isolado da planta sobre as seguintes linhagens tumorais humanas: SF 295, HCT-8, MDA-MB 435, HL-60, A-549, A2058, HeLa, MCF-7, U-87, Siha, B16F10Nex2 e HT-29 (DA SILVA et al., 2008b; MESQUITA et al, 2009; BOU et al., 2013).

Tabela 3 - Valores de CI_{50} (μM) determinadas para extrato bruto (EB-ETOH), fração clorofórmica (f- $CHCl_3$), fração acetato de etila (f-EtOAc) e fração metanólica (f-MeOH) de *C. sylvestris* em cultura de células MCF-7 tratadas por 24 h com os respectivos extratos (7,8 – 250 $\mu g/mL$).

Extratos/ Tratamentos	CI_{50} ($\mu g/mL$)
EB-ETOH	141
f-$CHCl_3$	66
f-EtOAc	179
f-MeOH	>250

Fonte: Dados do autor.

Diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris* (casearinas e caseargrewiina F) têm demonstrado efeito citotóxico sobre diversos microorganismos e as seguintes linhagens celulares transformadas: LX-1, HCT, 116, A 2780, MOLT-4, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295, L-929 (CARVALHO et al., 1998; BOLZANI et al., 1999; OBERLIES, 2002; SANTOS et al., 2010).

O sesquiterpeno α -zingibereno isolado do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* causou citotoxicidade em células HeLa, U-87, Siha e HL60, entretanto, tal citotoxicidade demonstrou-se inferior à observada pelo tratamento dessas linhagens celulares com o óleo essencial bruto (BOU et al., 2013). Atualmente não existe nenhum estudo acerca da atividade citotóxica de β -cariofileno e δ -humuleno isolados do óleo da planta, entretanto, tais compostos isolados de outras plantas e/ou obtidos sinteticamente, mostraram importante citotoxicidade sobre células A-549, DLD-1, M4BEU, HeLa, Bel-7402, CT-26, C32, LNCaP e carcinoma de Ehrlich (LEGAULT et al., 2003; SYLVESTRE et al., 2005; HOU et al., 2006; SYLVESTRE et al., 2006; TUNDIS et al., 2009; DA SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007). Ainda em relação à compostos isolados das folhas de *C. sylvestris*, Da Silva, Chaar e Yano (2009), mostraram a atividade citotóxica dos derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) sobre células do carcinoma de Ehrlich.

2.2.1.2 Avaliação da atividade antiproliferativa

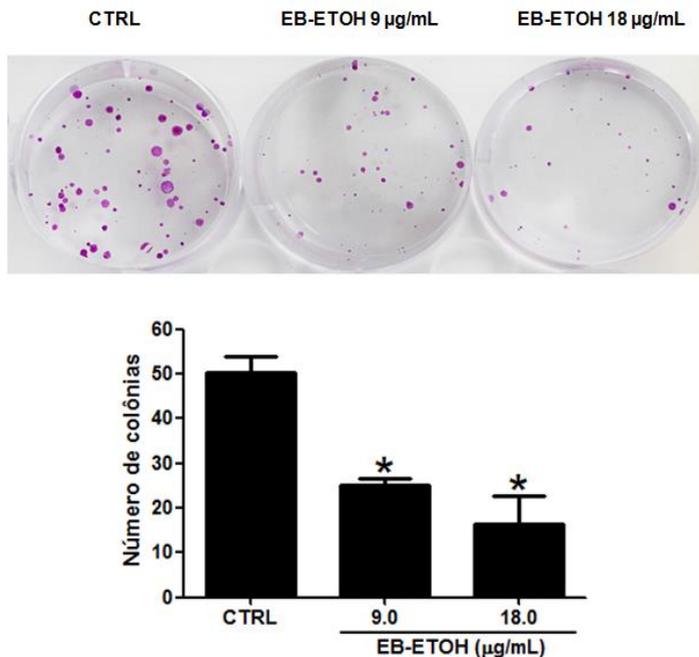
A atividade antiproliferativa apresentada pelo extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris*, bem como o mecanismo de ação envolvido na mediação deste efeito foi avaliado através da execução do ensaio de formação de colônias, determinação do percentual de células

em cada fase do ciclo celular e avaliação da expressão de marcadores do ciclo celular e do fenótipo senescente.

2.2.1.2.1 Ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico

As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados obtidos em relação a avaliação da atividade anticlonogênica do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris*.

Figura 14 - Efeito anticlonogênico do extrato bruto (EB-ETOH) de *C. sylvestris* administrado nas concentrações de 9 e 18 $\mu\text{g/mL}$ sobre células MCF-7 cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento.

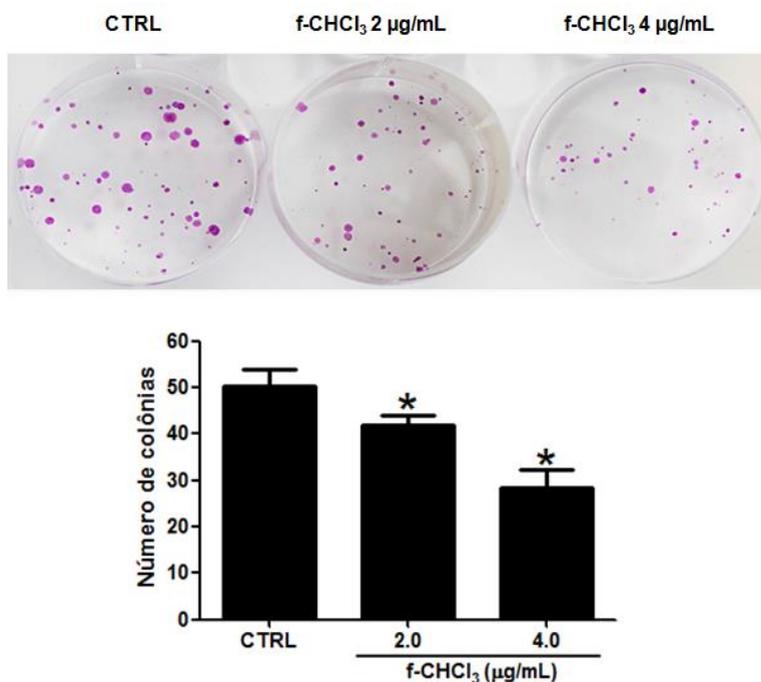


Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

Tanto EB-ETOH quanto f- CHCl_3 apresentaram um importante efeito anticlonogênico, reduzindo significativamente o número de colônias quando administrados a partir das concentrações de 9 e de 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os melhores resultados observados referem-se ao tratamento de células MCF-7 com EB-ETOH (18 $\mu\text{g/mL}$) e f- CHCl_3

(4 $\mu\text{g/mL}$), onde tais tratamentos promoveram uma redução do número de colônias em torno de 67 e de 43%, respectivamente. EB-ETOH e f- CHCl_3 quando administrados nas concentrações de 36 e de 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, foram capazes de causar morte clonogênica. Os dados obtidos sugerem que EB-ETOH e f- CHCl_3 apresentam importante atividade anticlonogênica quando administrados em concentrações subtóxicas, a qual pode ser decorrente da ação citotóxica e/ou antiproliferativa dos respectivos extratos. Por fim, cabe ressaltar que o tratamento com f- CHCl_3 apresentou-se mais efetivo nesse parâmetro, uma vez que f- CHCl_3 promoveu uma redução no número de colônias semelhante a induzida por EB-ETOH, entretanto em concentrações menores (Figuras 14 e 15).

Figura 15 - Efeito anticlonogênico da fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* administrada nas concentrações de 2 e 4 µg/mL sobre células MCF-7 cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento.



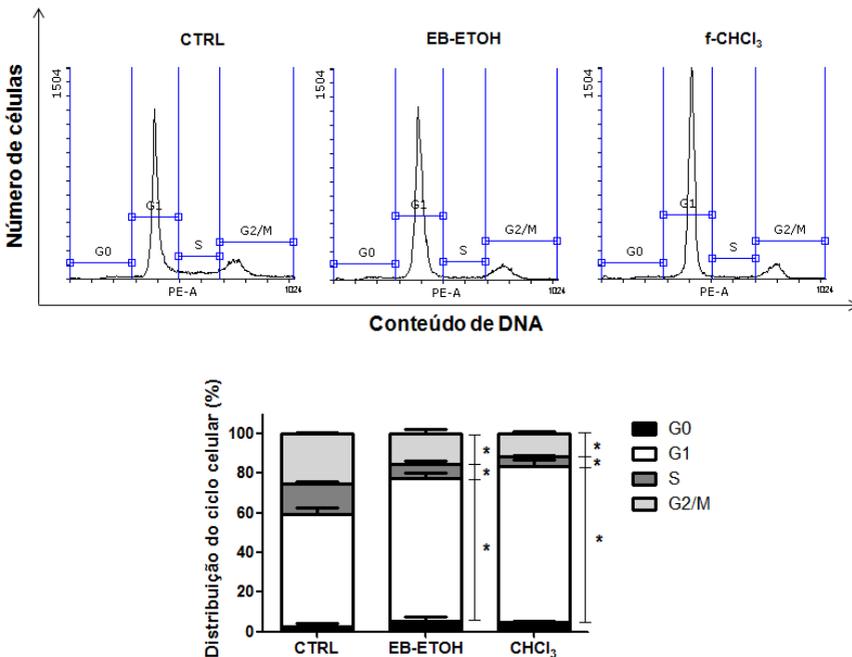
Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

2.2.1.2.2 Análise do ciclo celular

Na Figura 16 são apresentados os resultados da avaliação do ciclo celular de células MCF-7 após 48 h de tratamento com os extratos de *C. sylvestris* administrados em concentrações equivalentes a CI₂₀ de 24 h determinada após a execução do método do MTT. Os resultados estão expressos como porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Observaram-se alterações significativas no número de células presentes em todas as fases do ciclo celular, em comparação ao grupo

controle. O tratamento realizado com EB-ETOH reduziu o número de células nas fases G2/M e S em torno de 38,9 e de 51,9%, respectivamente, além de ter elevado o número de células na fase G1 aproximadamente em 21,4%, quando comparado ao controle. O tratamento realizado com f-CHCl₃ apresentou perfil semelhante ao mostrado por EB-ETOH, reduzindo o número de células nas fases G2/M e S em torno de 53,9 e de 66,2%, respectivamente, e elevando o número de células na fase G1 em 27,8%, quando comparado ao controle (Figura 16). Tais resultados sugerem que a atividade anticlonogênica apresentada por ambos extratos está relacionada à capacidade dos mesmos em paralisar o ciclo celular na fase G1, demonstrando também o provável efeito antiproliferativo de EB-ETOH e f-CHCl₃.

Figura 16 - Efeito do extrato bruto (EB-ETOH - 56,4 µg/mL) e fração clorofórmica (f-CHCl₃ - 26,4 µg/mL) de *C. sylvestris* sobre a progressão do ciclo celular de células MCF-7 cultivadas *in vitro* após 48 horas de tratamento.

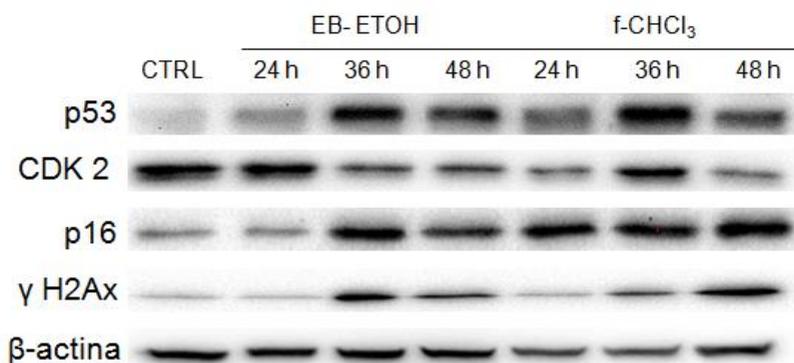


Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

2.2.1.2.3 Avaliação da expressão de marcadores do ciclo celular e de dano ao DNA

Os resultados obtidos em relação à avaliação da expressão de algumas proteínas que controlam o ciclo celular e/ou que estão relacionadas a indução de senescência em células MCF-7 tratadas com EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, são apresentados na Figura 17.

Figura 17 - Efeito do extrato bruto (EB-ETOH) e fração clorofórmica (f-CHCl₃) de *C. sylvestris* sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular e a indução de senescência.



Imunoblots foram realizados após a exposição de células MCF-7 por 24, 36 e 48 h ao EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris* nas concentrações de 56,4 e de 26,4 µg/mL, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Como pode-se observar, tanto EB-ETOH (56,4 µg/mL) quanto f-CHCl₃ (26,4 µg/mL), foram capazes de elevar, a partir de 24 h de tratamento, a expressão de p53. A expressão desse gene supressor tumoral permaneceu elevada até 48 h de tratamento (período em que foi observada a parada do ciclo celular), sendo tal elevação mais marcante após 36 h de incubação com os extratos teste (Figura 17).

Em relação à CDK2, foi demonstrado que EB-ETOH (56,4 µg/mL) e f-CHCl₃ (26,4 µg/mL) reduziram significativamente a expressão desta cinase dependente de ciclina a partir de 36 e 24 h de incubação, respectivamente, permanecendo tal redução até 48 h de tratamento. Além disso, estes extratos elevaram a expressão de gama-

H2Ax a partir de 36 h de tratamento, estendendo-se este efeito para 48 h de tratamento. Por fim, EB-ETOH (56,4 µg/mL) e f-CHCl₃ (26,4 µg/mL) elevaram a expressão de p16 a partir de 36 e 24 h de incubação, respectivamente, permanecendo tal efeito até 48 h de tratamento (Figura 17).

Os resultados obtidos permitem sugerir que tanto EB-ETOH quanto f-CHCl₃ promoveram a parada do ciclo celular em G1 provavelmente ao impedirem a dissociação do complexo pRb-E2F. Os tratamentos podem ter realizado esta ação ao reduzirem diretamente a expressão de CDK2 e/ou ao elevarem a expressão de p21 (via elevação de p53) e p16 promovendo a inibição de CDK2 e CDK4/6, respectivamente. A elevação da expressão de p53, p16 e de gama-H2Ax (marcador sensível de dano à fita dupla do DNA) e redução da expressão de CDK2, associada ao potente efeito antiproliferativo e parada do ciclo celular promovida pelos extratos testes, indicam ainda que os mesmos podem estar induzindo senescência celular. Salienta-se a necessidade de se realizar experimentos específicos para a verificação da indução de senescência a fim de confirmar-se a hipótese levantada.

Por fim, ressalta-se que para a execução destes ensaios utilizou-se concentrações subtóxicas de ambos extratos, evidenciando que as alterações no ciclo celular e na expressão ou fosforilação de proteínas aqui visualizadas, refere-se provavelmente à atividade antiproliferativa e não citotóxica dos mesmos.

Em um estudo recente, Bento et al (2013) mostraram o efeito antiproliferativo dos extratos etanólicos de *C. sylvestris* e *C. decandra* sobre fungos responsáveis pelo apodrecimento de madeiras. Além disso, a atividade antiproliferativa do extrato bruto e da fração clorofórmica de *C. sylvestris* sobre células do carcinoma de Ehrlich já foram devidamente demonstradas por nosso grupo de pesquisa (FELIPE, 2010). Nesse estudo, tal atividade foi avaliada através da realização do ensaio da incorporação de timidina, mostrando que ambos extratos são capazes de reduzir a replicação do DNA, o que corrobora diretamente a significativa redução da fase S induzida pelos extratos e observada no presente trabalho.

Dados da literatura comprovam o efeito antiproliferativo de diterpenos clerodânicos, sesquiterpenos e agentes polifenólicos. Diterpenos clerodânicos isolados de *Mitrephora thorelii* tem apresentado efeito antiproliferativo sobre células de hepatoma humano BEL7402 (MENG et al., 2010). Já caseamembrinas, que tratam-se dos diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia membranaceae*, foram capazes de reduzir a proliferação de células de câncer de próstata

humano PC-3 (HUANG et al., 2004). Itokawa et al (1990) observaram o efeito antiproliferativo de casearinas (incluindo-se a casearina C) sobre a linhagem tumoral V-79, de hamster chinês. Por fim, Ferreira e colaboradores (2010), demonstraram que a casearina X isolada de *C. sylvestris* é capaz de reduzir a síntese de DNA em células leucêmicas HL-60, sendo este efeito observado quando foram administradas doses subtóxicas deste composto e corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Sesquiterpenos vêm sendo frequentemente avaliados quanto ao seu potencial antiproliferativo sobre diversas linhagens tumorais. Estudos demonstraram que β -elemeno, foi capaz de inibir a proliferação de células T 24 e HepG2 (DAÍ et al., 2013; LU et al., 2013). Já o sesquiterpeno β -ionona mostrou efeito antiproliferativo sobre células de câncer de próstata humano DU-145, LNCaP e PC-3 (JONES et al., 2013). Por fim, foi relatado que β -cariofileno, diminui a proliferação de células K562 (LAMPRONTI.; SAAB.; GAMBARI, 2006) e que α -humuleno inibe a proliferação de células A-549, DLD-1 e LNCaP (LEGAULT et al., 2003; LOIZZO et al., 2007). Em relação à fase, bem como a possíveis marcadores envolvidos no efeito antiproliferativo mediado por sesquiterpenos, tem sido demonstrado que β -ionona exerceu efeito antiproliferativo sobre células DU-145 e PC-3, ao promover o bloqueio do ciclo celular na fase G1, ao reduzir a expressão de CDK4 e ciclina D1 (JONES et al., 2013). Já o β -elemeno diminuiu a proliferação de células HepG2 ao induzir a paralização do ciclo celular na fase G2/M (DAÍ et al., 2013). Finalmente, Tin et al (2012) comprovaram que a artemisinina, um sesquiterpeno com ação antimalárica, é capaz de inibir a proliferação de células MCF-7 ao bloquear significativamente a fase G1 do ciclo celular, através da diminuição da expressão de CDK2, CDK4, ciclina D1, ciclina E e do fator de transcrição E2F1.

Ainda em relação aos compostos identificados na folha de *C. sylvestris* e que exercem efeito antiproliferativo, tem sido demonstrado que o ácido gálico e seus derivados, são capazes diminuir a proliferação de diversas linhagens celulares tumorais humanas, (HeLa, MDA-MB-231, L-132, MOLT-3, A549, MCF-7) (GOMES et al., 2003; HSU, 2011; MAURYA; NANDAKUMAR; DEVASAGAYAM., 2011). Huang et al (2012) observaram o efeito antiproliferativo do extrato aquoso de *Toona sinensis* rico em ácido gálico, sobre células leucêmicas HL-60. Tais autores demonstraram que este extrato exerceu tal efeito ao mediar o bloqueio da fase G1 do ciclo celular, através da diminuição da expressão dos seguintes marcadores do ciclo celular: ciclina D1, ciclina E, cinase dependente de ciclina 2, cinase dependente de ciclina 4 e indução da

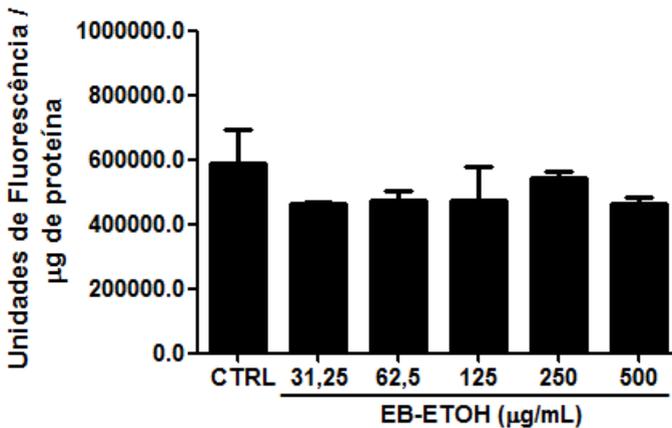
expressão do inibidor de CDK p27. Já Hsu et al (2011), verificaram que o ácido gálico é capaz de reduzir a proliferação de células MCF-7 ao estabilizar p27 e bloquear o ciclo celular na fase G2/M.

Atualmente não existe nenhum estudo acerca da capacidade de extratos e frações, bem como de compostos isolados de *C. sylvestris* em induzir senescência. Entretanto, já foi relatado que sesquiterpenos e compostos polifenólicos são capazes de promover este fenômeno, corroborando os resultados obtidos e hipótese levantada (YIN et al, 2011; COSTANTINO et al, 2013).

2.2.1.3 Relação entre a geração de estresse oxidativo e efeitos citotóxico e antiproliferativo induzido por EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris*

Para avaliar se as atividades citotóxica e antiproliferativa promovida pelo EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris* sobre células MCF-7 ocorre mediante a indução de estresse oxidativo, foi avaliada a geração de EROs pelo método do reagente fluorescente diclorofluoresceína.

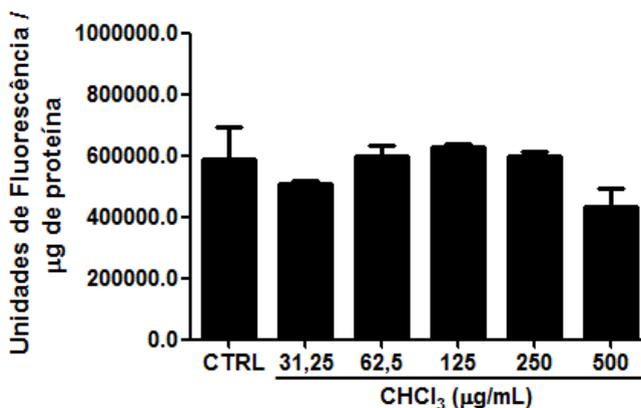
Figura 18 - Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 3 h de tratamento com o EB-ETOH (31,25 – 500 µg/mL) de *C. sylvestris*.



Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 3. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

Apesar de a literatura correlacionar amplamente o efeito citotóxico e antiproliferativo do ácido gálico e de sesquiterpenos sobre linhagens tumorais à geração de EROs (RUSSELL et al., 2012; CHEN et al., 2013; SOBHAN et al., 2013; YANG et al., 2013), a execução deste ensaio demonstrou que tanto o EB-ETOH, quanto a f-CHCl₃ de *C. sylvestris* não foram capazes de induzir a formação de espécies reativas, sugerindo que o estresse oxidativo não estaria envolvido no efeito antitumoral mediado por esses extratos (Figuras 18 e 19).

Figura 19 - Conteúdo intracelular de EROs em células MCF-7 determinado após 3 h de tratamento com f-CHCl₃ (31,25 – 500 µg/mL) de *C. sylvestris*.



Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 3. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

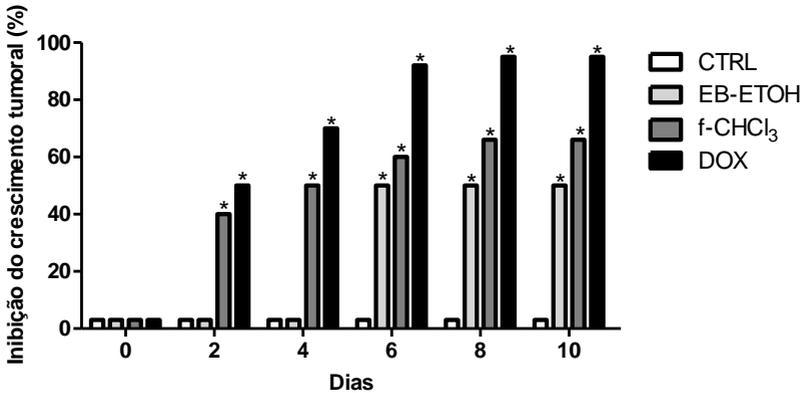
2.2.2 Ensaios biológicos *in vivo*

2.2.2.1 Avaliação da inibição do crescimento do tumor

Como pode-se observar na Figura 20 a avaliação da espessura da pata revelou que, ao final do tratamento (10^o dia), o crescimento do tumor foi reduzido significativamente pela administração de EB-ETOH (~50%), f-CHCl₃ (~65%) e DOX (~95%), quando comparados ao CTRL. Cabe ressaltar que os tratamentos realizados com f-CHCl₃ e DOX, foram capazes de promover uma redução significativa no tamanho do tumor a partir do 2^o dia de tratamento (f-CHCl₃ = 40%;

DOX = 50 %), enquanto que o EB-ETOH provocou efeito semelhante apenas a partir do 6º dia de tratamento (EB-ETOH = 50%).

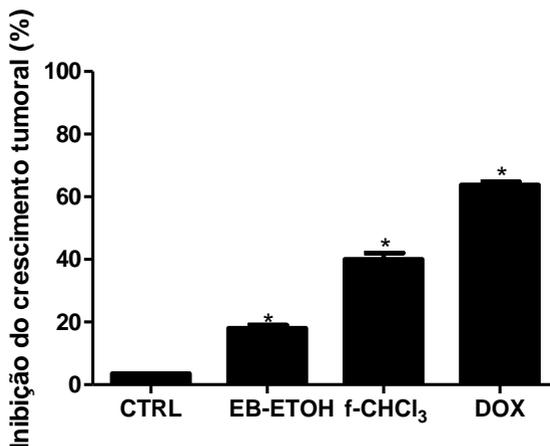
Figura 20 - Inibição do crescimento tumoral promovido pelos tratamentos (9 dias - i.p.) com doxorubicina (DOX - 1,2 mg/Kg), EB-ETOH (150 mg/Kg) e f-CHCl₃ (150 mg/Kg) em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, com base na espessura da pata.



Controle negativo (CTRL). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo. Fonte: Dados do autor.

Para se determinar de forma precisa a redução do tamanho do tumor mediada pelos tratamentos com EB-ETOH, f-CHCl₃ e DOX, foi mensurada a razão da massa tumoral/área do osso dos cortes histológicos das patas previamente tratadas com os respectivos extratos e composto e coradas com casson. A observação da Figura 21 demonstra que o tratamento com EB-ETOH, f-CHCl₃ e DOX foram capazes de reduzir a razão área da massa tumoral/área do osso em torno de 18, 40 e 63,8%, respectivamente, em relação ao CTRL, corroborando os resultados obtidos na análise macroscópica.

Figura 21 - Inibição do crescimento tumoral promovido pelos tratamentos (9 dias - i.p.) com doxorubicina (DOX - 1,2 mg/Kg), EB-ETOH (150 mg/Kg) e f-CHCl₃ (150 mg/Kg) em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, com base na razão da massa tumoral/área do osso.



Controle negativo (CTRL). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo. Fonte: Dados do autor.

Sugere-se assim que o tratamento do carcinoma de Ehrlich com o EB-ETOH e f-CHCl₃ de *C. sylvestris*, promoveu uma redução significativa no tamanho do tumor, observada através da mensuração das patas ao longo do tratamento (Figura 20), bem como da determinação da razão massa tumoral/área do osso dos cortes histológicos das patas previamente tratadas com os respectivos extratos (Figura 21). Tal redução pode estar diretamente relacionada à atividade citotóxica e antiproliferativa induzidas pelo tratamento com esses extratos sobre células do carcinoma de Ehrlich (FELIPE, 2010) cultivadas *in vitro*. Como mencionado anteriormente, redução semelhante foi observada em camundongos inoculados com TAE e posteriormente tratados com EB-ETOH, f-CHCl₃ (FELIPE, 2010), extrato supercrítico de *C. sylvestris* (FALCÃO-BUCKER, 2012) e extrato supercrítico de *Cordia verbenacea* rico em sesquiterpenos (α -humuleno e β -cariofileno) (PARISOTTO et al., 2012).

O efeito antitumoral *in vivo* de diterpenos clerodânicos tem sido relatado. Diterpenos clerodânicos isolados de *Mitrephora thorelii*, foram capazes de reduzir o crescimento tumoral em camundongos inoculados com células de hepatoma H22 (MENG et al., 2010), enquanto que os

diterpenos clerodânicos trans-deidrocrotonina e trans-crotonina, isolados de *Croton cajucara*, foram capazes de elevar a sobrevivência de camundongos inoculados com Sarcoma 180 e TAE (GRYNBERG et al., 1999). Por fim, Itokawa et al (1990) avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* de casearinas A - F isoladas das folhas de *C. sylvestris* sobre o sarcoma 180 inoculado em camundongos. Estes autores observaram que o tratamento dos animais com as casearinas foi capaz de reduzir significativamente o tamanho do tumor, sendo a casearina C um dos compostos mais eficazes, uma vez que atuou reduzindo em torno de 98% o crescimento tumoral quando administrada na concentração de 100mg/Kg pelo período de 6 dias.

Cabe ainda ressaltar que os dados obtidos nesse estudo com o extrato bruto e fração cloroformica, podem estar correlacionados aos achados de Da Silva, Chaar e Yano (2009), que também observaram uma redução no tamanho do tumor em camundongos implantados com carcinoma de Lewis e tratados com derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) extraídos das folhas da planta. Além disso, o ácido gálico vem apresentando efeito antitumoral e quimiopreventivo sobre câncer de pele e de cólon induzido em ratos (PERCHELLET et al., 1992; GIFTSON; JAVANTHI; NALINI, 2010).

Por fim, já foi descrito que os sesquiterpenos hirsutanol A e zerumbone apresentam efeito antitumoral sobre modelos experimentais xenográficos onde foram utilizadas células SW620 e MDA-MB 231, respectivamente (SEHRAWAT et al., 2012; YANG et al., 2013).

2.2.2.2 Avaliação do tipo de morte celular induzido

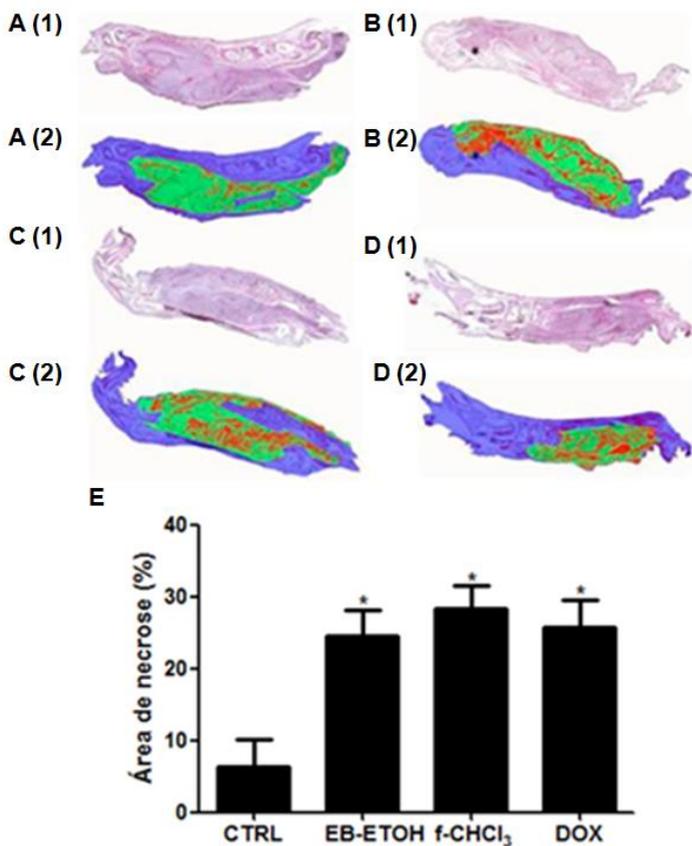
Apesar de alguns quimioterápicos levarem a morte de células malignas através da indução de apoptose, este não é o único tipo de morte celular capaz de eliminar células neoplásicas, uma vez que a necrose parece possibilitar uma forma alternativa de morte celular nos casos onde as vias de apoptose estão deficientes ou ausentes (SUN et al., 2006).

Como mencionado na seção anterior, o tipo de morte celular induzido pelo tratamento dos animais com EB-ETOH e f-CHCl₃ foi avaliado através da quantificação da porcentagem de necrose e apoptose (imunohistoquímica para caspase-3 clivada) na área tumoral dos cortes histológicos.

A quantificação da porcentagem de necrose na área tumoral permitiu observar que as amostras dos animais pertencentes ao grupo controle negativo apresentaram níveis de necrose em torno de 6,3%.

Entretanto, a necrose causada pelo tratamento dos animais com EB-ETOH (24,6%), f-CHCl₃ (28,4%) e DOX (25,8 %) foi bem mais elevada do que a apresentada pelos animais pertencentes ao grupo CTRL. Além disso, é importante destacar que os tratamentos realizados com EB-ETOH e f-CHCl₃ induziram um percentual de necrose semelhante ao promovido pelo tratamento com doxorrubicina (Figura 22).

Figura 22 - Necrose induzida pelos extratos de *C. sylvestris* em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.

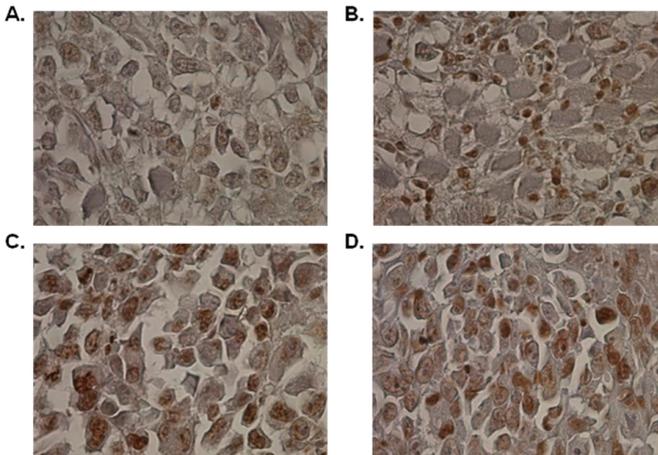


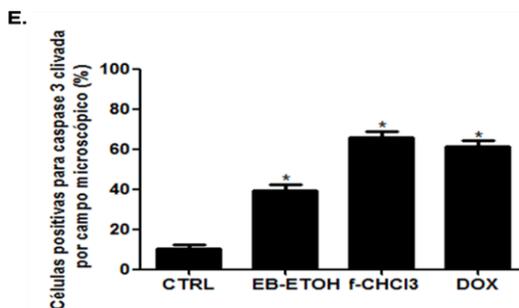
(A), (B), (C) e (D) representam cortes histológicos do tumor de animais pertencentes ao grupo controle negativo (CTRL) ou tratados por 9 dias com EB-ETOH e f-CHCl₃ (150 mg/kg), ou DOX (1.2 mg/kg), respectivamente. (E) Percentual de necrose no tecido tumoral. (1) Corte histológico do tumor corado com Casson. (2) Análise do corte histológico do tumor utilizando

o software *Cyclops Histopatological Tool* (CHPTool), onde a coloração azul, verde e vermelha representam, respectivamente, a área do osso, a massa tumoral e a área necrótica contida na massa tumoral. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo. Fonte: Dados do autor.

Já o ensaio de imunohistoquímica revelou um aumento no número de células positivas para a caspase-3 clivada, demonstrando uma elevação na indução de apoptose em amostras de tumores sólidos de animais tratados com EB-ETOH (40 %), f-CHCl₃ (65%) ou doxorubicina (60%) em comparação ao grupo controle negativo. Novamente, o tratamento realizado com f-CHCl₃ demonstrou-se tão eficaz quanto ao realizado com doxorubicina, pois a f-CHCl₃ induziu um percentual de apoptose semelhante ao promovido pelo tratamento com doxorubicina (Figura 23).

Figura 23 - Apoptose induzida pelos extratos de *C. sylvestris* em camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.





(A), (B), (C) e (D) representam cortes histológicos do tumor de animais pertencentes ao grupo controle negativo (CTRL) ou tratados por 9 dias com EB-ETOH e f-CHCl₃ (150 mg/kg), ou DOX (1.2 mg/kg), respectivamente. (E) Percentual de células positivas para caspase-3 clivada no tecido tumoral. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=6. (*) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo. Fonte: Dados do autor.

O efeito pró-apoptótico de diterpenos clerodânicos tem sido relatado. Diterpenos clerodânicos isolados de *Polyalthia cerasoides seeds* e de *Polyalthia longifolia* foram capazes de induzir apoptose em células CACO-2 e HL-60, respectivamente (RAVIKUMAR et al., 2010; SARI et al., 2013). Também foi demonstrado que a caseamembrina C, um diterpeno clerodânico isolado das folhas de *Casearia membranaceae*, exerce efeito citotóxico e antiproliferativo ao promover a 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 (HUANG et al, 2004). Whitson et al (2010), comprovaram que diterpenos clerodânicos isolados de *Casearia arguta*, particularmente a argutina B, foram capazes de sensibilizar células tumorais, bem como atuar em sinergismo com o ligante do receptor TRAIL, levando provavelmente a ativação da via extrínseca da apoptose. Já Ferreira et al (2010) observaram que a casearina X isolada de *C. sylvestris* foi capaz de promover a ocorrência de necrose e de apoptose em células leucêmicas cultivadas *in vitro*, sugerindo que a rápida ativação de vias apoptóticas podem ter culminado na indução de necrose.

Como mencionado anteriormente, além de diterpenos clerodânicos, outros compostos que foram isolados e identificados em folhas de *C. sylvestris*, tratam-se dos derivados do ácido gálico: IGDE e MGDE (DA SILVA, CHAAR, YANO, 2009). Até o presente momento, não foi observado se estes dois compostos são capazes de induzir

apoptose e/ou necrose em modelos experimentais *in vitro* e/ou *in vivo*, entretanto, a literatura dispõe de dados que demonstram a capacidade do ácido gálico mediar ambos os efeitos. Há relatos que indicam que a apoptose induzida pelo ácido gálico pode ocorrer através da ativação da via intrínseca, mediante a redução da expressão de Bcl-2 (KANG, JIN; ZHANG, 2009) ou extrínseca, mediante ao aumento da expressão de FASL (HSU; LO; YEN, 2007). Por fim, foi relatado que o ácido gálico é capaz de promover apoptose e necrose em células Hela (YOU et al., 2010) e células de câncer de pulmão A549 e Calu-6 (YOU et al., 2011), sendo estes processos acompanhados da perda do potencial de membrana e geração de espécies reativas do oxigênio.

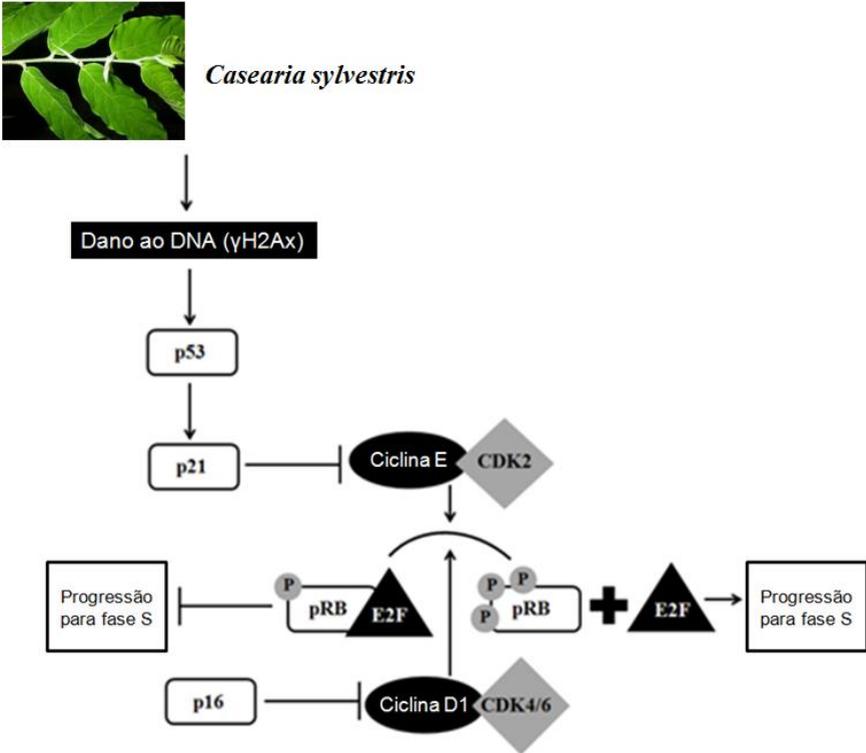
A atividade pró-apoptótica de sesquiterpenos identificados no óleo volátil das folhas de *C. sylvestris* também tem sido comprovada. O β -cariofileno isolado das folhas de *Ricinus communis* foi capaz de induzir apoptose em células de melanoma humano SK-MEL-28 (DARMANIN et al, 2009). Já Parisotto et al (2012) demonstraram a atividade pró-apoptótica o extrato supercrítico de *Cordia verbenaceae* rico em α -humuleno e β -cariofileno sobre células do carcinoma de Ehrlich, estando esta atividade associada à inibição da COX2, devido ao efeito antiinflamatório apresentado por estes compostos. Em relação à via da apoptose que é ativada por sesquiterpenos, foi comprovado que estes compostos são capazes de elevar a expressão dos receptores de morte TRAIL (ISHIBASHI; OHTSUKI, 2008) e FAS (DAÍ et al. 2013) e de seus respectivos ligantes, demonstrando que os mesmos promovem a ativação da via extrínseca da apoptose. Sesquiterpenos também são capazes de ativar a via intrínseca da apoptose. Li et al (2013b) mostraram que o sesquiterpeno β -elemeno é capaz de promover a ativação das caspases 3, 7 e 10, elevar a expressão de BAX e reduzir a expressão de membros antiapoptóticos (Bcl-x1 e Bcl-2) e inibidor de apoptose X (XIAP).

Apesar de até o presente momento ter sido identificado apenas a presença de casearina C nos extratos analisados neste trabalho, a atividade citotóxica, antiproliferativa e antitumoral dos mesmos pode estar diretamente relacionada à presença de outros diterpenos clerodânicos, derivados do ácido gálico (MGDE e IGDE) e sesquiterpenos (β -cariofileno, δ -humuleno e α -zingibereno), nas folhas da planta. A presença destes compostos na realização das ações mencionadas acima não é descartada pelo fato de que, para a identificação da casearina C, utilizou-se a 2ª subfração obtida a partir da cromatografia em coluna da fração clorofórmica. Tal subfração

mostrou-se mais purificada (pelo monitoramento através de cromatografia em camada delgada) do que a 1ª, facilitando a identificação de substâncias com possível atividade antitumoral, mas restringindo o número de compostos a serem avaliados.

Em suma, os resultados obtidos demonstram que o extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* apresentam um importante efeito antiproliferativo sobre células MCF-7, quando administrados em concentrações subtóxicas. Tal efeito possivelmente se deve ao fato de que esses extratos atuam bloqueando o ciclo celular na fase G1, ao promoverem o aumento da expressão de p53 (e conseqüentemente de p21) e de p16, bem como ao reduzirem a expressão de CDK2. A redução da expressão de CDK2 e a elevação da expressão de p16 e p21 (dois inibidores de CDKs), acarretam na diminuição da formação dos complexos ciclina E-CDK2 e ciclina D-CDK4/6, evitando a hiperfosforilação de pRB e conseqüente ativação do fator de transcrição E2F, induzindo dessa forma, a parada do ciclo celular em G1. Por fim, cabe ressaltar que EB-ETOH e f-CHCl₃ promovem a elevação da expressão e ativação de p53, ao induzirem danos ao DNA, detectados nesse trabalho pela verificação do aumento da expressão da γ H2Ax. Já os resultados *in vivo*, demonstram claramente o potencial antitumoral dos extratos avaliados sobre o carcinoma sólido de Ehrlich, o qual provavelmente está associado à indução de morte celular por apoptose e necrose. Os efeitos promovidos pelos extratos e observados no presente trabalho, devem-se em partes, à presença de casearina C nos mesmos.

