

Fernanda Biscaro

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E PRÓ-
APOPTÓTICO DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius* Baill**

Florianópolis

2011

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

Fernanda Biscaro

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E PRÓ-
APOPTÓTICO DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius* Baill**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2011

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

B621e Biscaro, Fernanda

Estudo do efeito antiproliferativo e pró-apoptótico do látex de *Croton celtidifolius* Baill [dissertação] / Fernanda Biscaro ; orientadora, Rozangela Curi Pedrosa. - Florianópolis, SC, 2011.

99 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. *Croton celtidifolius*. 3. Células mortas. 4. Câncer - Tratamento. I. Pedrosa, Rozangela Curi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

Fernanda Biscaro

**ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO E PRÓ-
APOPTÓTICO DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius* Baill**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 28 de Janeiro de 2011.

Prof. Dr. Marcelo Farina
Coordenador do PPGBQA

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Claus Tröger Pich
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha mãe Iára e meu pai Itamar,
À minha irmã Andressa,
Ao meu namorado José.

AGRADECIMENTOS

É difícil encontrar palavras para descrever a alegria de ter concluído mais esta etapa de minha vida, porém mais difícil ainda é encontrar palavras que possam agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me deram suporte para que eu pudesse chegar até aqui.

À Deus por todas as manhãs em que posso acordar para mais um maravilhoso dia de vida e de lutas.

Aos meus pais, Iára e Itamar, pelo exemplo de caráter, pelo amor incondicional, dedicação e compreensão em todos os momentos.

À minha irmã Andressa e meu cunhado Péricles pela companhia, amizade e incentivo durante essa caminhada. À minha vó Araci, que com 84 anos sempre me mostrou que é preciso ter fé em tudo o que fazemos.

Ao meu namorado, José, pelo amor, paciência, apoio e respeito, sendo que mesmo longe me incentivou com muita alegria a lutar pelos meus objetivos.

À minha orientadora, Rozangela Curi Pedrosa, pela paciência, objetividade e dedicação na orientação deste trabalho.

Às minhas amigas, Priscila, Gabriela e Andréia.

Aos meus amigos, Eduardo Benedetti Parisotto, Tânia Mara Fischer Günther e Nádia Falcão Bucker, pelas incansáveis horas de experimentos.

Aos colegas do LABIOEX: Mirele Sifroni Farias, Eduardo Antônio Ferreira, Ana Cláudia Vieira, Carla Baron, Karina Bettega Felipe, Maicon Roberto Kwiecinski.

A todos os que acreditaram e torceram para que eu conseguisse conquistar mais essa vitória em minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

A CAPES pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado.

A todos vocês, meu eterno MUITO OBRIGADA.

“Tenho o desejo de realizar uma tarefa importante na vida. Mas meu primeiro dever está em realizar humildes coisas como se fossem grandes e nobres.”

Helen Keller

RESUMO

Apesar de todos os recursos existentes na atualidade para o tratamento do câncer uma diversidade de problemas é observada tanto em relação à eficácia dos medicamentos e/ou sua resistência quanto à gama de efeitos colaterais que podem ser induzidos pelos mesmos. Na tentativa de aprimorar a terapia antitumoral novos agentes antineoplásicos de origem natural têm sido buscados visto que a maior parte dos medicamentos existentes é proveniente de plantas medicinais. *Croton celtidifolius* pertencente à família Euphorbiaceae, composta por diversas plantas que possuem atividade antitumoral, é uma planta promissora uma vez que é utilizada popularmente com esta finalidade. O presente estudo propôs avaliar a atividade citotóxica, nucleásica e pró-apoptótica, *in vitro*, e a atividade antitumoral e antiangiogênica, *in vivo*, do látex de *C. celtidifolius*. As análises espectrofotométricas do látex bruto permitiram a identificação de um alto conteúdo de fenóis totais (18,54 g/L), enquanto que as análises cromatográficas (CLAE) permitiram a detecção de compostos fenólicos como flavonóis (miricetina, quercetina e campferol) e flavan-3-óis (catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina). No ensaio do MTT, para a avaliação da citotoxicidade, a CI_{50} encontrada para as células de Ehrlich e MCF-7 foram $169 \pm 1,8$ e $187 \pm 2,2$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, foi possível observar uma redução dose-dependente significativa na viabilidade celular. A coloração diferencial com brometo de etídio (BE) / laranja de acridina (LA) demonstrou o predomínio da indução de morte celular por apoptose que pode possivelmente ser explicada através dos resultados obtidos no ensaio de atividade nucleásica onde o látex foi capaz de causar quebras simples e dupla no DNA plasmidial submetido ao tratamento. Adicionalmente os experimentos realizados com os animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) demonstraram que o látex de *C. celtidifolius* foi capaz de inibir o crescimento tumoral ao reduzir o peso dos animais, o volume de tumor, a quantidade de células compactadas e a proporção de células/volume de tumor. A inibição tumoral observada para o látex (La1: 0,78; La2: 1,56 e La3: 3,25 mg/kg) foi 26; 32 e 54%. O dado mais relevante neste ensaio foi o aumento dose-dependente no tempo médio de sobrevivência (TMS) (CN: 13; La1: 15,5; La2: 16 e La3: 17,5 dias) e no percentual de aumento de longevidade (PAL) (CN: 0,00; La1: 19,23; La2: 23,08 e La3: 34,61%). Além disso, também foi relatado o efeito antiangiogênico do látex (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco) uma vez que este foi capaz de provocar redução na porcentagem de vasos sanguíneos (41; 56; 66 e 75%) observados no

ensaio da membrana corioalantóica (CAM). O látex não provocou toxicidade ao embrião uma vez que não foi capaz de alterar a sua morfogênese. Assim, conclui-se que *C. celtidifolius* apresenta efeitos citotóxico, nucleásico e pró-apoptótico inter-relacionados; e ainda, potencial efeito antitumoral e antiangiogênico.

Palavras-chave: *Croton celtidifolius*, citotoxicidade, antiangiogênico, antitumoral.

ABSTRACT

Despite all the resources at this time for cancer treatment is a diversity of problems observed regarding the efficacy of drugs and/or its resistance as well as the side effects that can be induced by them. In an attempt to improve antitumor therapy new antineoplastic agents from natural sources has been sought since the majority of existing drugs is derived from medicinal plants. *Croton celtidifolius* belonging to the family Euphorbiaceae, comprising several plants that have antitumor activity, is a promising plant since it is popularly use for this purpose. The present study was to evaluate the citotoxic, nucleasic and pro-apoptotic activities *in vitro*, and antitumor and antiangiogenic activities *in vivo* from the latex of *C. celtidifolius*. The spectrofotometric analysis of crude latex allowed the identification of a high content of total phenols (18.54 g/L), while chromatography (HPLC) allowed the detection of phenolic compounds such as flavonols (myricetin, quercetin and kaempferol) and flavan-3-ols (catechin, epicatechin, galocatechin and epigallocatechin). In the MTT assay, for the evaluation of citotoxicity, the IC₅₀ observed for the Ehrlich and MCF-7 cells were 169 ± 1.8 e 187 ± 2.2 µg/mL, respectively. Furthermore we observed a significant dose-dependent reduction in cell viability. The differential staining with ethidium bromide (BE) / acridin orange (LA) showed the predominance of the induction of apoptotic cell death that can possibly be explained from the tests results of nucleasic activity where latex was able to induced simple and double breaks on treated plasmidal DNA. In addition the experiments with animals carrying the Ehrlich ascitic tumor (TAE) showed that the latex of *C. celtidifolius* was able to inhibit tumor growth by reducing the weight of the animals, tumor volume, the amount of packed cells and the proportion of cells / tumor volume. The tumor inhibition observed for the latex (La1: 0.78; La2: 1.56 and La3: 3.25 mg/kg) was 26; 32 and 54%. The most relevant data from this trial was a dose-dependent increase in mean survival time (TMS) (CN: 13; La1: 15.5; La2: 16 e La3: 17.5 dias) and the increase in the percentage of longevity (PAL) (CN: 0.00; La1: 19.23; La2: 23.08 and La3: 34.61%). Furthermore, was showed the antiangiogenic effect of the latex (0.5; 1.0; 1.5 e 2.0 mg/disc) since it was capable of causing reduction in the percentage of blood vessels (41; 56; 66 and 75%) observed in the chorioallantoic membrane assay (CAM). The latex caused no toxicity to the embryo as it was unable to alter its morphogenesis. Thus, it appears that *C. celtidifolius* latex presents citotoxic, nucleasic and pro-apoptotic

effects interrelated and also potential antiangiogenic and antitumor effects.

Keywords: *Croton celtidifolius*, cytotoxicity, antiangiogenic, antitumor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Demonstração das duas principais vias de ativação da apoptose (extrínseca e intrínseca) que terminam em um ponto comum – ativação da caspase 3 com a conseqüente morte celular.....28
- Figura 2.** Representação esquemática da angiogênese tumoral iniciada a partir da liberação de fatores de crescimento, como por exemplo, VEGF e o processo de metástase.....33
- Figura 3.** (A) Folhas de *C. celtidifolius*; (B) Inflorescência de *C. celtidifolius*, (C) Fruto de *C. celtidifolius*.....38
- Figura 4.** Estrutura dos principais compostos flavonóides (flavan-3-óis) encontrados no látex de *C. celtidifolius*.....43
- Figura 5.** Estrutura dos principais compostos flavonóides (flavonóis) encontrados no látex de *C. celtidifolius*.....44
- Figura 6.** Três conformações que o DNA plasmidial pode apresentar. Ao sofrer quebra simples FI é transformado em FII; ao sofrer quebra dupla FI é transformado em FIII.....47
- Figura 7.** Imagem representativa de um gel de agarose obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos.....48
- Figura 8.** a) Ovos de *Gallus domesticus* fertilizados utilizados para a realização do ensaio de CAM; b) Localização da membrana corioalantóica (em vermelho) ao redor do embrião; c) Organização da membrana corioalantóica onde: 1 – epitélio coriônico; 2 – mesoderma contendo vasos corados em vermelho; 3 – epitélio alantóico.....53
- Figura 9.** Medidas cefálico-cervical (CCV) e cervical-caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie *Gallus domesticus*.....54
- Figura 10.** Efeito dose dependente do látex (31,25 - 500 µg/mL) de *C. celtidifolius* sobre a viabilidade celular nas linhagens Ehrlich e MCF-7 após 48 horas de tratamento. Os resultados foram apresentados como Média ± Desvio Padrão. (** e ***) representam diferença estatística

significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) respectivamente, em relação ao controle negativo (meio de cultura); ($n = 3$).....56

Figura 11. Mudanças na conformação do DNA plasmidial provocadas pelo efeito dose dependente do látex (0,78 - 25,00 $\mu\text{g/mL}$) de *C. celtidifolius*. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. (α^{***} , β^{***} e γ^{***}) representam diferença significativa ($p < 0,001$) das formas FI, FII e FIII, respectivamente, em relação ao CN (controle negativo: salina), ($n = 3$).....58

Figura 12. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com o látex (169 $\mu\text{g/mL}$) de *C. celtidifolius* por um período de 48 horas. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão das porcentagens de células viáveis e apoptóticas. (α^{***} e β^{***}) representam diferença estatística significativa ($p < 0,001$) de células viáveis e apoptóticas em relação ao CN (controle negativo: meio de cultura) e CP (controle positivo: doxorrubicina), respectivamente, ($n = 3$).....59

Figura 13. Tipo de morte celular observada através da coloração diferencial BE/LA no carcinoma ascítico de Ehrlich após 48 horas de tratamento com *C. celtidifolius*. (a, b e c) representam controle negativo (meio de cultura), controle positivo (doxorrubicina) e tratamento com o látex (169 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Obs: aumento 40x.....60

Figura 14. Efeito do tratamento com o látex (0,78; 1,56 e 3,12 mg/kg) de *C. celtidifolius* sobre a inibição do crescimento tumoral nos animais inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão ($n = 6$). (α^{***} e β^{***}) representam diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao CN (controle negativo: salina) e CP (controle positivo: doxorrubicina), respectivamente.....62

Figura 15. Percentual de vasos sanguíneos existentes após o tratamento com o látex (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco) de *C. celtidifolius*. Os resultados expressos como Média \pm Desvio Padrão ($n = 6$). (α^{**} e α^{***} ; β^{***}) significam diferença estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em relação ao CN (controle negativo: salina) e CP (controle positivo: ácido retinóico (1 $\mu\text{g/disco}$)); respectivamente.....63