Figura 24 - Hipótese do mecanismo de ação antiproliferativa do extrato bruto e fração clorofórmica de *Casearia sylvestris*.



Fonte: Adaptado de Maruyama et al., 2009.

A investigação do mecanismo do efeito antiproliferativo promovido pelo extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* permitiu a elaboração do artigo científico: “Sublethal concentrations of hydroethanol extract from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) and its chloroform fraction promotes cell cycle arrest on MCF-7 cells”, o qual foi submetido recentemente para o periódico *Phytomedicine* (Anexo A).

CAPÍTULO 3- Estudo da atividade antiproliferativa e antitumoral de fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio

1. MATERIAIS E MÉTODOS

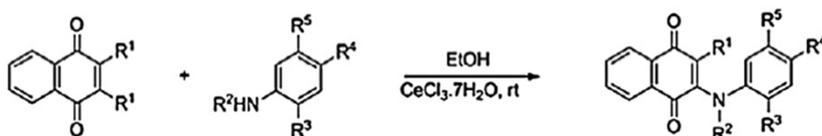
1.1 Reagentes e anticorpos

O meio de cultura modificado de Eagle (DMEM), soro fetal bovino e os antibióticos para a cultura de células foram obtidos da Gibco (EUA). O ascorbato de sódio, a albumina de soro bovino, o nocodazol e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os inibidores de MAPK PD98054, SB202190 e SP600125, bem como o coquetel inibidor de fosfatases foram originários da Calbiochem (Millipore) e da Calbiochem (Merck Biosciences), respectivamente. O substrato de fluorescência conjugado a 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Ac-DEVD-AFC) foi obtido da Enzo Life Sciences (EUA). Os anticorpos para JNK, p38 e ERK 1/2 foram adquiridos da Cell Signaling Technology (EUA). Os anticorpos para detecção de survivina, p53, p21, p27 e para poli (ADP- ribose) polimerase (PARP) foram originários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (EUA). Os anticorpos secundários foram adquiridos da Dako (Dinamarca) e Chemicon (Millipore, EUA). Todos os demais produtos químicos foram obtidos de reagentes de grau de pureza ACS.

1.2 Síntese das fenilaminonaftoquinonas

As fenilaminonaftoquinonas **7** [2-(4-hidroxianilino)-1,4-naftoquinona] e **9** [2-(4-metoxianilino)-1,4-naftoquinona] foram sintetizadas e gentilmente fornecidas pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Julio Benites, do Laboratório de Química Orgânica da Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. Tais compostos foram obtidos através da aminação de 1,4-naftoquinona com suas respectivas arilaminas, utilizando-se $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como catalisador ácido de Lewis, conforme a reação abaixo (BENITES et al., 2010):

Figura 25 - Reação de síntese e estrutura química das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9



R1, R2, R3 e R5 = H

R4 = OH para fenilaminonaftoquinona 7 e OCH3 para fenilaminonaftoquinona 9

Fonte: Adaptado de BENITES et al., 2010.

1.3 Cultura de células

Células T24 (carcinoma humano de bexiga) e BALB3-T3 (fibroblastos normais murinos) foram adquiridas junto ao *Ludwig Institute for Cancer Research*, Bruxelas-Bélgica. Os tipos celulares foram cultivados e mantidos a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Para o cultivo das células BALB3-T3, o soro fetal bovino foi substituído por soro de bezerro recém-nascido.

1.3 Ensaios biológicos

1.4.1 Ensaios biológicos *in vitro*

1.4.1.1 Avaliação da viabilidade celular

1.4.1.1.1 Ensaio do MTT

Este teste foi realizado conforme descrito no capítulo 2, item 1.7.1.1, entretanto, para esta avaliação, foram utilizadas células T24, as quais foram expostas pelo período de 24 h as fenilaminonaftoquinonas (1-50 µM), fenilaminonaftoquinonas (1 – 50 µM) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1mM). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

Em relação aos experimentos realizados para avaliar o envolvimento das MAPKS na citotoxicidade induzida pelo tratamento

com as fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio, procedeu-se da mesma maneira descrita no parágrafo anterior, com a diferença de que células T24 foram pré-tratadas pelo período de 2 horas com os seguintes inibidores de MAPKs: (a) PD98054 (10 μ M), (b) SB202190 (10 μ M) e (c) SP600125 (20 μ M), os quais tratam-se de inibidores de ERK 1/2, p38 e de JNK, respectivamente, e posteriormente expostas aos compostos teste (fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e em associação ao ASC).

Por fim, no caso dos ensaios realizados para avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na citotoxicidade induzida pelo tratamento com as fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio, adicionou-se junto aos tratamentos a enzima antioxidante CAT (100 U).

1.4.1.1.2 Ensaio da incorporação do corante azul de tripan

Para a realização deste teste, células foram semeadas em placas de 6 poços, em uma densidade celular de $1,5 \times 10^5$ células/mL e incubadas em estufa pelo período de 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se o tratamento das células, substituindo-se o meio, por outro contendo fenilaminonaftoquinonas (10 μ M), fenilaminonaftoquinonas (10 μ M) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1 mM). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

Após o tratamento das células pelo período de 24 horas, as mesmas foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 800 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Por fim, após a mistura de 10 μ l da suspensão celular com 10 μ l do corante azul de tripan, realizou-se a contagem celular no contador automático TC 10 (Bio-Rad, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em percentual de células viáveis.

1.4.1.2 Atividade de caspases

Para a execução deste ensaio, células T24 (2×10^6 célula/placa) foram semeadas em placas de Petri. Posteriormente, as células foram incubadas por 24 h para permitir sua aderência e tratadas com as fenilaminonaftoquinonas (10 μ M), fenilaminonaftoquinonas (10 μ M) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1 mM) pelo

período de 4 e de 24 horas. O controle negativo foi tratado com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO a 0,25%). Transcorrido esse tempo, o meio foi coletado e transferido para tubos do tipo falcon, as células foram lavadas com PBS (2X) e foram adicionados 200 µl de tampão de lise por poço. Com o auxílio de um hastel, realizou-se a retirada mecânica das células, as quais foram transferidas para os respectivos tubos falcon e gentilmente misturadas em vórtex, para completa lise. Posteriormente, incubou-se as amostras em gelo, sob agitação, por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 14 000 g, 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos. A seguir, adicionou-se 40 µl do extrato ácido a 950 µl do tampão de reação concentrado e 10 µl de um substrato peptídico específico para caspases, o Asp-Glu-Val-Asp-AFC (DEVD-AFC). A clivagem do substrato foi determinada cineticamente (0, 30, 60, 90 e 120s) a temperatura ambiente utilizando um fluorímetro a uma excitação de 380 nm e emissão de 500 nm. Uma curva de calibração foi construída a partir de diluições da solução padrão de AFC e usada para calcular a atividade de caspases nas amostras (KVIECINSKI et al, 2012). Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína, sendo que a proteína total das amostras foi avaliada pelo método de Lowry (LOWRY et al, 1951). Para a execução deste ensaio, utilizou-se como controle positivo, o flavonóide indutor de apoptose sanguinarina (5 µM) (ADHAMI et al, 2003).

1.4.1.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Este ensaio foi realizado conforme descrito no capítulo 2, item 1.7.1.2, entretanto, para esta avaliação, células T24 foram tratadas pelo período de 24 h com Q7 (2,5 µM), Q9 (1,0 µM), Q7 (2,5 µM) + ascorbato de sódio (1 mM), Q9 (1,0 µM) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1 mM) e incubadas por 24 h.

1.4.1.4 Análise do ciclo celular

Células T24 foram primeiramente plaqueadas em placas de 6 poços (50 - 100 X 10³ células/mL) pelo período de 24 h. A seguir, as mesmas foram sincronizadas com nocodazol (30 ng/mL) por 14 h. Decorrido este intervalo de tempo, as células foram tratadas por 24, 48 ou 72 h com Q7 (2,5 - 5 µM), Q9 (2,0 - 4 µM), Q7 (2,5 - 5,0 µM) + ascorbato de sódio (1 mM), Q9 (2,0 - 4,0 µM) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1 mM). Posteriormente, as mesmas foram cuidadosamente coletadas, lavadas e ressuspensas em

etanol (80 %) gelado, seguido de incubação *overnight* a -20°C . Uma vez fixadas, as células foram lavadas novamente em PBS e incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente, em uma solução de permeabilização (0,1% saponina, 1% de BSA e 0,2 mg/mL ribonuclease A) contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo. Por fim, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando-se o software *FlowJo*® e foi determinada a porcentagem de células agrupadas em cada fase do ciclo celular (HAMTIAUX et al., 2011).

1.4.1.5 Ensaio de senescência

Para avaliar a capacidade do extrato bruto e frações de *C. sylvestris*, das fenilaminonaftoquinonas, bem como das associações fenilaminonaftoquinona + ascorbato de sódio em induzir a senescência celular, foi mensurada a atividade da β -galactosidase ácida (β -gal). Tal teste foi executado utilizando-se o kit de coloração histoquímica de células senescentes (Sigma-Aldrich EUA) e seguindo o protocolo sugerido pelo próprio fabricante.

Placas de cultura de 24 poços contendo $1,9 \times 10^4$ células/poço e 1 mL de meio suplementado foram incubadas por 24 h. Transcorrido este período, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo Q7 (10 μM), Q9 (4 μM), Q7 (10 μM) + ascorbato de sódio (1mM), Q9 (4 μM) + ascorbato de sódio (1mM) ou somente ascorbato de sódio (1mM), e as células foram incubadas por mais 24 h, no que se refere ao tratamento com as fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio. O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%). Uma vez efetuado o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com meio fresco por mais 72 h. Decorrido este intervalo de tempo, as células foram lavadas com PBS (2x) e incubadas 7 minutos, à temperatura ambiente, com tampão de fixação (formaldeído 2%; glutaraldeído 0,2%; Na_2HPO_4 7,04 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; NaCl 0,137 M; KCl 2,68 mM). Depois de fixadas, as células foram lavadas novamente com PBS e posteriormente incubadas *overnight* com uma solução corante (ferricianido de potássio 400 mM; ferrocianido de potássio 400 mM; solução X-gal 40 mg/mL; solução de coloração), em condições controladas (temperatura de 37°C e atmosfera ausente de CO_2). Finalmente, as células foram visualizadas em microscópio para quantificação das células senescentes (coradas em azul) e não senescentes, bem como para avaliação da morfologia celular

característica de senescência. Foram avaliados 10 campos microscópicos de cada amostra, os quais continham aproximadamente 30 células. Os resultados foram expressos em percentual de células senescentes.

Em relação aos experimentos realizados para avaliar o envolvimento das MAPKs na senescência induzida pelo tratamento com as fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio, procedeu-se da mesma maneira descrita anteriormente, com a diferença de que as células foram pré-tratadas pelo período de 2 horas com os seguintes inibidores de MAPKs: (a) PD98054 (10 μ M), (b) SB202190 (10 μ M) e (c) SP600125 (20 μ M), que tratam-se de inibidores de ERK 1/2, p38 e de JNK, respectivamente.

1.4.1.6 Imunodeteção

Para avaliar possíveis modificações na expressão de MAPKs, marcadores do ciclo celular e a indução de clivagem da PARP, foi realizado o ensaio de imunodeteção conforme descrito no capítulo 2, item 1.7.1.4.

Neste procedimento foram utilizadas células T24, as quais foram tratadas com Q7 (5 e 10 μ M), Q9 (4 e 10 μ M), Q7 (5 e 10 μ M) + ascorbato de sódio (1 mM), Q9 (4 e 10 μ M) + ascorbato de sódio (1 mM) ou somente ascorbato de sódio (1 mM). O tempo de tratamento com fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio variou conforme a expressão das proteínas que foram avaliadas (15, 30 e 60 minutos para a verificação da expressão de MAPKs; 6, 12, 24, 48 e 72 horas para a verificação da expressão de marcadores do ciclo celular, bem como 24 horas para verificação da expressão da PARP). O controle negativo foi incubado somente com meio de cultura e a quantidade equivalente de veículo (DMSO a 0,25%).

1.4.1.7 Determinação da concentração intracelular de EROs

Este teste foi realizado conforme descrito no capítulo 2, item 1.7.1.5, entretanto, para esta avaliação, foram utilizadas células T24, as quais foram expostas pelo período de 1 h as fenilaminonaftoquinonas (2,5; 5; 10 μ M), associações fenilaminonaftoquinona (2,5; 5; 10 μ M) + ascorbato de sódio (1 mM) ou ascorbato de sódio (1 mM).

O controle negativo foi tratado com meio de cultura fresco e o volume respectivo de veículo (DMSO a 0,25%). O peróxido de hidrogênio (10 mM) foi utilizado como controle positivo.

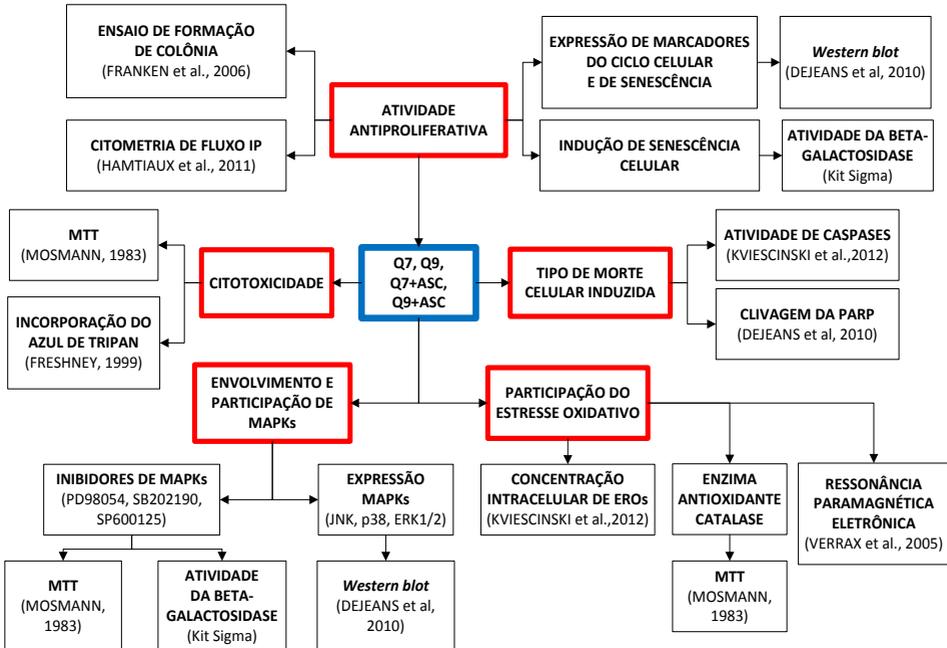
1.4.1.8 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Neste experimento, as fenilaminonaftoquinonas (10 e 100 μM) e o ascorbato de sódio (1 mM) foram solubilizados no momento da análise, em PBS aquecido à 37°C.

Os espectros de RPE foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Bruker EMX, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Ressonância Magnética Biomédica, coordenado pelo professor Dr. Bernard Gallez, do Instituto de Pesquisa em Drogas de Louvain, da Université Catholique de Louvain, Bélgica. Este equipamento possui uma cavidade cilíndrica, na qual foram introduzidos capilares contendo as amostras.

Os espectros foram gravados durante o intervalo de tempo de 20,9 segundos, sob as seguintes condições: temperatura de 37°C, frequência de microonda (9,785 GHz), modulação do campo magnético em 100 kHz, amplitude de modulação de 0,63 G e potência de microondas de 5 mW (VERRAX et al., 2005).

Figura 26 - Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo *in vitro* de fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio sobre células T24, bem como dos mecanismos envolvidos na mediação destes efeitos.



Fonte: Dados do autor.

1.4.2 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do método de análise de variância *one-way* ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni ou Tukey-Kramer, quando apropriado, e admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando-se em consideração principalmente a baixa especificidade e eficácia dos fármacos antitumorais disponíveis atualmente, faz-se necessário a busca por novas moléculas e/ou terapias mais efetivas no combate do câncer (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009). Como mencionado anteriormente, células tumorais, são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, uma vez que apresentam altas concentrações de EROs e baixos níveis de defesas antioxidantes (VERRAX et al., 2011a). Dessa forma, quinonas tornam-se moléculas extremamente interessantes a serem investigadas, uma vez que, além de mediarem efeito antitumoral pela inibição de topoisomerases vinculada ou não à intercalação ao DNA, são capazes de promover a indução de estresse oxidativo via ciclo redox (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; MINOTTI et al., 2004; DE ALMEIDA et al., 2005).

Como mencionado anteriormente, nosso grupo de pesquisa associado a outros laboratórios (GTOX e grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Julio Benites) vem estudando sintetizando e estudando o potencial antitumoral de diversas quinonas. Recentemente foram sintetizadas 12 fenilaminonaftoquinonas, as quais foram submetidas a um estudo preliminar, o qual permitiu observar que, dos 12 compostos sintetizados, as fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 trataram-se das moléculas mais promissoras, as quais deveriam ser melhor investigadas em relação ao seu potencial antitumoral na busca de moléculas protótipos para a síntese de fármacos para o tratamento do câncer.

Dentro desse contexto, e tendo em vista a interessante hipótese de mecanismo de morte celular proposta pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Pedro Buc Calderón (potencialização do ciclo redox de quinonas pelo ascorbato de sódio), achou-se pertinente investigar se a associação de ASC às fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 seria capaz de potencializar a ação antitumoral apresentada por estes compostos. Assim, este trabalho foi realizado no sentido de avaliar a efetividade e especificidade dessas associações, bem como levantar possíveis mecanismos envolvidos na mediação desses efeitos (mediados pelas fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio).

2.1 Avaliação da viabilidade celular

Os resultados referentes à atividade citotóxica demonstrada pela associação de ascorbato de sódio (ASC) às fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 sobre células T24 estão apresentados nas Figuras 27 e 28 e Tabela 4.

Partindo-se dos valores de CI_{50} obtidos, pode-se observar que as duas fenilaminonaftoquinonas testadas apresentaram-se citotóxicas para células T24, sendo que a fenilaminonaftoquinona mais efetiva neste parâmetro foi Q7 ($IC_{50} = 27,1 \mu M$), seguida de Q9 ($IC_{50} = 44,3 \mu M$) (Tabela 4). Além disso, demonstrou-se que a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas é seletiva para células tumorais, pois os valores de CI_{50} obtidos após o tratamento dos fibroblastos BALB 3T3 com ambas fenilaminonaftoquinonas tratam-se de valores relativamente mais altos ($> 50 \mu M$) dos que os apresentados pelo tratamento das células T24 com estes compostos.

Tabela 4 - Valores de CI_{50} (μM) determinadas para fenilaminonaftoquinona Q7 e fenilaminonaftoquinona Q9 associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC) em cultura de células T24 e fibroblastos BALB 3T3 sob incubação de 24 h.

Compostos/ Tratamentos	Linhagens celulares	
	T24	Fibroblastos BALB 3T3
Q7	27,1	>50
Q7 + ASC	14,5	>50
Q9	44,3	>50
Q9 + ASC	16,9	>50

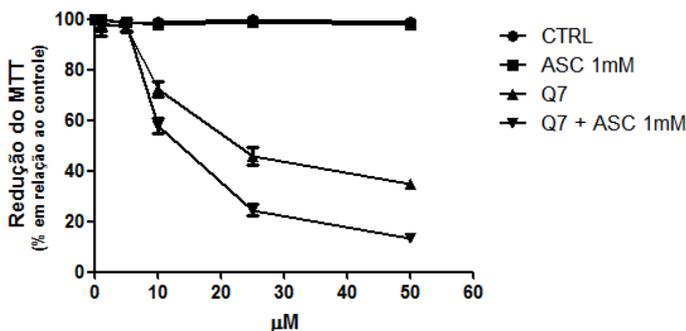
Fonte: Dados do autor.

Observou-se ainda que, em células T24, o ascorbato de sódio é capaz de potencializar o efeito citotóxico apresentado por ambos compostos (Q7 + ASC e Q9 + ASC elevaram em torno de 46,5 e de 61,9%, respectivamente a citotoxicidade induzida pelas quinonas administradas isoladamente), os quais passaram a apresentar valores de

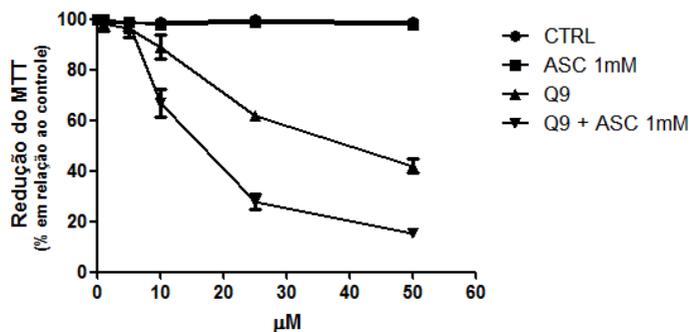
CI₅₀ relativamente próximos, quando administrados com o mesmo (Figura 27, Tabela 4). Por fim, foi demonstrado que a toxicidade induzida pela associação de fenilaminonaftoquinonas ao ascorbato apresenta seletividade sobre a linhagem tumoral avaliada, visto que os valores de CI₅₀ obtidos após o tratamento de fibroblastos BALB 3T3 (linhagem celular não tumoral) com essas associações, tratam-se de valores relativamente altos (> 50 μ M) e bem superiores aos obtidos após a exposição das células T24 com os mesmos tratamentos.

Figura 27 - Efeito citotóxico das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (0 - 50 μ M) ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.