Figura 16. Efeito antiangiogênico do látex de *C. celtidifolius* sobre a vascularização da membrana corioalantóica de embriões de *Gallus domesticus* no oitavo dia de vida. A) Controle negativo tratado com solução salina; B) controle positivo tratado com ácido retinóico; C, D, E e F) tratamento com o látex (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco); respectivamente.....64

Figura 17. Efeito do látex de *C. celtidifolius* sobre o comprimento total dos embriões de *Gallus domesticus* no oitavo dia de vida. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 μ g/disco)), respectivamente.....65

Figura 18. Efeito do látex na morfogênese dos embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A figura representa a razão do comprimento cefálico-cervical (CCV) pelo comprimento cervical-caudal (CVC). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 μ g/disco)), respectivamente.....66

Figura 19. Efeito do látex na morfogênese dos embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A figura representa a razão do comprimento cefálico-cervical (CCV) pelo comprimento total (CCV + CVC). Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 μ g/disco)), respectivamente.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais (g/L), flavonóis (mg/L) e flavan-3-óis (mg/L) encontrados no estudo químico do látex de *C. celtidifolius*.....55

Tabela 2. Valores de $CI_{50} \pm$ Desvio Padrão obtidos a partir do efeito citotóxico do látex de *C. celtidifolius* (32,5 – 500 μ g/mL) sobre as linhagens tumorais Ehrlich e MCF-7 *in vitro*.....56

Tabela 3. Efeito do látex La1 (0,78 mg/kg); La2 (1,56 mg/kg) e La3 (3,12 mg/kg) de *C. celtidifolius* em camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich sobre os parâmetros morfológicos dos animais.....61

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	Sociedade Americana de Câncer
Apaf-1	Fator-1 ativador de protease apoptótica
BE/LA	Brometo de etídio / Laranja de acridina
bFGF	Fatores de crescimento de fibroblastos (Tipo básico ou tipo 2)
CAM	Ensaio da Membrana corioalantóica
CCV	Flexura cefálico-cervical
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Controle positivo
CVC	Flexura cervical-caudal
DAD	Detector de arranjo diodo
DISC	Complexo sinalizador indutor da morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
DR	Receptores de morte
dTDP	5-desoxitimidina-difosfato
dTMP	5-desoxitimidina-monofosfato
dTTP	5-desoxitimidina-trifosfato
EAF	Fração acetato de etila
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Proteína adaptadora (Fas) com domínio de morte
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FI	Forma superenovelada
FII	Forma circular aberta
FIII	Forma linear
FLIPS	<i>FADD-like interleukin-1b converting enzyme-like protease inhibitory protein</i>
i.p.	Via intraperitoneal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
La	Látex
LB	Látex Bruto
LU	Látex utilizado após processamento

ESI-MS	Ionização por eletrospray – espectrometria de massa
MMPs	Metaloproteases
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5- difeniltetrazolil
n	Número
NCI	Instituto Nacional do Câncer (EUA)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Absoluto
PAL	Percentual de aumento de longevidade
PBS	Tampão salina fosfato
PEDF	Fator derivado de epitélio pigmentado
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SOD	Enzima superóxido dismutase
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Tempo médio de sobrevida
TQ1	Timidina quinase 1
VEGFs	Fator de crescimento do endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	CÂNCER.....	23
1.2	BASES GENÉTICAS DO CÂNCER.....	25
1.3	APOPTOSE.....	26
1.4	CORRELAÇÃO ENTRE CÂNCER E APOPTOSE.....	29
1.5	ANGIOGÊNESE FISIOLÓGICA E TUMORAL.....	31
1.6	A FITOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	34
1.7	O GÊNERO <i>Croton</i>	36
1.8	<i>Croton celtidifolius</i> Baill.....	37
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	OBJETIVO GERAL.....	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3	METODOLOGIA.....	41
3.1	COLETA DO MATERIAL.....	41
3.2	PREPARO DO LÁTEX DE <i>Croton celtidifolius</i>	41
3.3	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX.....	42
3.3.1	Análises espectrofotométricas.....	42
3.3.2	Análises cromatográficas.....	42
3.3.2.1	Conteúdo de flavan-3-óis.....	42
3.3.2.2	Conteúdo de flavonóis.....	43
3.4	CULTURA DE CÉLULAS.....	44
3.5	COMITÊ DE ÉTICA.....	45
3.5.1	Animais.....	45
3.5.2	Ovos fertilizados.....	45
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vitro</i>	46
3.6.1	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT.....	46
3.6.2	Avaliação da atividade nucleásica.....	47
3.6.2.1	Dano ao DNA plasmidial.....	47
3.6.3	Avaliação da indução da apoptose.....	49
3.6.3.1	Coloração pelo Brometo de Etídio/Laranja de acridina.....	49
3.7	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vivo</i>	49
3.7.1	Avaliação da atividade antitumoral.....	49
3.7.1.1	Avaliações cronomorfológicas.....	50
3.7.1.1.1	Média de sobrevivida.....	50
3.7.1.1.2	Variação de peso dos animais.....	51
3.7.1.1.3	Inibição do crescimento do tumor.....	51
3.7.1.2	Avaliações histocitológicas.....	51
3.7.1.2.1	Viabilidade celular através do método de exclusão do corante	

	azul de tripan.....	51
3.7.1.2.2	Volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas.....	52
3.7.2	Ensaio da membrana corioalantóica (CAM).....	52
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX.....	55
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vitro</i>	55
4.2.1	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT.....	55
4.2.2	Avaliação da atividade nucleásica.....	57
4.2.2.1	Dano ao DNA plasmidial.....	57
4.2.3	Avaliação da indução da apoptose.....	58
4.2.3.1	Coloração pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	58
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vivo</i>	60
4.3.1	Avaliação da atividade antitumoral.....	60
4.3.2	Ensaio da membrana corioalantóica (CAM).....	63
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONCLUSÕES.....	79
7	PERSPECTIVAS.....	80
8	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer, 2010) o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que são capazes de invadirem tecidos e órgãos (ALMEIDA et al., 2005).

Nos Estados Unidos, no ano de 2006, segundo a *American Cancer Society* (ACS, 2010), assim como no Brasil desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda maior causa de morte da população. A estimativa brasileira para os anos de 2010/11 mostra que são esperados 489.270 milhões de novos casos de câncer. Entre esses o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente (114 mil novos casos), seguido pelos tumores de próstata (52 mil) e mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e de colo de útero (18 mil) (INCA, 2010).