A



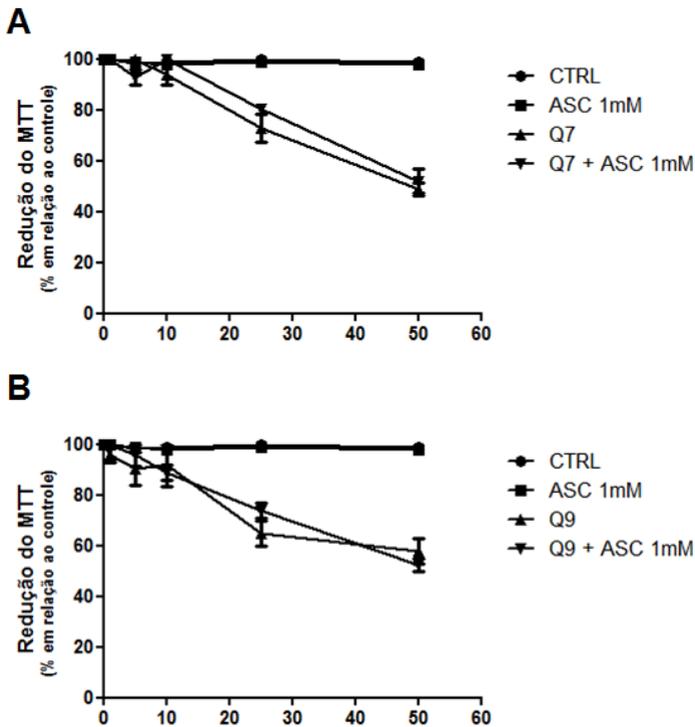
B



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. Fonte: Dados do autor.

Já em relação à citotoxicidade induzida nos fibroblastos BALB 3T3, foi mostrado que a associação de ascorbato de sódio as duas fenilaminonaftoquinonas, não potencializou o efeito tóxico das mesmas (Tabela 4, Figura 28).

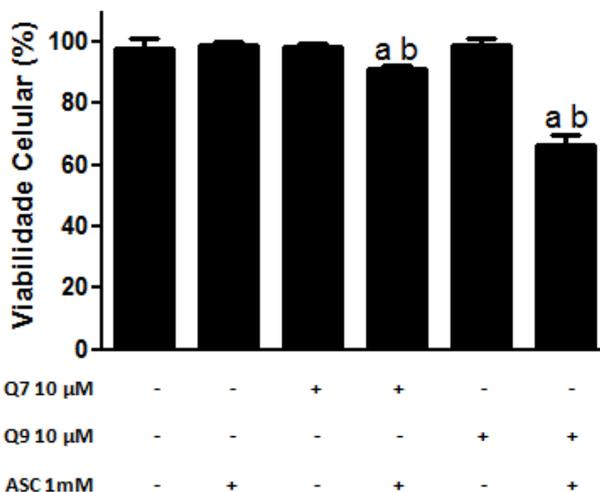
Figura 28 - Efeito citotóxico das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (0 – 50 μ M) ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células BALB 3T3 após 24 horas de tratamento.



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. Fonte: Dados do autor.

A realização do ensaio do MTT permitiu visualizar ainda que, em células T24, Q9 interage mais intensamente com o ascorbato de sódio que Q7, uma vez que a associação Q9 + ASC elevou a citotoxicidade induzida por Q9 em torno de 61,9%, enquanto que a associação Q7 + ASC potencializou o efeito citotóxico de Q7 em torno de 46,5% (Figura 27, Tabela 4).

Figura 29 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente (10 μ M) ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre a viabilidade de células T24 após 24 horas de tratamento.



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (a) e (b) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Ainda em relação à toxicidade induzida pelos compostos e associações sobre células T24, o ensaio da exclusão do corante azul de tripan permitiu observar que ambas fenilaminonaftoquinonas, quando administradas na concentração de 10 μ M, apesar de afetarem a função mitocondrial (percentual de redução do MTT para Q7= $72,3 \pm 3,2$ e para Q9= $88,9 \pm 4,7\%$) não foram capazes de alterar a integridade da membrana de células tratadas. Já as associações Q7 + ASC e Q9 + ASC, reduziram o percentual de células viáveis em torno de 6,8 e de 32,3%, respectivamente, demonstrando então, o efeito citolítico das mesmas. Cabe-se ressaltar que o tratamento mais efetivo nesse parâmetro trata-se da associação Q9 + ASC, demonstrando novamente que o ascorbato de sódio interage mais facilmente com esta quinona do que com Q7 (Figura 29).

Os dados obtidos nesse trabalho corroboram a literatura, onde tem sido mostrado que o ascorbato de sódio é capaz de potencializar o efeito citotóxico de diversas quinonas (exemplo menadiona, juglona, eurifurilbenzoquinonas e aminopirimidoisoquinolinequinonas) (VERRAX et al., 2007; BENITES et al., 2008b; VÁSQUEZ et al., 2011, KVIECINSKI et al. 2012), bem como de aumentar a especificidade da ação destes compostos sobre células tumorais (VERRAX et al., 2011b). Como mencionado anteriormente, nestes estudos, têm sido proposto que a elevação da citotoxicidade promovida pela associação de quinonas ao ascorbato deve-se ao fato desta vitamina reduzir de forma não enzimática as quinonas, levando a uma potencialização do ciclo redox e aumentando a geração de EROs, o que também poderia justificar a maior toxicidade induzida pela associação de fenilaminonaftoquinonas ao ascorbato de sódio observada neste trabalho.

2.2 Avaliação do tipo de morte celular induzida

Para verificar o envolvimento da apoptose na atividade citotóxica induzida por Q7 e Q9 e as associações dessas quinonas ao ASC, avaliou-se a atividade de caspases, bem como a clivagem da PARP. Como mencionado anteriormente, 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 que atuam na eliminação de células indesejáveis e danificadas, especialmente quando a lesão afeta o DNA (KUMAR et al., 2004). Em geral, esse mecanismo é desencadeado pela ativação de caspases, as quais podem ser subdivididas em dois grandes grupos: iniciadoras e efetoras. As caspases efetoras são as responsáveis pela ocorrência da apoptose em si, uma vez que atuam clivando várias proteínas e levando às alterações morfológicas e bioquímicas características deste processo (ROBERTSON; ORRENIUS, 2002). Já a PARP, trata-se de uma enzima nuclear de reparo, a qual é ativada quando o DNA é lesionado. Assim, nos estágios tardios de apoptose a PARP (a qual possui uma sequência DEVD) é clivada pela ação das caspases em dois fragmentos específicos (um de 116 KDa e outro de 89 KDa) para facilitar a ocorrência deste processo (HERCEG; WANG, 1999; KIM et al., 2000; WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012). Tanto a mensuração da atividade de caspases, quanto a clivagem da PARP, são consideradas marcadores do processo apoptótico.

2.3 Atividade de caspases

Os resultados referentes à mensuração da atividade de caspases após o tratamento de células T24 com Q7 e Q9 administradas isoladamente ou em associação com ASC, são apresentados na Tabela 5.

Como se pode observar, com exceção da sanguinarina (5 μM – 4 h), nenhum dos tratamentos efetuados foi capaz de aumentar significativamente a atividade de caspases em relação ao grupo controle.

Tabela 5 - Atividade DEVDase obtidos após o tratamento de células T24 com as fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μM) associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM), pelos períodos de 4 e 24 horas.

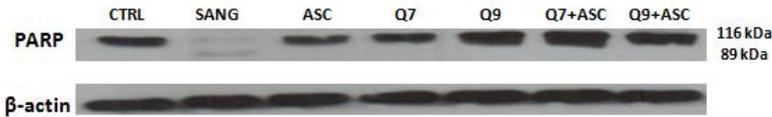
Tratamento	DEVDase 4 h (U/mg de proteína)	DEVDase 24 h (U/mg de proteína)
CTRL	7,5 \pm 3,2	21,3 \pm 2,0
Sanguinarina 5 μM (4h)	606,5 \pm 3,9 ^a	607,4 \pm 1,6 ^a
ASC 1 mM	6,1 \pm 1,6	18,2 \pm 0,7
Q7 10 μM	6,2 \pm 4,3	26,4 \pm 0,8
Q9 10 μM	7,0 \pm 2,5	23,5 \pm 1,3
Q7 10 μM + ASC 1 mM	4,5 \pm 4,0	23,8 \pm 0,3
Q9 10 μM + ASC 1 mM	4,3 \pm 0,1	24,3 \pm 2,2

(a) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

2.4 Clivagem da PARP

Como mencionado na seção anterior, a clivagem da PARP foi avaliada pela técnica de *Western blot* (imunoelctroforese) após o tratamento das células T24 com Q7 e Q9 administradas isoladamente ou em associação com ASC. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 30.

Figura 30 - Imunoeletroforese para a detecção da clivagem da proteína PARP em homogenato total de células T24 tratadas por 24 h com as fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μ M) associadas ou não ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM).



Sanguinarina 5 μ M foi utilizada como controle positivo. Fonte: Dados do autor.

Percebe-se que, com exceção da sanguinarina (5 μ M – 4 h), nenhum dos tratamentos efetuados foi capaz de clivar a PARP (uma proteína que na sua forma íntegra apresenta um peso molecular de 116 kDa), em um fragmento de aproximadamente 89 kDa. Esses resultados sugerem mais uma vez, que a atividade citotóxica de Q7 e Q9, bem como das associações dessas quinonas ao ascorbato de sódio, não está relacionada à ativação de caspases e a ocorrência de apoptose clássica, ou seja, apoptose dependente de caspase.

Tem sido citado na literatura que quinonas podem mediar seu efeito antitumoral através do desencadeamento tanto de necrose, como de apoptose. Pode-se citar como exemplo, um estudo realizado por Seshadri, Rajaram, Rajaram (2011), onde foi demonstrado que tratamentos com pumblagina ou juglona induzem a apoptose em linfócitos, observando-se nesse processo, a ativação da caspase-3. Além disso, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram a ativação da caspase-3 e o envolvimento da apoptose nos tratamentos realizados com menadiona e eurifurilbenzoquinonas (VERRAX et al., 2004; BENITES et al., 2008b).

Benites et al (2008b) demonstraram que a 2-eurifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona e que a 2-eurifurilbenzoquinona podem mediar efeito citotóxico em hepatoma de murino através da indução de necrose e apoptose, respectivamente. Os autores justificam seus resultados baseados nos valores dos potenciais de óxido-redução apresentados por estes compostos, onde a 2-eurifuril-3-nitro-1,4-benzoquinona, por possuir um alto potencial redox, seria mais susceptível ao processo de biorredução, mediando dessa forma, uma alta geração de EROs e levando conseqüentemente, ao desencadeamento da necrose. Já a 2-eurifurilbenzoquinona, por possuir um baixo potencial redox, seria menos susceptível à biorredução, levando a uma baixa geração de EROs e a ativação da apoptose, uma vez que a indução deste mecanismo de

morte é mediado por baixas concentrações intracelulares de espécies reativas do oxigênio (POWIS, G., 1987; MCGOWAN et al., 1996).

Por fim, em relação ao tipo de morte celular induzido pela associação de quinonas ao ascorbato de sódio, tem sido evidenciado que tais tratamentos promovem seus efeitos citotóxico principalmente através da indução de necrose (VERRAX et al., 2007; BENITES et al., 2008b; VÁSQUEZ et al., 2011).

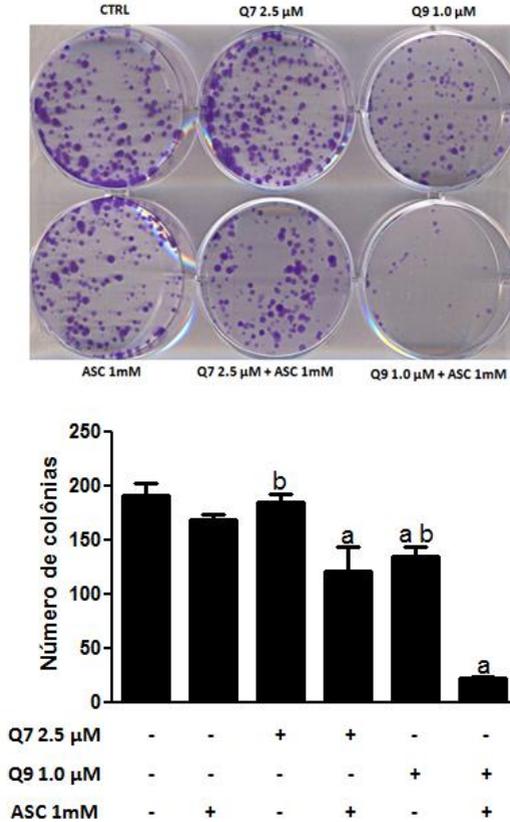
No presente trabalho, observou-se que tanto o tratamento com as fenilaminonaftoquinonas isoladas quanto associadas ao ascorbato de sódio não foram capazes de ativar as caspases, bem como clivar a PARP (Figura 26, Tabela 5). Além disso, a execução do ensaio de exclusão do azul de tripan permitiu observar que as associações Q7 (10 μ M) + ASC (1 mM) e Q9 (10 μ M) + ASC (1mM) apresentam efeito citolítico, ou seja, são capazes de causar a lise de células T24 expostas as mesmas (Figura 29). Sugere-se então que as associações de fenilaminonaftoquinonas ao ascorbato de sódio promovem seus efeitos citotóxicos através da indução de necrose.

2.5 Avaliação da atividade antiproliferativa

2.5.1 Ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico

A Figura 31 apresenta os resultados obtidos em relação a avaliação do potencial anticlonogênico da associação de fenilaminonaftoquinonas ao ascorbato de sódio.

Figura 31 - Efeito anticlonogênico das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 μM) e Q9 (1,0 μM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC- 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (a) e (b) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Q9 (1,0 μM) quando administrada isoladamente, apresentou importante atividade anticlonogênica (reduziu o percentual do número de colônias em torno de 29,7%), enquanto Q7 (2,5 μM) apresentou menor efeito, reduzindo o percentual do número de colônias em torno de 3,5%. A associação do ascorbato de sódio às fenilaminonaftoquinonas

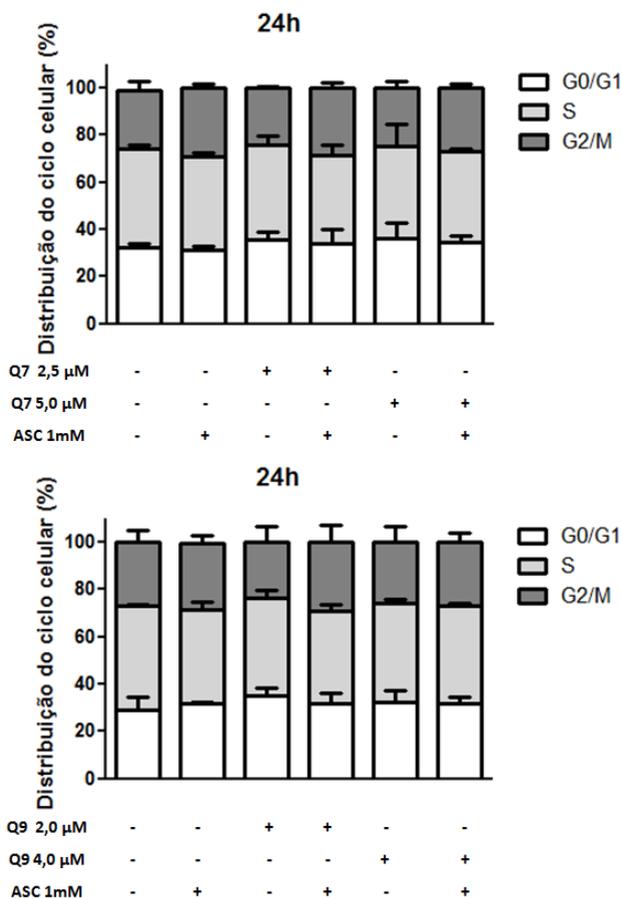
foi capaz de potencializar a atividade anticlonogênica das mesmas, uma vez que as associações Q7 (2,5 μM) + ASC (1 mM) e Q9 (1,0 μM) + ASC (1 mM), reduziram significativamente o percentual do número de colônias em torno de 36,7 e de 88,8%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. Os resultados aqui apresentados demonstram mais uma vez, que o ascorbato de sódio interage mais facilmente com Q9 do que com Q7, uma vez que a associação Q9 (1,0 μM) + ASC (1 mM), promoveu uma redução 2,4 vezes maior no percentual do número de colônias, do que o efeito causado por Q7 (2,5 μM) + ASC (1 mM) (Figura 31). Por fim, cabe ressaltar que o tratamento realizado somente com ascorbato de sódio (1 mM), não exerceu efeito anticlonogênico.

Os dados obtidos corroboram a literatura, onde se observa que quinonas como a juglona e aminopirimidoisoquinolinequinonas (uma classe de fenilaminonaftoquinonas) tem seu efeito anticlonogênico potencializado quando associadas a altas concentrações de ascorbato de sódio (KVIECISNKI et al., 2012, VÁSQUEZ et al., 2011).

2.5.2 Análise do ciclo celular

A proliferação celular é geralmente controlada pela passagem progressiva de uma célula, por três fases distintas (G0/G1, S e G2/M) do ciclo celular, sendo o bloqueio do ciclo, considerado uma das causas mais comuns da inibição da proliferação celular (HONG et al., 2011). Para verificar se Q7, Q9 e as associações Q7 + ASC e Q9 + ASC exercem efeito antiproliferativo ao bloquearem o ciclo celular, foi avaliada primeiramente a distribuição das células nas diferentes fases do mesmo.

Figura 32 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 μM) e Q9 (2,0 e 4,0 μM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 24 horas de tratamento.

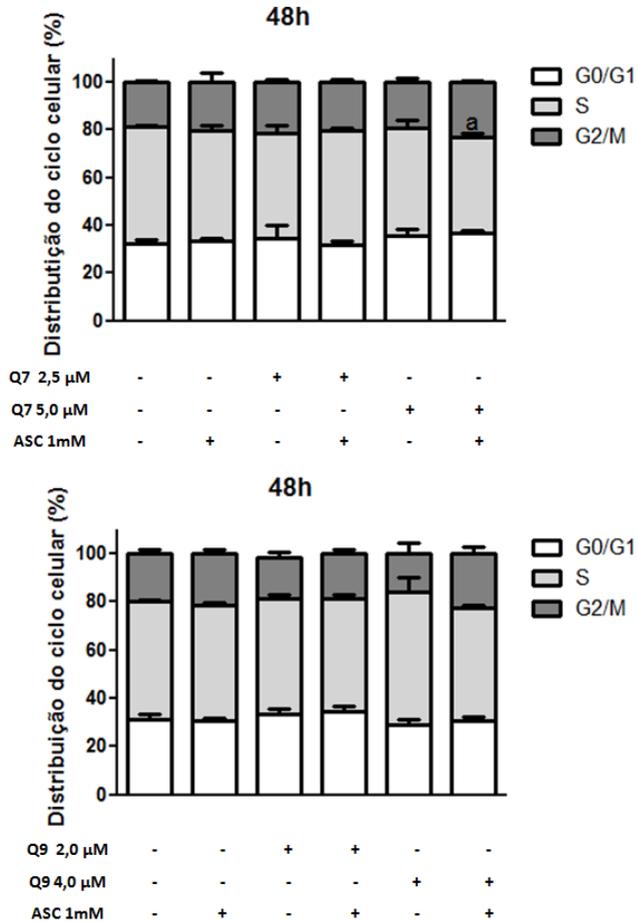


Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. Fonte: Dados do autor.

Nas Figuras 32, 33 e 34 são mostrados os resultados da avaliação do ciclo celular de células T24, após 24, 48 e 72 h de tratamento com as fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio. Os resultados estão expressos como porcentagem de

células em cada fase do ciclo celular. Nos períodos de 24 e 48 h de tratamento, nenhuma das quinonas e/ou associações foram capazes de promover alterações no ciclo celular (Figuras 32 e 33, respectivamente). Entretanto, após 72 h de incubação, observaram-se alterações significativas no número de células presentes na fase G2/M, em comparação ao grupo controle. O tratamento realizado com a associação Q9 (4 μM) + ASC (1 mM), reduziu o número de células na fase G2/M em torno de 34,8%. Já o tratamento realizado com a associação Q7 (5 μM) + ASC (1 mM), elevou em torno de 28,7%, o número de células presentes nessa fase do ciclo celular (Figura 34).

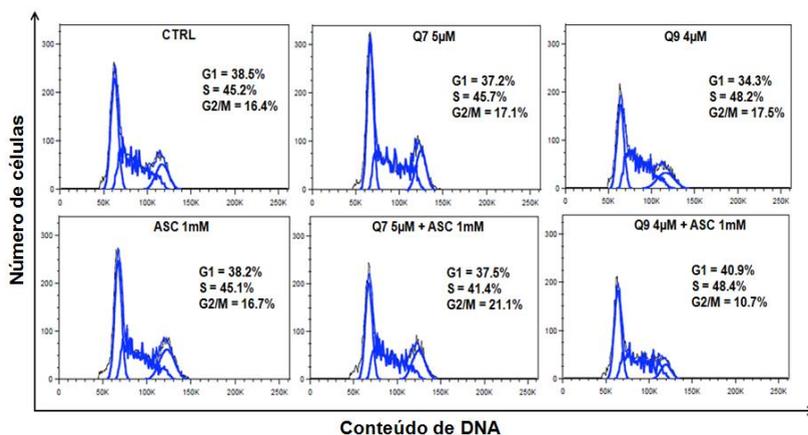
Figura 33 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 μM) e Q9 (2,0 e 4,0 μM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC - 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 48 horas de tratamento.

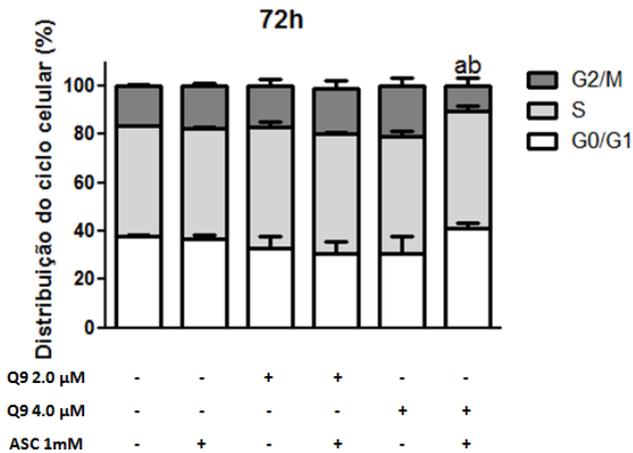
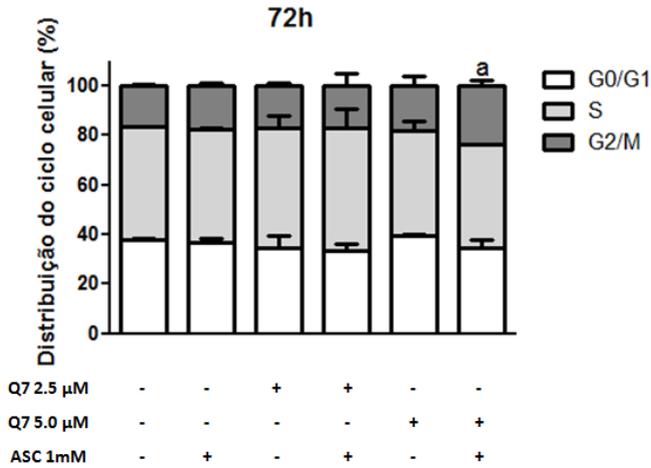


Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (a) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Fonte: Dados do autor.

Dessa forma, em ambos os casos, não foi caracterizado o bloqueio do ciclo celular, apenas uma alteração pontual na fase G2/M, entretanto, a observação desta modificação, associada ao potencial anticlonogênico das associações, demonstram que as mesmas exercem efeito antiproliferativo. Sugere-se que as associações Q7 + ASC e de Q9 + ASC sejam capazes de bloquear o ciclo se forem administradas por um maior período de tempo e/ou se as fenilaminonaftoquinonas forem administradas em concentrações mais elevadas.

Figura 34 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 e 5,0 μM) e Q9 (2,0 e 4,0 μM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre a progressão do ciclo celular de células T24 após 72 horas de tratamento.





Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (a) e (b) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

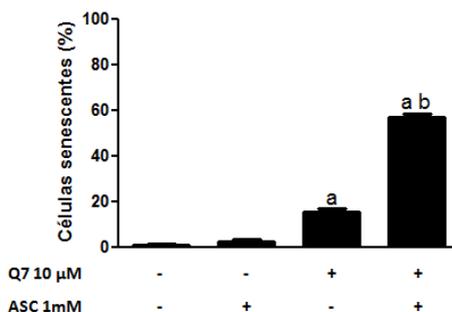
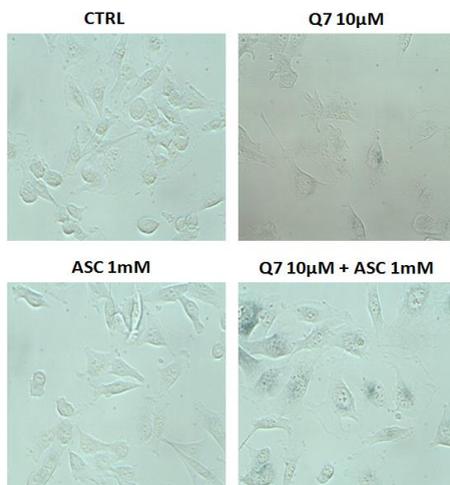
2.5.3 Ensaio de senescência

Outro aspecto relacionado ao mecanismo de ação envolvido na atividade antiproliferativa apresentada pelas quinonas administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio (visualizado pela execução do ensaio de formação de colônias), trata-se da possível indução de senescência celular, a qual poderia estar associada também

as modificações no percentual de células presentes na fase G2/M do ciclo celular.

Os resultados referentes à mensuração da atividade da β -galactosidase ácida após o tratamento de células T24 com Q7 e Q9 administradas isoladamente ou em associação com ASC, está demonstrado nas Figuras 35 e 36.

Figura 35- Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona Q7 sobre células T24. As figuras mostram a coloração citoquímica adquiridas pelas células T24 após seu tratamento com veículo (CTRL), ASC (1 mM), Q7 (10 μ M) e Q7 (10 μ M) + ASC (1 mM) pelo período de 24 horas.

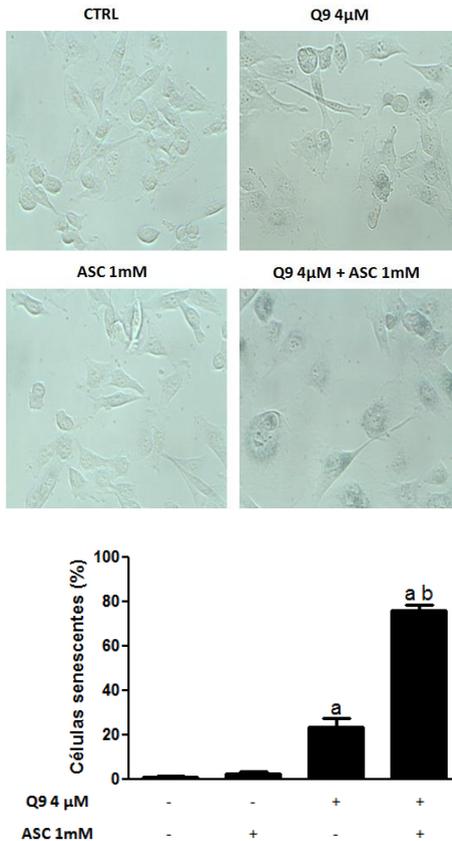


Células coradas em azul foram consideradas positivas para β -galactosidase ácida. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (a) e (b) representam diferença estatística

significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor

Como pode-se observar, Q7 (10 μM) e a associação Q7 (10 μM) + ASC (1 mM) elevaram significativamente a atividade da β -galactosidase ácida, aumentando o percentual de células senescentes em torno de 16 e de 57%, em relação ao grupo controle (Figura 35).

Figura 36 - Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona Q9 sobre células T24. As figuras mostram a coloração citoquímica adquiridas pelas células T24 após seu tratamento com veículo (CTRL), ASC (1 mM), Q9 (4 μM), Q9 (4 μM) + ASC (1 mM) pelo período de 24 horas.



Células coradas em azul foram consideradas positivas para β -galactosidase ácida. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, $n=3$. (a) e (b) representam diferença estatística

significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

A Q9 apresentou-se mais potente que Q7 neste parâmetro, uma vez que o tratamento realizado com Q9 (4 μM) e a associação Q9 (4 μM) + ASC (1 mM) elevou o percentual de células senescentes em torno de 23 e de 76 %, em relação ao grupo controle (Figura 36).

Por fim, pode-se observar que células T24 tratadas com as quinonas administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio apresentaram uma morfologia alterada e característica de processo senescente (células grandes e achatadas), quando comparadas com as células tratadas com veículo e/ou ASC (Figuras 35 e 36).

Esses dados indicam que possivelmente a atividade antiproliferativa, bem como modificações no ciclo celular promovidas por estes compostos e associações, pode estar relacionada a indução de senescência celular.

Diversas evidências apontam que a associação de quinonas ao ascorbato de sódio, é capaz de mediar efeito antitumoral, ao induzir senescência celular. Como mencionado anteriormente, foi observado que a associação de ascorbato de sódio a quinonas como juglona, eurifurilbenzoquinonas, e aminopirimidoisoquinolinequinonas é capaz de inibir a proliferação celular de diversas linhagens celulares tumorais (BENITES et al, 2008a; VÁSQUEZ et al, 2011, KVIECISNKI et al, 2012).

Além disso, tem-se observado que grande parte dos quimioterápicos que ativam a senescência, atuam ao mediar efeitos genotóxicos (CRESCENZI et al, 2013). Nesse contexto, vem sendo demonstrado, que quinonas como a menadiona e a juglona, quando associadas ao ascorbato de sódio, são capazes de promover dano ao DNA, evidenciando mais uma vez, a capacidade dessas associações em induzirem senescência (VERRAX et al, 2004; VERRAX et al, 2006; KVIECISNKI et al, 2012).

Sarangi et al (2012) observaram que a HSP90 pode atuar como uma barreira para a indução de senescência em células tumorais, ao uma vez que demonstraram que senescência celular induzida por quimioterápicos pode ser acelerada na ausência funcional desta chaperona. Trabalhos realizados por Beck et al (2009a) e Rios et al. (2012), demonstraram que o estresse oxidativo gerado pela associação de ascorbato de sódio à menadiona e a 3-acil-2-arilamino-1,4-naftoquinonas em células tumorais K562 promove a inativação da HSP90 e a degradação de suas proteínas clientes, sugerindo mais uma vez o efeito antitumoral induzido pela associação de quinonas ao

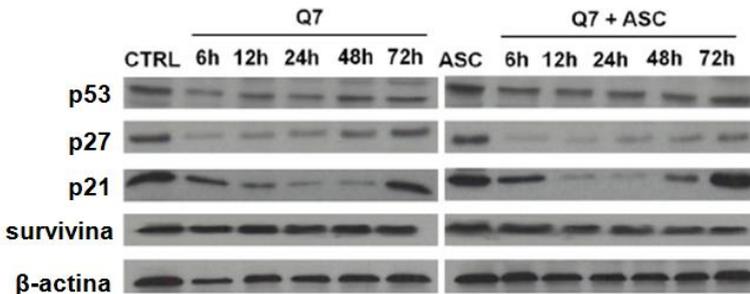
ascorbato de sódio, pode estar relacionado à promoção de senescência celular.

Outra característica correspondente ao fenótipo senescente induzido pelo tratamento com a associação de quinonas ao ascorbato de sódio, trata-se do fato de que as células tumorais submetidas a este tratamento, apresentaram-se resistentes à apoptose (VERRAX et al., 2004; VERRAX et al.2005; KVIECISNKI et al., 2012).

2.5.4 Avaliação da expressão de marcadores do ciclo celular e do fenótipo senescente

Os resultados obtidos em relação à avaliação da expressão de algumas proteínas que controlam o ciclo celular e que também estão relacionados à indução de senescência, são apresentados nas Figuras 37 e 38.

Figura 37 - Efeito da fenilaminonaftoquinona Q7 (5 μ M) administrada isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1mM) sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular.

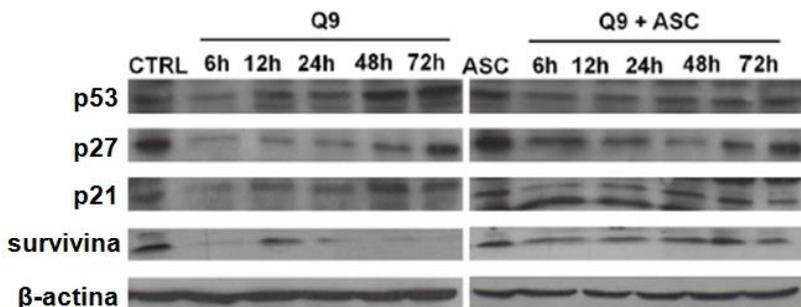


Imunoblots foram realizados após 6, 12, 24, 48 e 72 h de tratamento. Fonte: Dados do autor.

Q7 (5 μ M) quando administrada isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM) não modificou a expressão das proteínas p53 e survivina. Em relação ao marcador p21, o qual está envolvido no controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para S, Q7 (5 μ M) e Q7 (5 μ M) + ASC (1 mM) foram capazes de reduzir a expressão desta proteína nas primeiras 48 h de tratamento. Após 72h de tratamento, Q7 (5 μ M) restaurou a expressão deste marcador, e a associação Q7 (5 μ M) + ASC (1 mM) promoveu uma superexpressão do mesmo. Por fim, foi observado que o tratamento com Q7 (5 μ M) e com a associação Q7 (5

μM) + ASC (1 mM) reduziu a expressão da proteína p27, em todos os períodos de tempo avaliados (Figura 37).

Figura 38 - Efeito da fenilaminonaftoquinona Q9 (4 μM) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC) sobre proteínas que controlam a progressão do ciclo celular.



Imunoeletroforeses foram realizadas após 6, 12, 24, 48 e 72 h de tratamento. Fonte: Dados do autor.

Q9 (4 μM) quando administrada isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (1 mM) não modificou a expressão de nenhum dos marcadores avaliados, em todos os períodos de tempo analisados (Figura 38).

Apesar de não ter sido observado qualquer alteração na expressão dos marcadores que justificassem os resultados obtidos (atividade anticlonogênica e modificação do percentual de células na fase G2/M), este trabalho demonstrou a capacidade de Q7 + ASC e de Q9 + ASC afetarem o ciclo celular, bem como elevarem a atividade da β -galactosidase ácida. Como mencionado anteriormente, sugere-se que alterações na expressão dos marcadores avaliados poderiam ser melhor visualizadas se ambas associações forem administradas por um maior período de tempo e/ou se as fenilaminonaftoquinonas forem administradas em concentrações mais elevadas. Além disso, para estas avaliações, foram utilizados controles expostos por 72 h ao veículo de tratamento (meio de cultura), sugerindo a possibilidade de que o controle pode ter superexpressado proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da senescência em função da alta confluência nos poços de tratamento. Ainda, cabe-se ressaltar que não foram avaliados todos os marcadores do ciclo celular (como por exemplo ciclinas e quinases

dependentes de ciclina) e proteínas envolvidas na indução do fenótipo senescente (como por exemplo: pRb, p16).

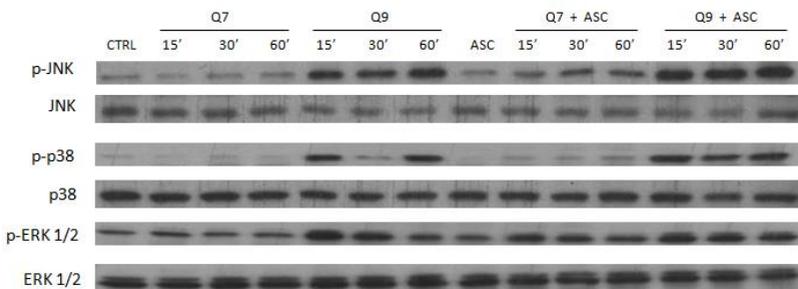
2.6 Avaliação da participação e ativação de MAPKs nos efeitos citotóxico e antiproliferativo induzidos por fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são proteínas,serina/ treonina quinases, que convertem estímulos extracelulares em uma ampla gama de respostas celulares, atuando por exemplo, no controle da expressão gênica, mitose, metabolismo, motilidade, sobrevivência, apoptose, diferenciação celular, dentre outros. As MAPKs mais conhecidas tratam-se das quinases reguladas por estímulos extracelulares 1 e 2 (ERK 1 e ERK 2), quinases aminoterminais c-JUN 1 a 3 (JNK 1 a 3) e p38 MAPKs (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) (MARUYAMA et al., 2009; CARGNELLO; ROUX, 2011).

Assim, para verificar se os efeitos citotóxicos e antiproliferativo apresentados pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio envolvem a ativação de MAPKs, foram avaliadas a expressão da forma fosforilada e não fosforilada das enzimas JNK, p38 e ERK 1/2 após o tratamento de células T24 com Q7 e Q9 administradas isoladamente ou em associação com ASC, bem como foi caracterizado o efeito dos inibidores de MAPKs PD98054 (10 μ M), SB202190 (10 μ M) e SP600125 (20 μ M) sobre a citotoxicidade e senescência induzida por estes tratamentos, através do método do MTT e atividade da β -galactosidase, respectivamente.

Como mencionado na seção anterior, a expressão e ativação de MAPKs foi avaliada pela técnica de *Western blot* (imunoeletroforese) após o tratamento das células T24 com Q7 e Q9 administradas isoladamente ou em associação com ASC, estando os resultados obtidos mostrados na Figura 39.

Figura 39 - Efeito das fenilaminonaftoquinonas Q7 (5 μM) e Q9 (4 μM) administradas isoladamente ou em associação a ASC (1 mM) sobre a ativação de MAPKs.



Imunoeletroforeses foram realizadas após o tratamento de células T24 pelos períodos de 15, 30 e 60 minutos. Fonte: Dados do autor.

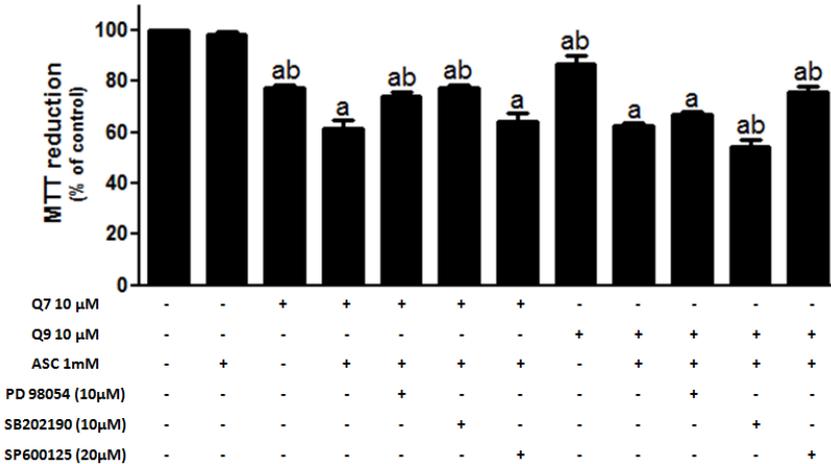
Percebe-se que Q7 (5 μM) quando administrada isoladamente não modificou a fosforilação de nenhuma das proteínas avaliadas, em nenhum dos períodos de incubação realizados. Já a associação Q7 (5 μM) + ASC (1 mM) foi capaz de promover uma pequena elevação na fosforilação de p-38, p-JNK e p-ERK 1/2, sugerindo que esse tratamento pode ter provocado um pequeno aumento da atividade dessas MAPKs (Figura 39).

Q9 (4 μM) e a associação Q9 (4 μM) + ASC (1 mM) causaram uma elevação na expressão da forma ativa de MAPKs que respondem ao estresse (p-JNK e p-38). Cabe ressaltar que embora Q9 (4 μM) quando administrada isoladamente tenha sido capaz de aumentar a expressão dessas enzimas, esse efeito não apresentou-se maior do que o promovido pelo tratamento das células com a associação Q9 (4 μM) + ASC (1 mM) (Figura 39).

Em relação ao ensaio do MTT realizado com o intuito de se verificar se a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas associados ao ascorbato de sódio está relacionada à ativação de MAPKs, foi demonstrado que a pré-incubação das células com PD98054 e SB202190, reverte parcialmente a toxicidade induzida por Q7 + ASC (em torno de 17,1 e de 20,5%, respectivamente), restaurando o índice de citotoxicidade induzida por Q7. Já o pré-tratamento das células T24 com SP600125 (inibidor de JNK), foi capaz de restaurar parcialmente (em

torno de 17,3%) a citotoxicidade causada por Q9 + ASC, atingindo o nível de toxicidade induzida por Q9 (Figura 40).

Figura 40 - Papel da via das MAPKs sobre a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μ M) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.



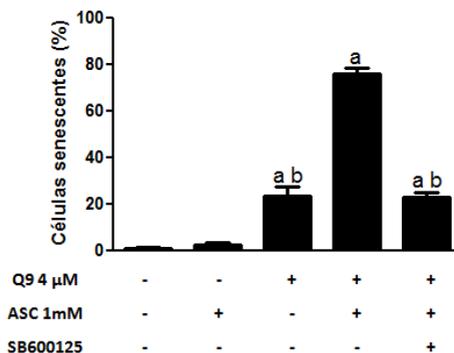
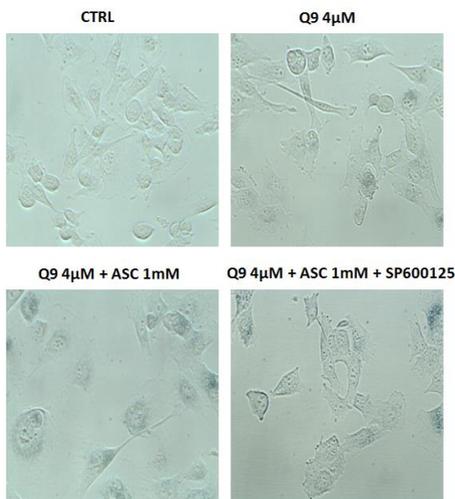
As células foram incubadas por 2 h com os inibidores PD98054 (inibidor de ERK 1/2 – 10 μ M), SB202190 (inibidor de p38 – 10 μ M) e SP600125 (inibidor de JNK – 20 μ M), previamente ao tratamento com fenilaminonaftoquinonas e associações. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (a) e (b) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com a associação fenilaminonaftoquinona + ascorbato de sódio, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Por fim, para avaliar o envolvimento de MAPKs na elevação da atividade da β -galactosidase ácida induzida pelo tratamento realizado com as fenilaminonaftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio, pode-se verificar que o aumento na atividade desta enzima induzido por Q9 (4 μ M) + ASC (1 mM) é parcialmente restaurado (atinge o nível de senescência induzida por Q9) pela pré-incubação das células com SP600125 (Figura 41). Entretanto, o pré-tratamento com SP600125 não causou qualquer alteração na da atividade da β -galactosidase ácida promovida por Q7 (10 μ M) + ASC (1 mM) (dado não mostrado).

A pré-incubação das células com os demais inibidores de MAPKs testados (PD98054 e SB202190), não foi capaz de promover

qualquer alteração na senescência induzida pelas fenilaminonaftoquinonas e suas associações ao ascorbato de sódio (dados não mostrados).