Existem diversos fatores promotores do câncer, entre esses podem ser citados fatores externos ao organismo como: substâncias químicas presentes na alimentação, tabagismo, radiação, organismos infecciosos (vírus); e fatores internos como: mutações, hormônios, condições do sistema imune, sendo que estes podem estar inter-relacionados atuando em conjunto ou na seqüência de iniciação e promoção da carcinogênese (MOFFAT et al., 2000; ACS, 2010; INCA, 2010).

Dessa forma, a partir do ponto inicial da doença, a proliferação celular passa a ocorrer de forma bastante rápida, caracterizando sua agressividade. Esse descontrole na proliferação celular permite então que as células se acumulem, dando início à formação de uma massa tumoral (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2000).

Para que um tumor seja classificado como maligno (neoplasia), seu crescimento precisa ser desordenado além de ser necessariamente capaz de invadir tecidos vizinhos ou se espalhar para sítios distantes (metástase). Já um tumor benigno é simplesmente uma massa de células localizadas que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de morte (THOMPSON et al., 2002).

Conforme descrito pelo INCA (2010) existem três abordagens principais para o tratamento do câncer estabelecido: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo que o papel de cada uma delas irá depender do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento. Caso

não exista metástase, a intervenção cirúrgica é capaz de remover tumores com eficácia. A radioterapia então é empregada em conjunto com a cirurgia como forma de incrementar a eficiência do tratamento.

Normalmente, um terço dos pacientes consegue ser curado através das medidas locais já citadas, mas quando a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de metástases torna-se necessário uma forma de tratamento sistêmica, como a quimioterapia, que emprega medicamentos aplicados em sua maioria via intravenosa ou também por via oral, subcutânea, intramuscular e intratecal com o objetivo de destruir as células doentes que fazem parte do tumor (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2010).

Atualmente as principais classes de medicamentos utilizados na terapia do câncer incluem: os antimetabólitos, que bloqueiam uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA (ex: mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, fluorouracil); agentes alquilantes que formam ligações covalentes com o DNA impedindo sua replicação (ex: mostardas nitrogenadas, nitrosuréias, cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: daunorrubicina, doxorubicina, etoposídeo); e agentes inibidores da síntese do RNA ou de proteínas (ex: actinomicina D, vincristina e vimblastina) (RICHARDSON, 2000; RANG; DALE, 2007).

Entre as classes de medicamentos apresentadas destacam-se devido à sua importância, os antibióticos naturais, especialmente a doxorubicina (antraciclinas) utilizada como controle positivo na maioria dos experimentos deste trabalho.

Este medicamento, isolado a partir da bactéria *Streptomyces peucetius* é capaz de agir sobre as células tumorais por três mecanismos de ação distintos: o primeiro, seria pela formação de ligações com os grupos fosfolipídeos da membrana celular alterando sua fluidez; o segundo seria através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da semiquinona; e o terceiro modo de ação seria a formação de ligações interfilamentares com o DNA e RNA assim como a diminuição da atividade da enzima topoisomerase II (ALMEIDA et al., 2005; NCI, 2010).

Apesar da utilização e da eficácia dos agentes antineoplásicos, nenhum composto existente é capaz de reduzir totalmente as várias manifestações dessa patologia. Diversos são os problemas observados na terapia desta doença principalmente porque os agentes antineoplásicos não são seletivos conduzindo a uma série de efeitos colaterais aos pacientes que fazem seu uso. Não menos importante, é preciso ressaltar que a maior falha na terapia antineoplásica é decorrente

da “resistência às múltiplas drogas” adquirida pelas populações celulares através de mutações (GILLET; GOTTESMAN, 2010; INCA, 2010).

1.2 BASES GENÉTICAS DO CÂNCER

A maior parte dos tipos celulares carrega em si um genoma completo que corresponde a informações que dão à célula a habilidade de crescer e se dividir, mesmo depois do organismo já desenvolvido. Isso garante a manutenção do tecido adulto ao longo da vida do indivíduo e inclui o reparo de lesões assim como a reposição de células que sofrem desgaste devido a sua atividade por um longo período (WEINBERG, 2008). Porém, essa versatilidade gera um grande risco uma vez que sua seqüência de genes serve de alvo para diversos mecanismos que alteram sua estrutura (mutação) e assim a informação contida no genoma (ALMEIDA et al., 2005).

O resultado de uma mutação são alterações na seqüência de bases do DNA, que, se replicada e transmitida às futuras gerações celulares, se torna permanente. As mutações podem estar envolvidas na substituição de um par de bases por outro ou a adição ou deleção de um ou mais pares de bases (LEHNINGER, 1976).

Esses “defeitos” genéticos podem ser gerados através de mutágenos ambientais, como carcinógenos químicos ou radiação e ainda durante o metabolismo celular normal através da geração de EROs. É muito provável que o mecanismo mais comum da mutagênese esteja relacionado com erros espontâneos durante a replicação e reparo do DNA visto que ocorrem 10^7 mitoses durante o tempo médio de sobrevivência de um ser humano (RUBIN; FARBER, 2002).

Sendo assim, o câncer é considerado basicamente uma doença celular onde o crescimento desregulado das células cancerosas é resultado da aquisição seqüencial de mutações somáticas em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (THOMPSON et al., 2002).

Dessa forma, a evolução dessa doença ocorre através do acúmulo adicional de danos genéticos em genes que codificam a maquinaria celular resultando em clones cada vez mais aberrantes até o aparecimento final de um fenótipo maligno. Os genes envolvidos na patogênese do câncer podem ser divididos em duas categorias: os oncogenes e os genes supressores tumorais (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004).

Os oncogenes (ex: *Ras*) são versões alteradas de genes normais, denominados proto-oncogenes, que regulam o crescimento e a diferenciação normais das células. Em geral, os oncogenes apresentam mutações de “ganho de função”, ou seja, facilitam a transformação maligna por mecanismos tais como o estímulo da proliferação, o aumento de suprimento de sangue para o tumor e a inibição da apoptose (AUDIC; HARTLEY, 2004).

Já os genes supressores tumorais (ex: *p53*, *Rb*) são genes normais cujos produtos inibem a proliferação celular. Dessa forma, a perda da função das proteínas resultantes da sua codificação levam a uma divisão celular descontrolada e ao crescimento celular anormal ou apoptose deficiente (RUBIN; FARBER, 2002).

1.3 APOPTOSE

Os organismos multicelulares, frequentemente precisam eliminar células que estão em excesso ou são potencialmente perigosas. Tão importante quanto a divisão e a migração celular, a morte celular programada, ou apoptose, permite que o organismo controle firmemente o número de células e o tamanho dos tecidos, além de se proteger contra células que podem ameaçar a homeostase (HENGARTNER, 2000; FRANCO; CIDLOWSKI, 2009).

Este evento é essencial ao ponto de promover a conservação de elementos celulares como aminoácidos, nucleotídeos, entre outros. Neste sentido o processo de apoptose tem como reguladores positivos os fatores de crescimento e os proto-oncogenes, capazes de estimular a progressão do ciclo celular e como reguladores negativos os supressores tumorais que agem de modo contrário inibindo os reguladores positivos (PAROLIN; REASON, 2001).

A partir do momento em que uma célula recebe o estímulo para que se inicie a apoptose começam a ocorrer diversas alterações em sua morfologia como o seu arredondamento, retração dos pseudópodos, redução do volume, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, pouca ou nenhuma modificação em suas organelas e divisão em corpos apoptóticos (KROEMER et al., 2005). Esses últimos são rapidamente fagocitados e removidos impedindo a geração de processos inflamatórios em torno da célula que acaba de morrer (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Esse mecanismo de morte celular programada pode ser desencadeado por diversas maneiras (Figura 1), seja por um sinal

externo através da via extrínseca ou citoplasmática, ou por um sinal interno através da via intrínseca ou mitocondrial (HENGARTNER, 2000).

A primeira delas, a via extrínseca, é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de morte (DR) representados pelas moléculas: Fas (CD95 ou APO-1), TNFR-1, TRAIL, DR3, DR4, DR5 e DR6. Ao serem ativados, os receptores recrutam proteínas adaptadoras, como por exemplo, a proteína adaptadora associada a CD95, que apresenta um domínio de morte (FADD: Proteína adaptadora (Fas) com domínio de morte). Essas proteínas recrutam a caspase 8 formando um complexo sinalizador iniciador da apoptose (DISC: complexo sinalizador indutor da morte). Como resultado ocorre a ativação da cascata de caspases, onde a caspase iniciadora (8) causa a ativação da caspase efetora (3) desencadeando a morte celular (HENGARTNER, 2000; IGNEY; KRAMMER, 2002; BLAISE et al., 2005).

Já a segunda, a via intrínseca, por sua vez, é ativada por estresse intra ou extracelular como: privação de nutrientes, danos ao DNA (via gene p53), ativação de oncogenes, radiação ultravioleta e níveis elevados de EROs. Os sinais de estresse, em resposta a estes insultos, são enviados a mitocôndria que integra os estímulos de morte celular induzindo a permeabilidade da membrana mitocondrial e a conseqüente liberação do citocromo c para o citosol da célula. O citocromo c forma então um complexo com Apaf-1 (fator-1 ativador de protease apoptótica) denominado apoptossomo que tem como função ativar a cascata de caspases (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Quando os níveis de EROs aumentam demasiadamente ocorre como consequência à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos aumentando dessa forma o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna (abertura do poro mitocondrial). Em resposta a esse dano oxidativo dá-se início a apoptose com a conseqüente liberação de componentes pró-apoptóticos assim como a ativação das caspases 3 e 9 (PAROLIN; REASON, 2001; ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

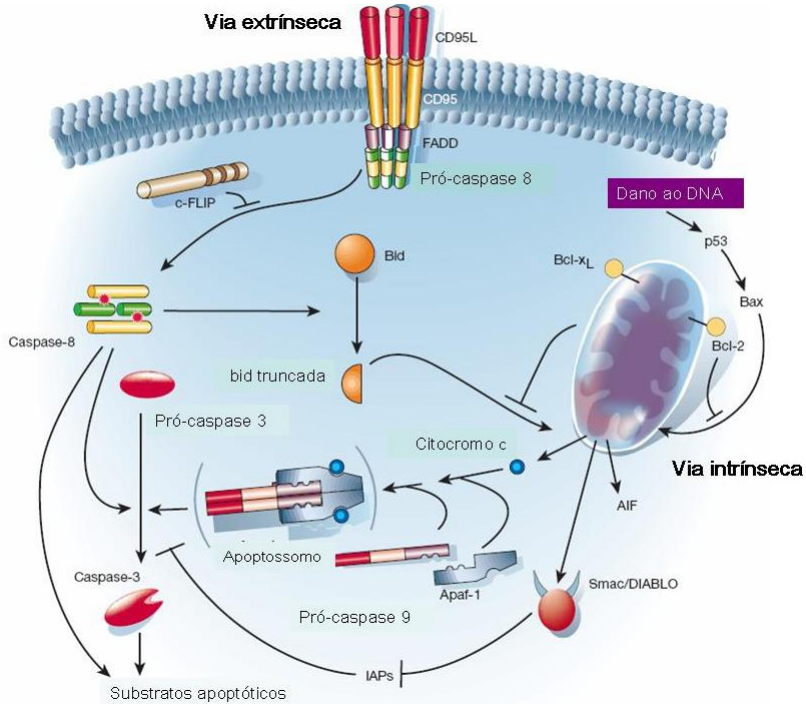


Figura 1. Demonstração das duas principais vias de ativação da apoptose (extrínseca e intrínseca) que terminam em um ponto comum – ativação da caspase 3 com a consequente morte celular. Adaptado de: Hengartner (2000).

Independente da forma de ativação deste evento celular, todas as vias citadas anteriormente terminam em um ponto comum onde ocorre a ativação dos membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases denominadas caspases. Essas enzimas são sintetizadas como zimogênios e se encontram solúveis no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células. Seis das 14 caspases humanas conhecidas participam do processo de apoptose (3, 6, 7, 8, 9 e 10) (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997).

As caspases sinalizam para a apoptose ao clivar substratos que contenham resíduos de aspartato causando a condensação, fragmentação nuclear e a externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para que as células sejam fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A regulação do processo de apoptose é extremamente eficiente uma vez que requer a interação de inúmeros fatores. Geneticamente, esta regulação está relacionada com os membros da família Bcl-2 que podem exercer função reguladora oposta. Alguns membros são capazes de induzir a morte celular por atuar como proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, BH1, BH3; Bid, Bad, PUMA, NOXA) ao passo que outros são capazes de reprimir a morte celular por atuar como proteínas anti-apoptóticas (BH1, BH4, Bcl-2, Bcl-XL) (KROEMER, 1997).