Figura 41 - Senescência induzida pela fenilaminonaftoquinona 9 (Q9) sobre células T24 e o bloqueio deste efeito pelo pré-tratamento das células com o inibidor de JNK SP600125.



As figuras mostram a coloração citoquímica adquiridas pelas células T24 após seu tratamento com veículo (CTRL), ASC (1 mM), Q9 (4 µM) e Q9 (4 µM) + ASC (1 mM) pelo período de 24 horas, bem como a coloração adquirida pelas células após seu pré-tratamento com o inibidor SP600125 (2 h), seguido pelo tratamento com Q9 (4 µM) + ASC (1 mM) por 24 h. Células coradas em azul foram consideradas positivas para β-galactosidase. Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n=3. (a) e (b) representam diferença estatística

significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com a associação fenilaminonaftoquinona + ascorbato de sódio, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Os resultados obtidos sugerem que o efeito tóxico da associação Q7 + ASC envolve a ativação das vias da p38 e ERK 1/2, enquanto que a citotoxicidade e provável senescência promovida por Q9 + ASC pode estar relacionada a ativação de JNK. Apesar de nenhum dos inibidores de MAPKs utilizados nesse trabalho tenham sido capazes de reverter a atividade da β -galactosidase ácida induzida por Q7 e Q7 + ASC, não descarta-se a possibilidade deste efeito estar relacionado à ativação dessas cascatas enzimáticas, uma vez que, como mencionado anteriormente, diversos estudos mostraram o envolvimento das mesmas na indução da senescência induzida por EROs. Entretanto, tal envolvimento depende do tipo e do contexto celular, visto que diferentes tipos celulares respondem ao mesmo estresse de maneiras diferentes, e que diferentes tipos de estresse são capazes de ativar diferentes vias de sinalização, dependendo do tipo de células (ARIVAZHAGAN, AYUSAWA, 2007; MARUYAMA et al., 2009). Nesse sentido, cabe ressaltar que diversos estudos apontam que a ativação de ERK 1/2 e p38 estão envolvidas tanto na indução de senescência prematura quanto na indução de senescência replicativa. Já o papel da via mediada pela JNK na senescência é bastante controverso, existindo relatos que apontam que a ativação de JNK é capaz de suprimir a senescência celular dependente de p53, enquanto outros afirmam que a ativação de JNK é capaz de modular positivamente a ocorrência de senescência replicativa e prematura (HÜTTER et al., 2002; ESPOSITO et al., 2004; MARUYAMA et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que outras quinonas (ex. menadiona), quando associadas ao ascorbato de sódio, promovem seus efeitos citotóxicos e/ou antiproliferativos via ativação da p38 MAPK, justamente uma MAPK envolvidas no mecanismo de transdução de sinal relacionado a resposta senescente associada ao estresse oxidativo (BECK et al., 2009b).

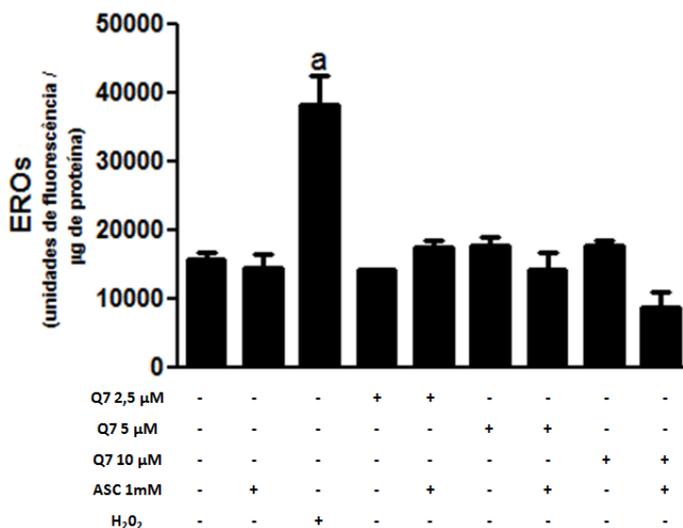
2.7 Participação do estresse oxidativo nos efeitos citotóxico e antiproliferativo induzido pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ou não ao ascorbato de sódio

Para confirmar se os efeitos citotóxicos e antiproliferativo apresentados pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio estão relacionados ao alto potencial redutor deste composto e potencialização do ciclo redox, foram avaliados: a formação de EROs

pelo método do reagente fluorescente diclorofluoresceína, a formação do radical ascorbil através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), bem como foi caracterizado o efeito da enzima antioxidante catalase sobre a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente ou em associação ao ASC, pelo método do MTT.

2.7.1 Determinação da concentração intracelular de EROs

Figura 42 - Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células T24 pelo período de 1 hora com a fenilaminonaftoquinonas Q7 (2,5 – 10 μM) e associação fenilaminonaftoquinona Q7 + ascorbato de sódio (1 mM) (Q7 + ASC).

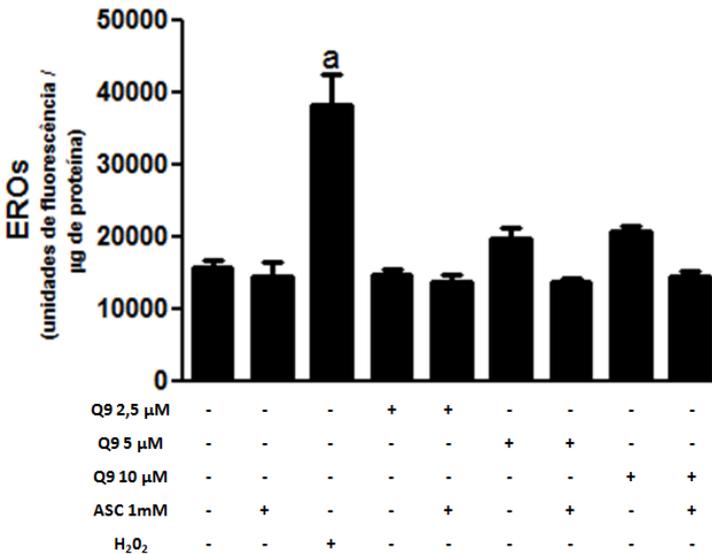


Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (a) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (CTRL). Fonte: Dados do autor.

As Figuras 42 e 43 mostram que, com exceção do H₂O₂ (10 mM), nenhum dos tratamentos realizados foi capaz de elevar a concentração intracelular de EROs de maneira significativa quando comparados ao grupo controle, sugerindo que os efeitos citotóxico e antiproliferativo apresentados pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ao ascorbato de sódio não estão relacionados à indução de estresse oxidativo via potencialização do ciclo redox, ou que a produção de EROs via ciclo redox é muito rápida e/ou pequena para ser detectada

pelo método da diclorofluoresceína, mas suficiente para promover os efeitos demonstrados.

Figura 43 - Conteúdo intracelular de EROs mensurados após o tratamento de células T24 pelo período de 1 hora com a fenilaminonaftoquinonas Q9 (2,5 – 10 μM) e associação fenilaminonaftoquinona Q9 + ascorbato de sódio (1 mM) (Q9 + ASC).



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (a) representa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (CTRL). Fonte: Dados do autor.

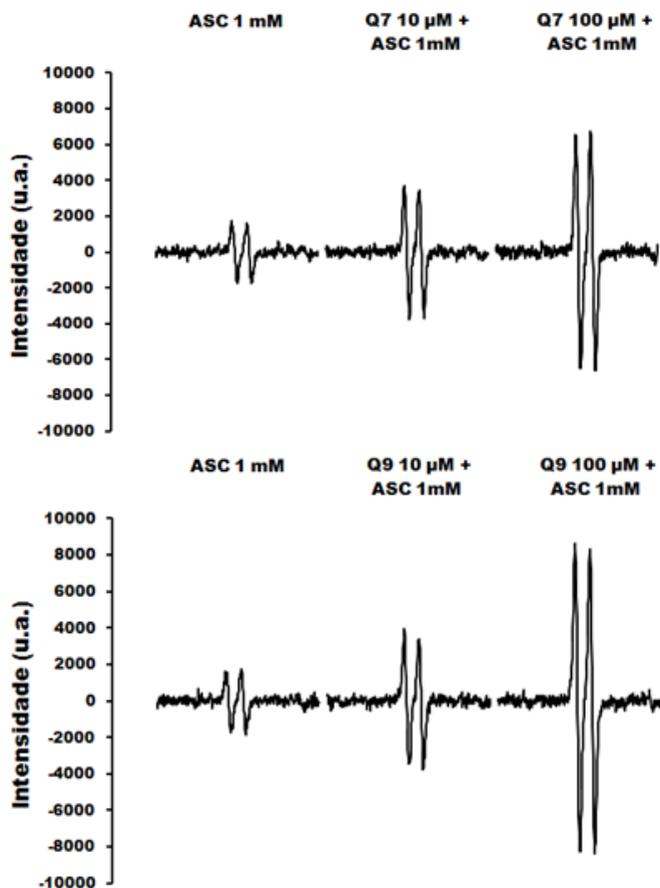
2.7.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os espectros obtidos após a avaliação de soluções contendo fenilaminonaftoquinonas (10 e 100 μM) associadas ao ascorbato de sódio (1 mM) estão mostrados na Figura 44.

A Figura 44 demonstra que as associações Q7 + ASC e Q9 + ASC, são capazes de interagir com o ascorbato de sódio, elevando em 3,5 e em 4,5 vezes, o sinal espectrofotométrico característico do radical ascorbil, quando administradas na concentração de 100 μM . Além disso, a execução desse ensaio permitiu observar que ASC interage mais facilmente e de maneira mais intensa com Q9 do que com Q7, visto que a intensidade do sinal do radical ascorbil gerado pela associação Q9 +

ASC é mais forte do que a intensidade gerada pela associação Q7 + ASC.

Figura 44 - Espectro de RPE referente a intensidade do radical livre ascorbil gerado pelas associações de fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 e 100 μM) ao ASC (1 mM).



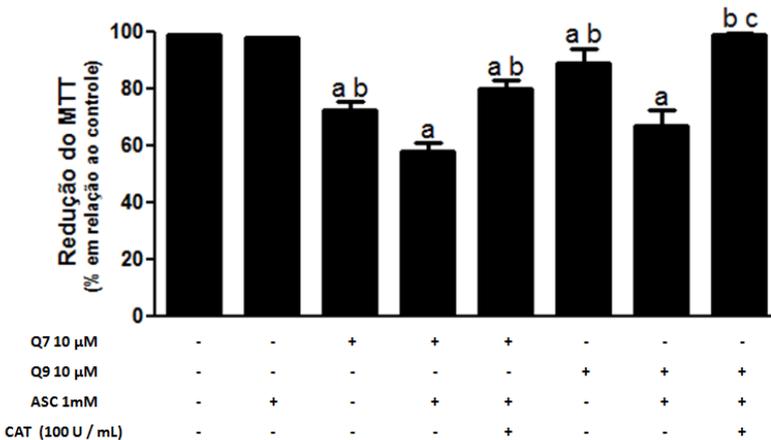
Fonte: Dados do autor.

2.7.3 Avaliação da citotoxicidade pelo MTT

A Figura 45 refere-se aos resultados obtidos após a realização do ensaio do MTT. Percebe-se que a adição concomitante de CAT as

células tratadas com Q7 (10 μ M) + ASC (1 mM) foi capaz de reverter parcialmente a citotoxicidade induzida por esse tratamento (em torno de 27,4%), restaurando os níveis de viabilidade celular promovidos pelo tratamento com Q7 (10 μ M) administrada isoladamente. Além disso, a administração de catalase foi capaz de reverter em torno de 24,6 e de 32,3%, a citotoxicidade provocada por Q9 (10 μ M) e pela associação Q9 (10 μ M) + ASC (1mM), respectivamente, reestabelecendo os níveis de viabilidade celular promovidos pelo tratamento com DMSO 0,25% (grupo controle). Já o tratamento realizado com Q7 (10 μ M) + CAT (100 U/mL), não foi capaz de reverter de maneira significativa a toxicidade induzida por Q7 (10 μ M).

Figura 45 - Efeito da enzima antioxidante catalase (CAT) sobre a citotoxicidade induzida pelas fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 (10 μ M) administradas isoladamente ou em associação ao ascorbato de sódio (ASC – 1 mM) sobre células T24 após 24 horas de tratamento.



Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão, n=3. (a), (b) e (c) representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, ao grupo tratado com a associação fenilaminonaftoquinona + ascorbato de sódio e ao grupo tratado apenas com fenilaminonaftoquinona, respectivamente. Fonte: Dados do autor.

Analisando os dados obtidos, sugere-se o envolvimento do estresse oxidativo nas atividades citotóxica e antiproliferativa induzidas por essas associações.

Os resultados referentes à determinação intracelular de EROs podem ser justificados pelos potenciais de óxido-redução apresentados por estes compostos. Vásquez et al (2011), afirmam que quinonas que

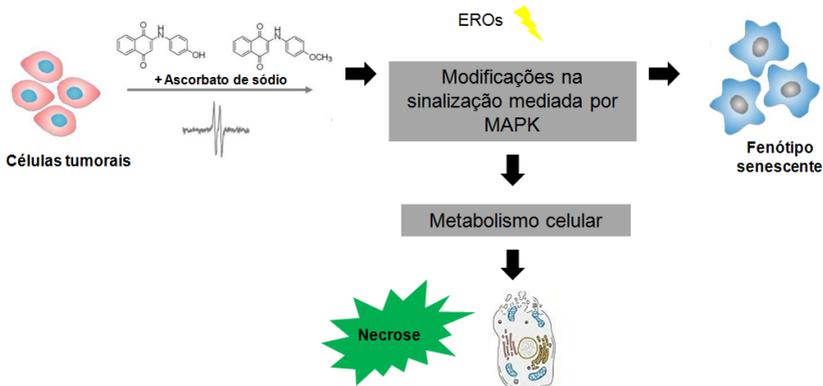
apresentam um alto potencial redox são mais susceptíveis à biorredução catalisada por enzimas flavinas (ex. NADPH citocromo P- 450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase), do que aquelas que apresentam baixo potencial redox. Além disso, foi verificado que fenilaminonaftoquinonas que apresentam um potencial de óxido-redução entre -480 e -680 mV, são mais susceptíveis a redução mediada pelo ascorbato do que aquelas que apresentam potencial redox fora dessa faixa. As fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 possuem potenciais redox relativamente baixos (-775 e - 856 mV, respectivamente) quando comparados aos de outras quinonas e fenilaminonaftoquinonas cujo principal mecanismo de ação antitumoral envolve a biorredução destes compostos. Assim, como mencionado anteriormente, sugere-se que Q7 e Q9 são menos susceptíveis à biorredução catalisada pelas flavoenzimas e ascorbato, levando a uma pequena produção de EROs, a qual não pôde ser quantificada pelo método da diclorofluoresceína. Entretanto, a capacidade desses compostos serem reduzidos pelo ascorbato e sofrerem ciclo redox, levando conseqüentemente à produção de EROs, foi devidamente comprovada através da mensuração do radical ascorbil por RPE, bem como através da reversão da citotoxicidade induzida pelas associações de fenilaminonaftoquinonas ao ascorbato de sódio, pela ação da catalase. Cabe ressaltar que, apesar das fenilaminonaftoquinonas levarem a uma baixa produção de espécies reativas, quando comparados a quantidade gerada por outras quinonas que apresentam potenciais redox mais elevados (ex. menadiona e juglona), tal produção foi suficiente para promover modificações na sinalização mediada por MAPKs e induzir os efeitos citotóxico e antiproliferativo aqui mostrados.

De maneira geral, os resultados obtidos nesse trabalho, mostraram que as associações Q7 + ASC e Q9 + ASC apresentam os mesmos efeitos biológicos (citotoxicidade, efeito antiproliferativo, elevação da atividade da β -galactosidase), entretanto, na grande maioria dos ensaios realizados, a associação Q9 + ASC apresentou-se mais potente que Q7 + ASC. Provavelmente tal diferença de potência está relacionada ao potencial de óxido-redução, bem como a lipofilicidade apresentada por estes compostos. Quando comparados entre si, os potenciais redox apresentados por Q7 (-775 mV) e Q9 (- 856 mV), mostram que o grupo 4-metoxianilino presente em Q9 possui uma maior capacidade de doar elétrons (ser oxidado), do que o grupo 4-hidroxianilino presente em Q7, o qual por sua vez, possui uma maior capacidade de ser reduzido (receber elétrons). Sugere-se portanto, que a

presença do substituinte 4-metoxianilino permite uma maior interação da semiquinona derivada de Q9 com o oxigênio, facilitando a geração de EROs, a regeneração da quinona (forma oxidada) e a manutenção ciclo redox, quando comparado aos efeitos mediados pelo grupo hidroxianilino presente em Q7. Além disso, Q9 possui um caráter lipofílico maior do que o apresentado pela Q7, sugerindo dessa forma, que Q9 é mais facilmente captada pelas células do que Q7. Assim, os efeitos biológicos mais potentes apresentados pela associação Q9 + ASC, quando comparados aos efeitos induzidos pela associação Q7 + ASC podem ser justificados por uma maior geração de EROs no processo de biorredução da Q9, bem como pela maior captação celular desta quinona.

Em suma, sugere-se que espécies reativas de oxigênio geradas via ciclo redox entre fenilaminonaftoquinonas e NADPH redutases ou fenilaminonaftoquinonas e ascorbato de sódio modificam a sinalização mediada por MAPKs, apresentando duas principais consequências: indução de fenótipo senescente e inibição da proliferação celular, bem como alterações significativas no metabolismo celular que levaram ao desencadeamento de morte celular por necrose.

Figura 46 - Hipótese do mecanismo de ação citotóxica e antiproliferativa das fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 administradas isoladamente e em associação ao ascorbato de sódio.



Fonte: Dados do autor.

A investigação do efeito antiproliferativo e antitumoral promovido por fenilaminonaftoquinonas administradas isoladamente e

em associação ao ascorbato de sódio permitiu a publicação do artigos científicos: “Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells”, publicado no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Anexo C).

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

1. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- O extrato bruto, fração acetato de etila e fração clorofórmica de *C. sylvestris* apresentaram efeito citotóxico sobre células MCF-7 cultivadas *in vitro*;
- O extrato bruto e a fração clorofórmica de *C. sylvestris* apresentaram efeito antiproliferativo sobre células MCF-7, estando tal efeito associado possivelmente à capacidade destes extratos em promoverem parada do ciclo celular na fase G1, ao elevarem a expressão de p53 e de p16, bem como ao reduzirem a expressão de CDK2;
- Os efeitos citotóxico e antiproliferativo do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* não estariam relacionados à indução de estresse oxidativo, entretanto poderia estar associado à promoção de danos ao DNA;
- O efeito antiproliferativo do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* poderia também ser atribuídos à provável capacidade de tais extratos em induzirem senescência celular;
- O extrato bruto e a fração clorofórmica de *C. sylvestris* apresentaram efeito antitumoral *in vivo* sobre o modelo experimental do carcinoma de Ehrlich. Tal efeito envolve a indução de necrose e de apoptose;
- Os efeitos citotóxico, antiproliferativo e antitumoral do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* deve-se em partes, à presença de casearina C nos mesmos uma vez que este foi o composto majoritário identificado na análise fitoquímica realizada;
- As fenilaminonaftoquinonas Q7 e Q9 apresentaram citotoxicidade seletiva sobre células T24;
- A atividade citotóxica de Q7 e Q9 sobre células T24 foi potencializada por sua associação ao ASC;
- As associações Q7 + ASC e Q9 + ASC apresentaram citotoxicidade seletiva sobre células T24;
- O tipo de morte celular induzido pelas fenilaminonaftoquinonas associadas ao ASC trata-se de um processo semelhante à necrose;
- Q7 e Q9 apresentaram importante efeito antiproliferativo, o qual foi potencializado pela associação destes compostos ao ASC;

- Q7 + ASC e Q9 + ASC exercem efeito citostático ao promoverem alterações no número de células presentes na fase G2/M provavelmente ao induzirem senescência;
- O efeito citotóxico de Q7 + ASC envolve a ativação das vias da p38 e ERK 1/2, já a citotoxicidade e provável senescência induzida por Q9 + ASC está relacionada a ativação de JNK;
- Q7, Q9, bem como a associação destes compostos ao ASC exercem efeito citotóxico e antiproliferativo através da indução de estresse oxidativo via ciclo redox;
- O ciclo redox entre as fenilaminonaftoquinonas e o ASC com consequente geração de EROs é modulada pelos substituintes presentes em R4, os quais determinam a potencialidade com que as associações exercem os efeitos citotóxico e antiproliferativo aqui explorados.