Para que a homeostasia celular seja mantida é necessário um balanço entre as quantidades de proteínas de cada classe. Os membros pró-apoptóticos encontram-se no citosol e ao serem ativados são translocados para a mitocôndria alterando a sua permeabilidade de membrana, permitindo dessa forma o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas indutoras desse processo de morte celular. Já os membros anti-apoptóticos, inibem a apoptose, pois são capazes de prevenir a exclusão do citocromo c (PAROLIN; REASON, 2001).

Existem ainda alguns outros reguladores da apoptose, entre estes pode ser citado a molécula FLIPS (*FADD-like interleukin-1 β converting enzyme-like protease inhibitory protein*) que atua diretamente a nível de DR interferindo na etapa inicial do processo de apoptose (KRUEGER et al., 2001). Essas proteínas, identificadas em células humanas, são estruturalmente semelhantes à pró-caspase 8. Isso permite a sua associação a uma proteína adaptadora e a consequente formação do complexo DISC, porém inibe a ativação da caspase 8 iniciadora (IGNEY; KRAMMER, 2002).

1.4 CORRELAÇÃO ENTRE CÂNCER E APOPTOSE

A apoptose, como já foi descrita, é um processo fisiológico que auxilia na manutenção da homeostase celular e tecidual. Porém, este tipo de morte celular programada também pode estar envolvido na etiologia de várias doenças humanas como câncer, desordens neurodegenerativas e doenças autoimunes (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009).

Uma das características mais importantes do câncer é o crescimento contínuo da massa tumoral. Hoje, sabe-se que todos os tumores malignos adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. Desse modo, as taxas de proliferação e de morte celular podem ser consideradas fatores determinantes do seu crescimento (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Portanto, a incapacidade de uma célula se submeter a apoptose pode adiantar o desenvolvimento dessa doença permitindo que células tumorais se dividam e se acumulem além de não permitir que elas eliminem fatores mutantes genéticos que podem levar a um potencial efeito maligno. Em vista disso, estudos apontam que a resistência a apoptose pode ser adquirida de diferentes formas e em vários estágios da formação do tumor (FORONES et al., 2005).

Diversas são as proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular e apoptose (c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKB, família Bcl-2 (Bax, Bid), NF-Kb, CDK e ciclinas) sendo que cada uma delas responde a um estímulo que pode ser indução da proliferação celular, parada do ciclo celular ou morte. Vários também são os fatores que podem causar mutação nos genes que codificam estas proteínas reguladoras sendo assim, as proteínas perdem sua função caracterizando a doença conhecida como câncer (PAROLIN; REASON, 2001).

Uma das mutações que pode ser citada é a mutação no gene *p53* que codifica a proteína p53. Esta participa da regulação do ponto de checagem na fase G1 do ciclo celular sendo extremamente importante para a manutenção da integridade do genoma. Ao induzir uma parada nesta fase do ciclo celular a proteína p53 permite a detecção de danos celulares podendo dar início a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (VERMEULEN et al., 2003).

Estudos de mutações padrão no gene *p53* podem oferecer indícios de que tanto processos biológicos internos como ataques químicos ao DNA por substâncias exógenas são importantes fontes de mutação no câncer humano. Portanto, a função da proteína p53 alterada não induz mais a parada do ciclo em G1 e a proliferação da massa tumoral segue adiante (HOLLSTEIN et al., 1994).

Outro gene que se encontra superexpresso em vários tipos de câncer é o gene *Bcl-2*. Este gene é responsável pela indução da proteína Bcl-2 que atua como molécula bloqueadora do processo apoptótico. Ao se unir à molécula pró-apoptótica Bax, a proteína Bcl-2 impede a formação do homodímero Bax-Bax, dessa maneira não ocorre a formação do poro mitocondrial e a liberação do citocromo c fica impedida, evitando assim a morte das células tumorais (CORY; ADAMS, 2002; GOGVADZE; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2009).

Uma outra proteína, denominada c-Myc, é uma fosfoproteína que funciona como um fator de transcrição estimulador tanto da progressão ciclo celular como da apoptose. Essa proteína pode exercer efeito sobre a progressão do ciclo celular através da ativação da

transcrição de genes que apresentam um importante papel no controle do ciclo celular (ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs)). Por outro lado, sua superexpressão pode induzir a morte por apoptose (não se sabe exatamente como) por estar associada às vias que envolvem as proteínas p53, Bcl-2, Fas (VERMEULEN et al., 2003).

Frente a todos esses conhecimentos, a apoptose na prática clínica vem sendo considerada alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada. Portanto, a elucidação de alguns mecanismos moleculares de apoptose abriu possibilidades de modulação deste processo, desse modo, substâncias novas com possível efeito antitumoral têm sido avaliadas frente ao seu potencial em induzir a morte de células tumorais (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

1.5 ANGIOGÊNESE FISIOLÓGICA E TUMORAL

Em 1628 Willian Harvey descobriu que o coração era capaz de bombear sangue para todo o organismo através de artérias, ao passo que o seu retorno seria realizado através de veias. Poucas décadas depois, em 1661, Marcello Malpighi identificou os vasos capilares como os menores vasos que fecham o ciclo circulatório entre artérias e veias (CARMELIET, 2005).

A existência de todo esse sistema circulatório surgiu a partir de dois processos, o primeiro, a vasculogênese, diz respeito à formação de novos vasos durante a fase embrionária. Já o segundo, denominado angiogênese, corresponde ao processo de formação de novos vasos a partir de células endoteliais sendo fisiologicamente essencial ao desenvolvimento de órgãos, a cicatrização de ferimentos e em processos inflamatórios (CARMELIET, 2003).

A regulação desse mecanismo de formação de novos vasos depende principalmente dos fatores pró-angiogênicos: bFGF (fatores de crescimento de fibroblastos –básico ou tipo 2), a família de citocinas VEGFs (fator de crescimento endotelial vascular), angiopoetinas, fatores de adesão, injúria, hipóxia e células inflamatórias e antiangiogênicos: pericitos, endostatinas, angiostatinas, vasostatinas, fragmentos de colágeno tipo XVIII e IV e a PEDF (fator derivado do epitélio pigmentado) (O'REILLY et al., 1997; KERBEL, 2000; BERNARDINI et al., 2003).

Várias são as fases pelas quais o endotélio vascular precisa passar para que o processo angiogênico seja concluído. A primeira delas é o estímulo que as células endoteliais do vaso-mãe recebem de

citocinas angiogênicas citadas anteriormente. Em seguida, a lâmina basal é degradada pela ação de proteases da matriz extracelular (metaloproteases - MMPs) assim, as células endoteliais têm a permissão de migrar para o estroma perivascular, proliferar e dar início ao brotamento capilar. A direção da migração é guiada em sentido aos estímulos angiogênicos. O broto formado se expande e assume a forma tubular ao passo que uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose dando origem a cadeia circulatória fundamental (SILVA et al., 2007).

Em algumas situações fisiológicas a ocorrência da angiogênese é fundamental, porém a formação de novos vasos pode estar relacionada a diversas patologias como psoríase, artrite, cegueira, asma, aterosclerose, doenças infecciosas e câncer (CARMELIET, 2003).

A angiogênese tumoral (figura 2) atualmente merece bastante destaque, pois, sabe-se que o crescimento de uma massa tumoral está diretamente relacionado com o processo de neovascularização, o qual ocorre a partir da geração de fatores estimuladores da angiogênese secretados pelas próprias células neoplásicas, garantindo dessa forma seu aporte de oxigênio e nutricional (THOMPSON et al., 2002; PANDYA; DHALLA; SANTANI, 2006).

Não menos importante, o processo angiogênico também é responsável pelo aparecimento de metástases tumorais uma vez que a formação de novos vasos permite que as células neoplásicas penetrem nos capilares e se difundam por todo o organismo, originando metástase em qualquer outro tecido do organismo (ZETTER, 1998).

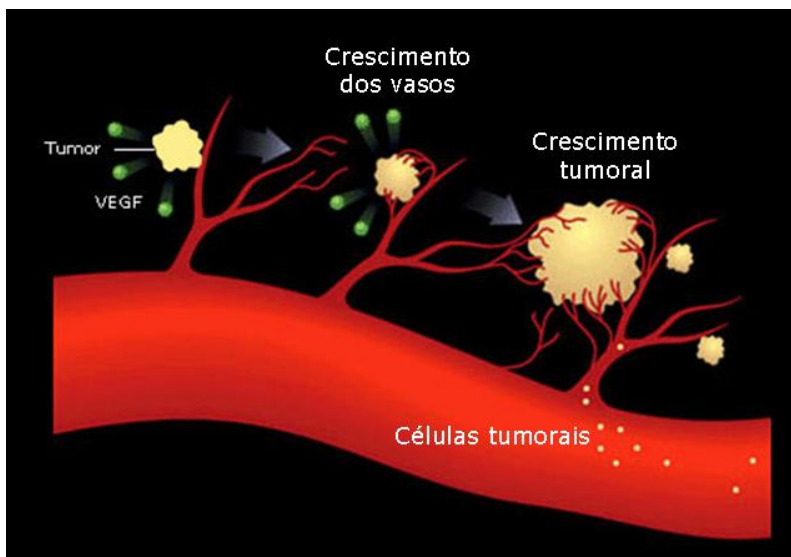


Figura 2. Representação esquemática da angiogênese tumoral iniciada a partir da liberação de fatores de crescimento, como por exemplo, VEGF e o processo de metástase. Adaptado de: Genentech (2010).

No ano de 1971 Judah Folkman apontou a inibição da angiogênese como uma estratégia efetiva no tratamento de tumores humanos. Portanto, estratégias antiangiogênicas e consequentemente antitumorais estão baseadas na inibição da proliferação e migração de células endoteliais (FOLKMAN, 1995).

Atualmente já existem provas de que a combinação entre quimioterapia e agentes antiangiogênicos realmente aumenta a sobrevivência de pacientes com neoplasia em estados avançados e isso fez com que pesquisadores se sentissem otimistas na busca de novos agentes capazes de reduzir a angiogênese relacionada com a etiologia do câncer e a capacidade tumoral de desenvolver metástases (FOLKMAN, 1995; GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000; CARMELIET, 2005).

Masferrer e colaboradores (2000) propuseram o efeito antiangiogênico do medicamento Celecoxib, um inibidor específico da enzima COX-2, expressa em células inflamatórias e em tumores humanos. Em seus estudos este medicamento apresentou atividade máxima inibitória de 80% dos vasos sanguíneos na córnea de ratos (30 mg/kg/dia). Outro relato importante deste estudo foi a detecção de

COX-2 nos vasos sanguíneos dos fígados dos pacientes com câncer de cólon metastático. Desta forma, agentes inibidores desta via poderiam afetar o crescimento tumoral através da inibição da formação de novos vasos responsáveis pela sobrevivência do tumor.

Além do mais, a terapia com esses agentes apresenta algumas vantagens como baixa toxicidade, não causando a perda de cabelo nem os sintomas mais freqüentes como, por exemplo, os gastrointestinais. Outro fator positivo é que não foi observado o desenvolvimento de resistência à droga facilitando a sua utilização como complemento aos tratamentos já estabelecidos como a quimioterapia, radioterapia ou intervenção cirúrgica (FOLKMAN, 1995).

1.6 A FITOTERAPIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER

A terapia através da utilização de plantas é conhecida e praticada desde as antigas civilizações, sendo que o hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais é uma das primeiras manifestações do esforço do homem para compreender e utilizar a natureza (TESKE; TRENTINI, 1997).

Ao longo dos tempos a utilização das plantas foi evoluindo desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas até as formas mais sofisticadas de fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (LORENZI; MATOS, 2002).

Atualmente, apesar dos países desenvolvidos possuírem fácil acesso à medicina moderna, grande parte da população ainda faz uso de plantas medicinais devido a questões culturais e históricas. Já nos países em desenvolvimento cerca de 65-80% da população depende quase que exclusivamente das plantas medicinais na atenção básica à saúde (AGRA et al., 2008).

Isto é suficiente para o reconhecimento do valor das plantas medicinais que têm apresentado um incrível poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (ELVIN-LEWIS, 2001).