2. PERSPECTIVAS

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

- O extrato bruto e a fração clorofórmica de *C. sylvestris* devem ser melhor avaliados fitoquimicamente, para assim, permitir fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e frações e suas atividades biológicas;
- Confirmar e complementar o estudo da provável indução do fenótipo senescente promovidos pelo extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* através da mensuração da atividade da β -galactosidase ácida e/ou da análise morfológica nuclear;
- Verificar se o efeito citotóxico, antiproliferativo e possivelmente senescente do extrato bruto e fração clorofórmica de *C. sylvestris* está relacionado a alterações na sinalização mediada por MAPKs e PI3K/AKT;
- Verificar possíveis interferências na via glicolítica induzidas pelo tratamento de células tumorais com fenilaminonaftoquinonas e associação fenilaminonaftoquinonas + ASC, através da mensuração do conteúdo intracelular de ATP e NAD⁺, bem como da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, expressão de receptores glicolíticos, dentro outros.
- Avaliar a atividade anti-metastática e antiangiogênica induzida pelo tratamento de células tumorais com fenilaminonaftoquinonas e associações fenilaminonaftoquinonas + ASC, através da avaliação da migração celular, da caracterização da expressão de VEGF, NF κ β e metaloproteinases, e da atividade de metaloproteinases;
- Avaliar a atividade antiangiogênica *in vivo* das fenilaminonaftoquinonas e associações fenilaminonaftoquinonas + ASC, através do ensaio do CAM.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, J.C.; GIL, J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. **Trends Cell Biol.** v.22, p.211-219, 2012.
- ADHAMI, V. M. et al. Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCa T keratinocytes. **Clin Cancer Res**, v.9, p. 3176-3182, 2003.
- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berk) Pilat. **J Ethnopharmacol.**, v. 84, p. 157-162, 2003.
- ALBANO, M.N. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **J Ethnopharmacol.**, v.147, p. 612-617, 2013.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4ª Ed. Porto Alegre (RS): Artes Médicas, 2004.
- ALMEIDA A. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Atividades anti-inflamatória e antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Casearia sylvestris*: estudo comparativo com os antiinflamatórios piroxicam e meloxicam**. São Paulo, 2000, 97 f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas.
- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos**. Rosario: Corpus Libros, 2004. p. 577–579.
- ALVES, T. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem Inst Osw Cruz**, v. 95, p. 363-373, 2000.
- AMARAVADI, R.K.; THOMPSON, C.B. The roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. **Clin Cancer Res**, v. 13, p.7271-7279, 2007.

ANAZETTI, M.C; MELO, P.S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, São Paulo, v. 1, n. 1, p.37-58, 2007.

ARIVAZHAGAN, P.; AYUSAWA, D. Cardiolipin activates MAP kinases during premature senescence in normal human fibroblasts. **Biogerontology**. v. 8, p.621-626, 2007.

ARMENI, T. et al. Cellular Redox Imbalance and Changes of Protein S-glutathionylation Patterns Are Associated with Senescence Induced by Oncogenic H-Ras. **Plos one**. v.7, e52151, 2012.

ASTLE, M.V. et al. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. **Oncogene**. v.31, p.1949-1962, 2012.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biol Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.

BASILE, A.C. et al. Pharmacological assay of *C. sylvestris* –I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J Ethnopharmacol**, v. 30, p.185-197, 1990.

BARASCU, A. et al. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. **EMBO J.**, v.31, p.1080-1094, 2012.

BECK, R. et al. Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death. **Biochem. Pharmacol.**, v.77, p.375-383, 2009a.

BECK, R. et al. Menadione reduction by pharmacological doses of ascorbate induces an oxidative stress that kills breast cancer cells. **Int. J. Toxicol.** v.28, p. 33–42, 2009b.

BENITES, J. et al. Studies on quinones. Part 42: Synthesis of furylquinone and hydroquinones with antiproliferative activity against human tumor cell lines. **Bioorg Med Chem**, v.16, p.862–868, 2008a.

BENITES, J. et al. Part 1: Effect of vitamin C on the biological activity of two euryfurylbenzoquinones on TLT, a murine hepatoma cell line. **Eur. J. Med. Chem.**, v.43, p.1813-1817, 2008b.

BENITES, J.A. et al. Part 2: Influence of 2-euryfuryl-1,4-naphthoquinone and its peri-hydroxy derivatives on both cell death and metabolism of TLT cells, a murine hepatoma cell line. Modulation of cytotoxicity by vitamin C. **Chem Pharm Bull.** 57, p. 615-619, 2009.

BENITES, J. et al. Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents. **Eur J Med Chem**, v.45, p.6052-6057, 2010.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.37, p.962-976, 2005.

BENTO, T.S. et al. Growth inhibition and antioxidative response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. *Lett Appl Microbiol.* 16 set. 2013. In print. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.12159/abstract;jsessionid=1FBAAEB712C60E9021EB9EF86C0470DE.f01t02>

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

BISCARO, F. et al. Anticancer activity of flavonol and flavan-3-ol rich extracts from *Croton celtidifolius* latex. **Pharm Biol.**, v.51, p.737-743, 2013.

BLANCO, R.A. Guaçatonga (*C. sylvestris*). Disponível em: <http://www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A34guaçatonga.htm>. Acesso em: 18 set. 2013.

BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **J Ethnopharmacol**, v. 61, p. 85-89, 1998.

BOGUSKI, M.S.; MCCORNIMICK, F. Protein regulating Ras and its relatives. **Nature**, v.366, p.643-654, 1993.

- BOLZANI, V. da S. et al. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **An Acad Bras Ciênc**, v. 71, p. 181-187, 1999.
- BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *C. sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comp Biochem Physiol**, v. 127, p. 21-30, 2000.
- BORGES, M.H. et al. 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. **Mol Immunol**, v. 39, p. 615-647, 2003.
- BOU, D. D et al. Chemical Composition and Cytotoxicity Evaluation of Essential Oil from Leaves of *Casearia Sylvestris*, Its Main Compound α -Zingiberene and Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 9477- 9487, 2013.
- BRANDÃO, H. N. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, v.33, p. 1359-1369, 2010.
- BRONDANI, D. J. et al. Síntese, Avaliação da Atividade Citotóxica e Toxicidade Aguda de Análogos da Primina 3 e 6 Alquil-Substituídas. **Acta Farm Bonaerense**, v.25, p. 248-251, 2006.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CAIRNEY, C. J. et al. Cancer cell senescence: a new frontier in drug development. **Drug Discov. Today**. v.17, p.269-276, 2012.
- CAMARGO, F. G. et al. Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de estomatite herpética. **Brag Pta**, v. 1, p. 121-127, 1993.
- CAMPISI, J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. **Cell**, v.120, p.513-522, 2005.

CAMPISI, J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.21, p.107-112, 2011.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annu. Rev. Physiol.** v.75, p.685-705, 2013.

CAMPISI, J.; FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v.8, p.729-740, 2007.

CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, p. 50-83, 2011.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J**, v.13, p.1007-24, 1999.

CARVALHO, P.R.F et al. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *C. sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1659-1662, 1998.

CAVALCANTE, W.L.G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p.369-413, 2001.

CHEN, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature**. v.436, p.725-730, 2005.

CHEN, C.Y. et al. Gallic acid induces a reactive oxygen species-provoked c-Jun NH2-terminal Kinase-dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2013, ID 613950, 2013.

CHIANTORE, M. V. et al. Senescence and Cell Death Pathways and Their Role in Cancer Therapeutic Outcome. **Curr. Med. Chem.** v.16, p.287-300, 2009.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? **Nature Reviews**, v.6, p.268-275, 2005.

CHIU, J.; DAWES, I. W. Redox control of cell proliferation. **Trends Cell Biol**, v. 22, p. 592-601, 2012.

CHOI, Y. J. et al. Cell-penetrating superoxide dismutase attenuates oxidative stress-induced senescence by regulating the p53-p21 pathway and restores osteoblastic differentiation in human dental pulp stem cells. **Int. J. Nanomedicine**. v.7, p.5091–5106, 2012.

CHULAROJMONTRI, L.; GERDPRASERT, O.; WATTANAPITAYAKUL, S.K. Pummelo Protects Doxorubicin-Induced Cardiac Cell Death by Reducing Oxidative Stress, Modifying Glutathione Transferase Expression, and Preventing Cellular Senescence. **Evid Based Complement Alternat Med**. v. 2013, ID 254835, 2013.

COLLADO, M.; SERRANO, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat Rev Cancer**. v. 6, p. 472-476, 2006.

COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer**. v. 10, p. 51-57, 2010.

COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Curr Opin Pharmacol.**, v.5, p.366-373, 2005.

COLMAN, M.S.; AFSHARI, C.A.; BARRET, J.C. Regulation of p53 and activity in response to genotoxic stress. **Mutat Res**, 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.

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

- COSTANTINO, V.V. et al. The Sesquiterpene Lactone Dehydroleucodine Triggers Senescence and Apoptosis in Association with Accumulation of DNA Damage Markers. **Plos one**.v. 8, e53168, 2013.
- CRESCENZI, E. et al. Downregulation of Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) plays a critical role in regulating several p53-dependent functions in premature senescent tumor cells. **J. Biol. Chem.**, v.288, p.16212-16224, 2013.
- DASGUPTA, J. et al. Reactive Oxygen Species Control Senescence-Associated Matrix Metalloproteinase-1 through c-Jun-N-Terminal Kinase. **J. Cell. Physiol.** v.225, p.52-62, 2010.
- DAÍ, Z.J. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of β -elemeno em células de hepatoma humano HepG2. **Cancer Cell Int.**, v.13, 27, 2013
- DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quím Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.
- DA SILVA, S.L. et al. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Sw. aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicol**, v.52, p. 655-666, 2008a.
- DA SILVA, S.L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, p.107-112, 2008b.
- DA SILVA, S. L. .; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *C. sylvestris* (Flarcortinaceae). **Eur J Pharmacol.** v. 608, p. 76-83, 2009.
- DA SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **Eur J Pharmacol**, v. 576, p. 180-188, 2007.
- DARMANIN, S. et al. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells.**Nat Prod Res**, v.23, p.561-571, 2009.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v.28, p. 118-129, 2005.

DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. *Curr Pharm Des.*, v.16, p.1417-1426, 2010.

DEJEANS, N. et al. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochem Pharmacol**, v.79, p.1221-1230, 2010.

DE LAURENZI, V. et al. Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines. **Eur J Cancer**. v. 31, p. 463-466, 1995.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacol Ther.**, v.138, p.255-271, 2013.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC, 1985.

DURONIO, R.J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v.5, a008904, 2013.

DUFFY, M.J. The war on cancer: are we winning? *Tumor Biol.*, v.34, p.1275-1284, 2013.

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

ENGERS, R.; GABBERT, H.E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 126, p. 682-692, 2000.

ESPÍNDOLA, L.S. et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Med**, v. 70, p.1093-1095, 2004.

ESPINA, C. et al. Environmental and Occupational Interventions for Primary Prevention of Cancer: A Cross-Sectorial Policy Framework. **Environ Health Perspect.**, v.121, p.420-426, 2013.

ESPOSITO, F. et al. Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence, **Neurochem. Res.** v.29, p.617–628, 2004.

ESTEVEZ, I. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *C. sylvestris* Sw. **J Ethnopharmacol**, v.101, p.191-196, 2005.

FALCÃO BÜCKER, N. C. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Efeito antitumoral e antiangiogênico de extratos supercríticos de *Bidens pilosa* Linné e *Casearia sylvestris* Swartz.** Florianópolis, 2012, 107f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2012.

FANG, X. et al. Perfluorononanoic acid-induced apoptosis in rat spleen involves oxidative stress and the activation of caspase-independent death pathway. **Toxicology**, v. 267 , p. 54–59, 2010.

FAVOROLO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, v.4, p.330-349, 2012.

FELIPE, K.B. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*** . Florianópolis, 2010, 81f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2010.

FERNANDES, E.S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol**, v. 569, p.228-236, 2007.

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.

- FERREIRA, P.M. et al. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chem Biol Interact.**, v.188, p. 497-504, 2010.
- FERREIRA, P.M. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **An Acad Bras Cienc**, v.8, p.1373-1384, 2011.
- FERREIRA, E.A. et al. Plantas medicinais utilizadas popularmente no Brasil para o tratamento do câncer. In: de SOUZA, G. H. B.; de MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia - Coletânea Científica**. Ouro Preto: UFOP 2012. P.319-338.
- FIALHO, S.S. et al. *Casearia sylvestris* on gastric permeability to sucrose in horses submitted to gastric ulcer induction protocol. **Cienc Rural**, v. 40, p. 348-355, 2010.
- FRANKEN, N.A.P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315–2319, 2006.
- GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. **Cell Res**, v. 21, p.1383-1385, 2011.
- GAMBINO, V. et al. Oxidative stress activates a specific p53 transcriptional response that regulates cellular senescence and aging. **Aging Cell**. v.12, p.435-445, 2013.
- GARUTI, L. et al. Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones. **Il Farmaco**, v.59, p.663–668, 2004.
- GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin**, v.55, p. 178-194, 2005.
- GIFTSON, J.S.; JAVANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Invest New drugs**, v. 28, p.251-259, 2010.
- GIRARD, M. et al. Naphtoquinone constituents of *Tabebuia* spp. **J Nat Prod**, v.51, p.1023-1024, 1988.

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

GOMES, C. A. et al. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study. **J Med Chem**, v. 46, p. 5395-5401, 2003.

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

GRYNBERG, N.F. et al. Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonina e trans-crotonina, de Croton cajucara. **Planta Med**, v. 65, p.687-689, 1999.

GU, L. et al. Intervention in Genotoxic Stress-induced Senescence by Cordycepin through Activation of eIF2 and Suppression of Sp1. **Toxicol. Sci.** v. 134, p.345-354, 2013.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **J Pharmacol Sci**, v. 94, p. 177-184, 2004.

GUTIERREZ, P. L. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. **Front Biosci**, v.5, p.629-38, 2000.

HAMTIAUX, L. et al. Increasing antiproliferative properties of endocannabinoids in N1E-115 neuroblastoma cells through inhibition of their metabolism. **Plos One**, v.6, e26823, 2011.

HAN, J.; ZHONG, C.; ZHANG, D. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. **Nat immunol**, v.12, p.1143-1149, 2011.

HENRIQUEZ, M. et al. Cell Death by Necrosis, a regulated way to go. **Curr Mol Med**, v.8, p.187-206, 2008.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19ª Ed. São Paulo: Manole, 1999, p.1552.

HERCEG, Z.; WANG, Z.Q. Failure of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases. **Mol. Cell. Biol.** v.19, p. 5124-5133, 1999.

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

HOCKENBERY, D. et al. 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. Graphicars: São Paulo, 1939. p. 196-199.

HONG, J. et al. Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cells via Down-regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by Yuanhuadine, a Daphnane Diterpene from *Daphne genkwa*. **J. Nat. Prod.** ,v. 74, p. 2102–2108, 2011.

HOU, J. et al. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. **Food Chem**, 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., **J. Agric. Food Chem** v.55, p.7359-7365, 2007

HSU et al. Gallic acid induces G2/M phase arrest of breast cancer cell MCF-7 through stabilization of p27 (kip1) attributed to disruption of p27 (Kip1)/Skp2 complex. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 1996-2003, 2011.

HUANG, D. et al. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. **Eur J Pharmacol**, v. 503, p.17-24, 2004.

HUANG, P. J. et al. In vitro and in vivo activity of gallic acid and *Toona sinensis* leaf extracts against HL-60 human promyelocytic leukemia. **Food Chem Toxicol.**, v. 50, p. 3489-3497, 2012.

HÜTTER, E. et al. Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. **Exp. Gerontol.** v.37, p.1165-1174, 2002.

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

INCA. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> Acesso em: 10 de outubro de 2013.

ISHIBASHI, M.; OHTSUKI, T. Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis. **Med Res Rev**, v. 28, p.688 -714, 2008.

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

ITOKAWA, H. et al. Antitumor principles from *C. sylvestris* Sw (Flarcotinaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chem Pharm Bull**, v. 36, p. 1585-1588, 1988.

ITOKAWA, H. et al. New antitumor principles casearins A-F for *C. sylvestris* (Flacortinaceae). **Chem Pharm Bull**, v. 38, p. 3384- 3388, 1990.

JENDIROBA, D. B. et al. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. **Leukemia Res.**, v.26, p.301-310, 2002.

JENDROSSEK, V. The Intrinsic Apoptosis Pathways as a Target in Anticancer Therapy. **Curr Pharm Biotechnol.**, v.13, p. 1426-1438, 2012.

JONES et al. β -ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells. **Nutr Cancer**, v. 65, p. 600-610, 2013.

KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. **Trends Genet**, v. 11, p. 136 - 140, 1995.

KANENO, R. et al. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food Chem Toxicol**, v. 42, p. 909 - 916, 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. **J Food Sci**, v.74, p.237-242, 2009.

KIM, J.W. et al. DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly (ADP-ribose) polymerase is required for UV mediated apoptosis. **J. Cell Sci.** v, 113, p.955-961, 2000.

KOHN, E.C.; LIOTTA, L.A. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. **Cancer Res.**v.55, p. 1856-62, 1995.

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

KVIECINSKI, M.R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **J Ethnopharmacol**, v.117, p. 69–75, 2008.

KVIECINSKI, M. R. et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetilenes with antitumor activity. **J Supercrit Fluids**, v.56, p.243-248, 2011.

KVIECINSKI, M.R. et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.421, p.268-273, 2012.

KUILMAN T. et al The essence of senescence. **Genes Dev.** v. 24, p. 2463–2479, 2010.

KUMAR, V et al. **Pathology basis of disease.** 7ed. China:WB Saunders, 2004, 1552p.

LAMPONENTI, I.; SAAB, A.M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **Int J Oncol**, v.29, p.989–995, 2006.

LEE, S.H.; UM, S.; KIM, E. CBX8 suppresses Sirtinol-induced premature senescence in human breast cancer cells via cooperation with SIRT1. **Cancer Lett.** v.335, p.397-403, 2013.

LEGAULT, J. et al. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Med**, v. 69, p.402–407, 2003.

LI, Y. et al. Novel ferrocenyl derivatives exert anti-cancer effect in human lung cancer cells in vitro via inducing G1-phase arrest and senescence. **Acta Pharmacol Sin.**, v.34, p.960-968, 2013a.

LI, Q.Q. et al. Anticancer activity of β -elemene and its synthetic analogs in human malignant brain tumor cells. **Anticancer Res**, v. 33, p. 65-76, 2013b.

LOIZZO, M.R. et al. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Res**, v. 27, p.3293–3299, 2007.

LOWRY O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, v. 193, p.265-275, 1951.

LU, X. et al. β -elemene inhibits the proliferation of t24 bladder carcinoma cells through upregulation of the expression of Smad4. **Mol Med Rep**, v.7, p.513-518, 2013.

MARUYAMA, J. et al. Stress-Activated MAP Kinase Cascades in Cellular Senescence. **Curr. Med. Chem.** v.16, p.1229-1235, 2009.

MATTOS, E.S. et al. Evaluation of antinociceptive activity of *C. sylvestris* and possible mechanism of action. **J Ethnopharmacol**, v.112, p.1-6, 2007.

MAURYA, D.K.; NANDAKUMAR, N.; DEVASAGAYAM, T.P. Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. **J Clin Biochem Nutr**, v. 48, p. 85-90, 2011.

McCALL, K. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, p.882-888, 2010.

Mc DONALD, E.R., EL-DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). **Int J Oncol**, v.16, p.871-886, 2000.

McGOWAN, A.J. et al. Anti-oxidants and apoptosis. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 229-233, 1996.

McHUGH, P.; TURINA, M. Apoptosis and Necrosis: A review for Surgeons. **Surg Infect**, v.7, p.53-68, 2006.

MELO, P. S., et al. Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **Eur J Pharmacol**, v. 487, p. 47-54, 2004.

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

MENG, D.H. et al. Anti-tumor clerodane-type diterpenes from *Mitrephora thorelli*. **J Asian Nat prod Res**, v. 9, p. 679-684, 2007.

MESQUITA, M. L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem Inst Osw Cruz**, v.100, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M.L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J Ethnopharmacol**, v. 110, p.165-170, 2007.

MESQUITA, M.L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v.123, p. 439-445, 2009.

MINOTTI, G. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev**, v.56, p.185-229, 2004.

MORITA, H. et al. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *C. sylvestris* Sw. **Chem Pharm Bull**, v.39, p. 693-697, 1991.

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

MUKHTAR, E. et al. Apoptosis and Autophagy Induction As Mechanism of Cancer Prevention by Naturally Occurring Dietary Agents. **Curr Drug Targets**, v.13, p. 1831-1841, 2012.

NAHTA, R. New developments in the treatment of HER2-positive breast cancer. **ISRN Oncol**. v.4, p. 53-64, 2012.

NARDELLA, C. et al. Pro-senescence therapy for cancer treatment. **Nat Rev Cancer**. v.11, p.503-511, 2011.

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

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, v. 22 , p.299-306, 1997.

NICOTERA, P. et al. Differential effects of arylating and oxidizing analogs of N-acetyl-p-benzoquinoneimine on red blood cell membrane proteins, **Arch Biochem Biophys**, v. 283, p. 200-205, 1990.

OBERLIES, N.H. et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *C. sylvestris*. **J Nat Prod**, v. 65, p.95–99, 2002.

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

OLIVEIRA, A.M. et al. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis*, v. 24, p.501-506, 2009.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/>>. Acesso em: Outubro, 2013.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer : Potencial Diagnostic and therapeutic Applications. **Oncologist**, v. 9, p. 361-377, 2004.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v.45, p.487-498, 2012.

PAN, Y. et al. Induction of cell senescence by targeting to Cullin-RING Ligases (CRLs) for effective cancer therapy. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** v.3, p.273-281, 2012.

PARISOTTO, E. B. et al . The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **J Supercrit Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie** , v.84, p.105–111, 2002.

PATEL et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. **366**, p.1079-1089, 2012.

PELÚZIO, M.C.G. et al. As proteínas supressoras em neoplasias malignas - Conhecendo seu papel. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 3, p.233-238, 2006.

PEPPERCORN et al. Rationing in urologic oncology: Lessons from sipuleucel-T for advanced prostate cancer. **Urol Oncol.**, v. 31, p.1079-1084, 2013.

PERCHELLET, J.P. et al. Antitumor-promoting activities of tannic acid, ellagic acid, and several gallic acid derivatives in mouse skin. **Basic Life Sci.**, v. 59, p. 783-801, 1992.

PINTO, F. C. et al. Induction of apoptosis in tumor cells as a mechanism of tumor growth reduction in allergic mice, **Pathol Res Pract**, v. 205, p.559-567, 2009.

POWIS, G. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. **Pharmacol Ther**, v. 35, p..57–162, 1987.

PREDIGER, R.D.S. et al. Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease. **Neurotox Res**, v.17, p.114-129, 2010.

RAJESHKUMAR, N. V et al. Antitumour and anticarcinogenic activity of Phyllanthus amarus extract, **J Ethnopharmacol**, v. 81, p. 17-22, 2002.

RAK J. et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev**, v.14, p.263-277, 1995.

RAMAKRISHNA, G. et al. Role of cellular senescence in hepatic wound healing and carcinogenesis. **Eur. J. Cell Biol.** v.91, p.739-747, 2012.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAVIKUMAR, Y.S. et al. Antiproliferative, apoptotic and mutagenic activity of isolated compounds from Polyalthia cerasoides seeds. **Phytomedicine**, v. 17, p.513-518, 2010.

RAYESS, H.; WANG, M.B.; SRIVATSAN, E.S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. **Int J Cancer**. v.130, p.1715-1725, 2012.

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

RICHARDSON, M. E.; SIEMANN, D.W. Thiol manipulation as a means of overcoming drug resistance in a novel cyclophosphamide induced resistant cell line. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 22, p. 781-784, 1992.

RÍOS D. et al. Biological evaluation of 3-acyl-2-arylamino-1,4-naphthoquinones as inhibitors of Hsp90 chaperoning function. **Curr Top Med Chem.**, v.12, p.2094-2102, 2012.

ROBERTSON, J.D.; ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic cell death. **Toxicology**, v. (181-182), p.491-496, 2002.

- ROCHA, B. A.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr Opin Pharmacol**, v.1, p.364-369, 2001.
- RODRIGUES, M. A. S et al. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 22, p.314-317, 2006.
- RUPPELT, B. M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom - I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Mem Inst Osw Cruz**, v. 86, p. 203-235, 1991.
- RUSSEL, L.H Jr. et al. Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent cell death in human prostate cancer LNCaP cells. **Anticancer Res**, v. 32, p.1595-1602, 2012.
- RUSTIGI, A. K.; PODOLSKY, D. K. The molecular basis of colon cancer. **Annual Rev Med.**, v. 43, p. 61-68, 1996.
- SANTOS, A.G. et al. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chem Biodivers.**, v.7, p. 205-215, 2010.
- SARANGI, U. et al. 17AAG Treatment Accelerates Doxorubicin Induced Cellular Senescence: Hsp90 Interferes with Enforced Senescence of Tumor Cells. **Drug Target Insights**. v.6 , p.19-39, 2012.
- SARI, D.P. et al. Clerodane Diterpenes isolated from *Polyalthia longifolia* induce apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells. **J Oleo Sci.**,v. 62, p.843-848, 2013.
- SASSIOTO, M.C.P. et al. Effect of *C. sylvestris* on bone repair with devitalized bovine bone matrix in rats. **Acta Cir Bras**, v.19, p.637-641, 2004.
- SCHOENFELDER, T. et al. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v.79, p. 465-467, 2008.

SEHRAWAT, A. et al. Zerumbone causes Bax- and Bak-mediated apoptosis in human breast cancer cells and inhibits orthotopic xenograft growth in vivo. **Breast Cancer res Trat**, v. 136, p. 429-441, 2012.

SELVA, T, M.G. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. **Estudos eletroquímicos da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e derivados da 1,4-naftoquinona com atividade moluscicida**. Recife, 2010, 67f. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal Rural de Pernambuco, programa de Pós-Graduação em Química, Recife, 2010.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v.366, p.704-707, 1993.

SESHADRI, P.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free Radic Biol Med**, v.51, p.2090-2107, 2011.

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

SHEN, X. et al. Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation. **Int Immunopharmacol**. v.16, p.261-267, 2013.

SHIOZAKI, E. N.; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. **Trends Biochem Sci** , v.29, p.486-494, 2004.

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

SOBHAN, P.K. et al. Calpain and reactive oxygen species targets Bax for mitochondrial permeabilisation and caspase activation in zerumbone induced apoptosis. **Plos One**, v.8, e59350, 2013.

- STRATTON, M.R., CAMPBELL, P.J.; FUTREAL P.A. The cancer genome. **Nature**. v. 458, p. 719-724, 2009.
- SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis Cancer. **J Oncol**. v. 2013, artigo ID 102735, 2013.
- SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.
- SUN, X. et al. Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by β -lapachone through activation of DNA damage response pathway. **Cell cycle**. v.5, p.2029-2035, 2006.
- SUPANJI et al. HtrA1 is induced by oxidative stress and enhances cell senescence through p38 MAPK pathway. **Exp. Eye Res**. v.112, p.79-92, 2013.
- SYLVESTRE, M. et al. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomedicine**, v. 12, p. 299-304, 2005.
- SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analisys and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **J Ethnopharmacol**, v.103, p.99-102, 2006.
- TAPER, H.S., KEYEUX, A.; ROBERFROID, M. Potentiation of radiotherapy by non-toxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. **Anticancer Res**, v.96, p.499-503, 1996.
- THATTE, U.; DAHANUKAR, S. Apoptosis – clinical relevance and pharmacological manipulation. **Drugs**, v.54, p.511-32, 1997.
- TIN, A.S. et al. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast câncer cells requires the downregulated expression on the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. **Anticancer Drugs**, v. 23, p. 370-379, 2012.

TRACHOOTHAM D.; ALEXANDRE J.; HUANG P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov.**, v.8, p. 579-591, 2009.

TUNDIS, R. et al. In vitro cytotoxic effects of *Senecio stabianus* Lacaíta (Asteraceae) on human cancer cell lines. **Nat Prod Res**, v.23, p.1707-1718, 2009.

VÁSQUEZ, D. et al. Studies on quinones. Part 46. Synthesis and in vitro antitumor evaluation of aminopyrimidoisoquinolinequinones. **Eur J Med Chem.** v.45, p. 5234-5242, 2010.

VÁSQUEZ, D.R. et al. Aminopyrimidoisoquinolinequinone (APIQ) redox cycling is potentiated by ascorbate and induces oxidative stress leading to necrotic-like cancer cell death. **Invest. New Drugs**, v.30, p. 1003-1011, 2011.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim nova**, v.32, p.1245-1252-2009.

VENOGUPAL, M. et al.. Synergistic antitumor activity of vitamins C and K₃ on human urologic tumor cell lines. **Life Sci**, v.59, p. 1389-1400, 1996.

VERMA, R. P. Anti-cancer activities of 1,4 -naftoquinones: a QSAR study. **Anti-cancer Agents Med Chem**, v.6, p.489-499, 2006.

VERMEULEN, K. ; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p.131-149, 2003.

VERRAX, J. et al. Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death. **Apoptosis**. v. 9, p. 223-233, 2004.

VERRAX, J. et al. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An *in vitro* comparative study, **Free Radic Res**, v. 39, p.649–657, 2005.

VERRAX, J. et al. Oxidative stress by ascorbate/menadione association kills K562 human chronic myelogenous leukaemia cells and inhibits its tumour growth in nude mice. **Biochem. Pharmacol.** , v.72 , p. 671–680, 2006.

VERRAX, J. et al. Role of glycolysis inhibition and poly(ADP-ribose) polymerase activation in necrotic-like cell death caused by ascorbate/menadione-induced oxidative stress in K562 human chronic myelogenous leukemic cells. **Int J Cancer**. v.120, p.1192–1197, 2007.

VERRAX, J. et al. Intracellular ATP levels determine cell death fate of cancer cells exposed to both standard and redox chemotherapeutic agents. **Biochem Pharmacol**, v.82, p.1540-1548, 2011a.

VERRAX, J. et al. Redox-Active Quinones and Ascorbate: An Innovative Cancer Therapy That Exploits the Vulnerability of Cancer Cells to Oxidative Stress. **AntiCancer Agents Med Chem**, v. 11, p. 213-221, 2011b.

VIERKOTTEN, S.; MUETHER, P.S.; FAUSER, S. Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components. **Plos One**. v.6.e 22959, 2011.

WANG, W. et al. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med.**, v. 75, p.1436-1441, 2009a.

WANG, W. et al. Clerodane and ent-Kaurane Diterpene Glycosyl and Glycoside Derivatives from the Leaves of *Casearia sylvestris*. **Helv Chim Acta**, v. 92, p. 1829-1839, 2009b.

WANG, W. et al. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, p.404-407, 2009c.

WHITSON, E.L. et al. Clerodane diterpenes from *Casearia arguta* that act as synergistic TRAIL sensitizers. **J Nat Prod**, v.73, p.2013-2018, 2010.

WILLIAMS, G.H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol.**, v.226, p.352-364, 2012.

WLODKOWIC, D., SKOMMER, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of Apoptosis. Historical Perspective and New Advances. **Exp Oncol.** v.34, p.255-262, 2012.

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

YANG, F. et al. Hirsutanol A, a novel sesquiterpene compound from fungus *Chondrostereum* AP., induces apoptosis and inhibits tumor growth through mitochondrial-independent ROS production: hirsutanol A inhibits tumor growth through ROS production. **J Transl Med**, v.11,32, 2013.

YARBRO, J. W. The scientific basis of cancer chemotherapy In: Perry MC, ed. **The Chemotherapy Source Book**. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 2-14, 1992.

YIN, S. Penta-1,2,3,4,6-O-Galloyl-Beta-D-Glucose Induces Senescence-Like Terminal S-Phase Arrest in Human Hepatoma and Breast Cancer Cells. **Mol Carcinog**, v. 50, p.592-600, 2011.

YOU, B.R. et al. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food Chem Toxicol.** , v.48, p.1334-1340, 2010.

YOU, B.R. et al. Gallic acid-induced lung cancer cell death is accompanied by ROS increase and glutathione depletion. **Mol Cell Biochem**, v.357, p.295-303.

ZAIDI, S.K. et al. Targeting deregulated epigenetic control in cancer. **J Cell Physiol.**, v. 228, p. 2103-2108, 2013.

ANEXO A- primeira página do artigo submetido ao periódico *Phytomedicine*, sob o título: *Sublethal concentrations of hydroethanol extract from Casearia sylvestris (Salicaceae) and its chloroform fraction promotes cell cycle arrest on MCF-7 cells.*

Elsevier Editorial System(tm) for Phytomedicine
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Sublethal concentrations of hydroethanol extract from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) and its chloroform fraction promotes cell cycle arrest on MCF-7 cells

Article Type: Original Article

Section/Category: Oncology and Hematology

Keywords: *Casearia sylvestris*, Antiproliferative effect, Cell cycle arrest, Casearin C

Corresponding Author: Prof. Rozangela Curi Pedrosa, Ph.D

Corresponding Author's Institution: University Federal of Santa Catarina

First Author: Karina B Felipe, MsC

Order of Authors: Karina B Felipe, MsC; Maicon R Kwiecinski, PhD; Fabiana O Silva, MsC; Nádia F Bucker, MsC; Mirelle S Farias, MsC; Luiza Sheyla E Porfirio Will Castro, MsC; Valdelúcia Maria A Souza Grinevicius, MsC; Nadia S Motta, MsC; João Francisco G Correia, MsC; Maria Helena Rossi, PhD; Rozangela Curi Pedrosa, Ph.D

Abstract: *Casearia sylvestris* is a tree found in tropical America. In Brazil it is known mainly as Guaçatonga. Studies have confirmed the presence of some cytotoxic constituents in this plant. But some useful antitumor drugs have more a cytostatic effect than a cytotoxic one. This article reports the results of an investigation on the antiproliferative effects at sublethal concentrations *C. sylvestris* extracts. Material and methods. Hydroethanol maceration and column chromatography were done to obtain a crude hydroethanol extract (CHE) and a chloroform fraction (CHCl₃-f) after chromatography and NMR spectroscopic analyses was used to identified casearins. The human breast cancer cell line MCF-7 was used. Non cytotoxic concentrations were selected by the MTT assay. The antiproliferative effect was assessed by the colony forming unit assay. Effects on the cell cycle were observed through flow cytometry and a propidium iodide kit. The effect on some key proteins of DNA damage, the phosphorylation on the histone H2Ax and cell cycle control p53, p16, CDK2 was evaluated through immunoblot. Results. The presence of Casearin C was confirmed by chromatography and H1 nuclear magnetic resonance. The EC₅₀ values found at 24 h on MCF-7 cells were 141 µg/mL for CHE and 66 µg/mL for CHCl₃-f. Inhibition on cell proliferation was recorded at concentrations as low as 4 µg/mL in the case of the CHCl₃-f (up to 40%) and up to 50 % when CHE was added at 9 µg/mL. The cell cycle arrest was demonstrated by the reduction in terms of number of cells in phases G₂/M and S, up to 38.9 and 51.9 % when cells were treated with CHE and 53.9 and 66.2 %, respectively when cells were treated with CHCl₃-f. The number of cells in G₁ was increased when the cells were treated with CHE (21.4 %) or CHCl₃-f (27.8 %). Key proteins of cell cycle control were affected. The treatments caused activation of p53, p16 and DNA damage found by the appearance of bands corresponding to γ-H2Ax. On the other hand, the treatments caused reduction of CDK2. Conclusion. Whether the extracts from *C. sylvestris* are cytotoxic at high concentrations, the low concentrations have antiproliferative effect and can be useful to complement the conventional cytotoxic cancer chemotherapy.

ANEXO B- primeira página do artigo publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*, volume 45, páginas 6052 a 6057 (2010), sob o título *Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.10.006.

European Journal of Medicinal Chemistry 45 (2010) 6052–6057



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Original article

Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents

Julio Benites^{a,b}, Jaime A. Valderrama^{b,c}, Karina Bettega^d, Rozangela Curi Pedrosa^d, Pedro Buc Calderon^{a,b,e}, Julien Verrax^{e,*}

^a Departamento de Química Orgánica y Farmacología, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile
^b Instituto de Biotecnología (ID), Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile
^c Departamento Química Orgánica, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile
^d Laboratório de Química Experimental, Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Carlos, Florianópolis, Brazil
^e Toxicology and Cancer Biology Research Group, Leuven Drug Research Institute/Université Catholique de Louvain, RMN 7369, 73, Avenue E. Meuris, 1300 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article history: Received 27 August 2010 Received in revised form 4 October 2010 Accepted 6 October 2010 Available online 14 October 2010</p> <p>Keywords: Antitumor agents Cytotoxicity Donor-acceptor systems Quinones Structure-activity relationships</p>	<p>Several members of the phenylamino-1,4-naphthoquinone series were prepared in order to investigate structure-activity relationships (SAR) and to explore the antitumor effects associated with this scaffold. The cytotoxic effects of the aminonaphthoquinones (10a) against a panel of cancer cell lines (MCF7, DU145 and T24 cells) and healthy fibroblasts (BALB/3T3) were assessed <i>in vitro</i> using the MTT reduction assay 48 h after drug exposure. SAR analysis of the aminonaphthoquinone series showed that insertion of a chlorine atom in the acceptor quinone nucleus and/or insertion of a methyl group at the nitrogen atom of the donor phenylamino group induced significant changes in cytotoxic activity. Quinones 7 and 9, which exhibited the highest antitumor indexes (57.3 and 6.29, respectively), were further characterized using the following assays: Colony formation, caspase-3 activity, and ATP content. The results showed that aminonaphthoquinone 7 strongly influenced ATP levels and impaired the proliferative capacity of T24 cells without activating caspase-3.</p> <p style="text-align: right;">© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.</p>

1. Introduction

Normal cells fit their environment perfectly and respond to external signals via tightly regulated pathways that either trigger or repress growth. Cancer arises when a cell escapes the normal brake placed on its growth and begins to divide in an uncontrolled fashion. Tumorigenesis appears to be a multistep mechanism reflecting the genetic alterations that progressively drive a normal tissue to malignancy [1,2]. Interestingly, this evolutionary process seems to be related to the acquisition of six main alterations in cell physiology: Self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth signals, tissue invasion and metastasis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis, and evasion of apoptosis [3]. The exploration of new ways to induce cancer cell death, including the reactivation of apoptosis, is therefore a major goal of chem- and radiotherapy oncologists today.

In this context, it has been shown that oxidative stress induced by menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) leads to cell death

by either necrosis or apoptosis [4,5]. Working with murine hepatoma cells, we recently reported that inactivated 2-arylfuryl-3-nitro-1,4-benzoquinone could undergo an activation process by a redox mechanism causing necrosis-like cell death, while 2-arylfurylbenzoquinone, which is less capable of bioelectroactive activation, seems to induce apoptosis [6]. The redox cycling activity of 2-arylfuryl-1,4-naphthoquinone and its 5- and 5,8-hydroxyderivatives was further studied in the presence or absence of a biologically relevant reducing agent like ascorbate. We found that the electron donor effect of the *para*-hydroxyl substituents on aryloxyfurylbenzoquinones and the hydrogen bond between the *para*-hydroxyl and quinone carbonyl groups influenced the electron-acceptor capability of the quinone nucleus, thus modifying electron transfer from ascorbate to the electroactive quinone nucleus [7]. Furthermore, we recently reported that the cytotoxicity of furyl-1,4-quinones is dependent on the nature of the substituents linked to the quinone electroactive nucleus and, therefore, apparently associated with their LUMO energies and their hydrophobic properties [8].

1,4-Naphthoquinones, possessing an amino or a substituted amino group in the 2-position, have been a subject of study for many years because of their use in a variety of medical and biological applications, including as antitubercular, antimetastatic,

* Corresponding author. Tel.: +32 2 364 73 95; fax: +32 2 364 73 58.
 E-mail address: julien.verrax@kuleuven.be (J. Verrax).

ANEXO C- primeira página do artigo publicado no periódico *Biochemical and Biophysical Research Communications*, volume 433, páginas 573 a 578 (2013), sob o título *Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells*. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.028

Biochemical and Biophysical Research Communications 433 (2013) 573–578



Antiproliferative effects of phenylaminonaphthoquinones are increased by ascorbate and associated with the appearance of a senescent phenotype in human bladder cancer cells

K.B. Felipe^a, J. Benites^c, C. Glorieux^c, B. Sid^c, M. Valenzuela^c, M.R. Kvecinski^d, R.C. Pedrosa^a, J.A. Valderrama^d, Ph. Leveque^e, B. Gallez^e, J. Verrax^e, P. Buc Calderon^{b,c,*}

^aLaboratório de Bioprocessos Experimentais, Departamento de Bioprocessos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^bFacultad de Ciencias de la Salud, Universidad Arturo Prat, Avenida Arturo Prat 230, Coque 121, Iquique, Chile

^cUniversité Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Toxicology and Cancer Biology Research Group (TCBG), Brussels, Belgium

^dDepartamento Químico Orgánica, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vialba Madresanz 4800, Coque 305, Santiago, Chile

^eUniversité Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Biomedical Magnetic Resonance Research Group (BRMA), Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 March 2013
Available online 22 March 2013

Keywords:
Ascorbate
Cell proliferation
Naphthoquinones
Senescence
T24 bladder cancer cell

ABSTRACT

Quinone-containing molecules have been developed against cancer mainly for their redox cycling ability leading to reactive oxygen species (ROS) formation. We have previously shown that donor-acceptor phenylaminonaphthoquinones are biologically active against a panel of cancer cells. In this report, we explored the mechanisms involved in cancer cell growth inhibition caused by two phenylaminonaphthoquinones, namely Q7 and Q9, with or without ascorbate (ASC). The results show that Q7 and Q9 are both redox cyclers able to form ROS, which strongly inhibits the proliferation of T24 cells. Q9 was a better redox cyclizer than Q7 because of marked stabilization of the semiquinone radical species arising from its reduction by ascorbate. Indeed, ASC dramatically enhances the inhibitory effect of Q9 on cell proliferation. Q9 plus ASC impairs the cell cycle, causing a decrease in the number of cells in the G2/M phase without involving other cell cycle regulating key proteins. Moreover, Q9 plus ASC influences the MAPK signaling pathway, provoking the appearance of a senescent cancer cell phenotype and ultimately leading to necrosis-like cell death. Because cellular senescence limits the replicative capacity of cells, our results suggest that induction of senescence may be exploited as a basis for new approaches to cancer therapy. © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer is a major health problem affecting humans. Nearly 15 million new cases are diagnosed globally every year [1], but the use of conventional cancer chemotherapy is limited because of its toxic side effects [2].

As part of our ongoing studies concerning the preparation of potential biologically active compounds [3–5], we were interested in the synthesis of diversely substituted donor-acceptor phenylaminonaphthoquinones. Briefly, using an MTT-based screening assay, we have shown that these compounds are biologically active against a panel of cancer cells. Among this series, two quinones (namely Q7 and Q9) markedly impaired the cellular ability to reduce MTT in three different cancer cell lines, while having a low cytotoxicity on healthy fibroblasts [4]. Previous data also have

shown that the association of ascorbate (ASC) with some quinone-containing compounds potentiates their antitumor activity [3,6,7].

Because ascorbate enhances the redox cycling of menadione (a 1,4-naphthoquinone) leading to activation of the p38 MAPK pathway in breast MCF-7 cancer cells [8], we hypothesized about a potential involvement of this pathway in the mechanism by which phenylaminonaphthoquinones cause cell growth arrest. On the other hand, the enzymatic cascades of ERK1/2 and p38 MAPK have been reported to be involved in premature senescence [9,10]. Cellular senescence is a growth-arrest program that limits the lifespan of mammalian cells and prevents unlimited cell proliferation [11]. Interestingly, when apoptosis fails to induce cancer cell death, the induction of cellular senescence is attractive because of its relationship with tumor suppression.

The aim of this paper was, therefore, to explore the effects of phenylaminonaphthoquinones, alone or associated with a ascorbate (ASC), on cancer cell growth and cellular senescence. We describe the antiproliferative effects and the senescent phenotype induced by the selected quinones, namely Q7 [2-(4-hydroxyphenyl)-1,4-

* Corresponding author at: Université Catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Toxicology and Cancer Biology Research Group (TCBG), Brussels, Belgium. Fax: +32 2 7647359.

E-mail address: p.bucalderon@uclouvain.be (P. Buc Calderon).