Entre todos os fármacos antitumorais disponíveis nos anos de 1940 a 2002, 40% são produtos naturais *per se* ou são seus derivados, sendo que outros 8% são considerados produtos miméticos aos naturais. Muitos desses agentes até hoje continuam sendo usados clinicamente e entre estes podem ser citados compostos derivados da vinca como vincristina e vinblastina, alcalóides isolados de *Camptotheca acuminata*

(Nyssaceae) como camptotecina, taxanos isolados do gênero *Taxus* (Taxaceae), etoposídeo e tenoposídeo, derivados de liganos de espécies do gênero *Podophyllum*, e entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Os alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina, vindesina), isolados da planta *Catharantus roseus* (Apocynaceae), e vários de seus compostos semi-sintéticos (vinorelbina) são utilizados no tratamento de leucemias, linfomas, câncer testicular avançado, mama e pulmão. Estes compostos são capazes inibir o fuso mitótico, induzindo uma parada na metáfase. Nesta fase da mitose esses agentes são capazes de se unir à tubulina resultando na inibição de sua polimerização para a formação dos microtúbulos, interrompendo a divisão celular (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Outro composto, denominado paclitaxel (Taxol®), é um triterpeno poliidroxilado que foi isolado da planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae) pela primeira vez em 1971. Este composto tornou-se um medicamento, na década de 90, que também age através da inibição do fuso mitótico. Ao dimerizar a tubulina os túbulos passam a ficar estabilizados impedindo que ocorra a despolimerização da tubulina, levando ao bloqueio da replicação celular que resulta na perda da viabilidade celular (WANG; WANG; SOONG, 2000; SOUZA, 2004).

Além do paclitaxel, outros dois análogos desta molécula foram semi-sintetizados, o docetaxel e o isotaxel. Enquanto o paclitaxel vem sendo utilizado no tratamento de câncer de mama, ovário, pulmão e sarcoma de Kaposi, o doxetaxel é utilizado especificamente em casos de câncer de mama e pulmão, sendo muito mais solúvel e eficaz que o anterior (CRAGG; NEWMAN, 2005).

O primeiro composto ativo de *Podophyllum peltatum* (Podophylaceae), a podofilotoxina, foi isolado no ano de 1880, porém sua estrutura só foi identificada no ano de 1950. Este lignano bioativo era usado por povos antigos do subcontinente Indiano para o tratamento de câncer de pele e verrugas. Mas, ao ser submetido a avaliações pré-clínicas, este composto demonstrou falta de eficácia e alta toxicidade o que levou à alterações na sua estrutura química permitindo a geração de dois fármacos semi-sintéticos menos tóxicos e mais potentes: etoposídeo e tenoposídeo (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Esses agentes antitumorais agem bloqueando as células nas fases S e G2 do ciclo celular e inibindo a ação da enzima topoisomerase II, responsável pela separação da dupla fita de DNA para o posterior processo de divisão celular. A inibição desta enzima ocorre através da ligação do composto antitumoral ao complexo DNA-topoisomerase II

causando a quebra da dupla-fita de DNA e a subsequente morte celular (MATSUMOTO; KUNISHIO; NAGAO, 1999; SCHONN; HENNESEN; DARTSCH, 2010).

Da casca da árvore *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) foi extraído o alcalóide camptotecina que também apresenta propriedade antitumoral principalmente nos casos de tumores sólidos. O mecanismo de ação deste composto se dá através da inibição da enzima topoisomerase I, envolvida na replicação, transcrição e recombinação do DNA. A inibição desta enzima ocorre porque a camptotecina é capaz de se ligar a um complexo formado pelo DNA e a enzima topoisomerase I. Originalmente este composto apresentou uma mielosupressão inaceitável (WALL; WANI, 1996; BALUNAS; KINGHORN, 2005), em vista disso, outros análogos sintéticos menos tóxicos da camptotecina precisaram ser avaliados, sendo então aprovados para uso clínico o topotecan (Hycamptin[®]) e o irinotecan (Camptosar[®]) (ORMROD; SPENCER, 1999).

1.7 O GÊNERO *Croton*

Apesar de já existirem estudos fitoquímicos e farmacológicos a respeito de muitas plantas medicinais utilizadas pela população brasileira, a maioria delas carece de estudos científicos detalhados, que suportem suas aplicações terapêuticas (YUNES; CALIXTO, 2001).

No ano de 2009, a revista *Pharmacia Brasileira* (Março/Abril) publicou através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, uma lista com 71 espécies vegetais de interesse do SUS (Renusus), cuja finalidade seria orientar estudos e pesquisas que pudessem subsidiar a elaboração de medicamentos fitoterápicos capazes de combater as doenças mais comuns entre os brasileiros.

Entre as 71 plantas medicinais listadas na Renisus, na posição 21 encontra-se o gênero *Croton* spp., cuja maioria das espécies possui um látex de cor avermelhada, conhecido popularmente como Sangue de Dragão (SANDOVAL et al., 2002).

Esta denominação popular é, de modo geral, utilizada para caracterizar diversos tipos de resina vermelha descritos na literatura como, por exemplo, no leste da Índia o Sangue de Dragão é oriundo da fruta de *Daemonorops draco* Willd., já o tipo Scotran ou Zanzibar faz menção ao exudato de *Dracaena Cinnabari* Balf.f. No México esta

denominação diz respeito à resina de *Croton lechleri* Müll., e na Venezuela se refere à resina de *Croton gossypifolium* Vahl (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2008).

Entre tantos gêneros e espécies que recebem a mesma denominação popular, destaca-se o gênero *Croton* que pertence à família Euphorbiaceae, a qual abrange cerca de 1300 espécies (WEBSTER, 1967; WILSON; NEUBERT; HUFFMAN, 1976). No estado do Rio de Janeiro 39 espécies do gênero *Croton* foram identificadas sendo que algumas delas apresentam aplicações terapêuticas como no caso do câncer (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

O emprego deste gênero na medicina popular não se limita ao uso apenas do látex, existem também relatos que apontam a utilização de folhas e da casca. Dessa forma vários estudos demonstram diferentes atividades farmacológicas como: atividade anti-inflamatória e antioxidante de *C. celtidifolius* (NARDI et al., 2003), anti-inflamatória *C. palonostigma* (SANDOVAL et al., 2002), vasorelaxante de *C. celtidifolius* (DALBÓ et al., 2008), antinociceptiva de *C. cajucara* (CAMPOS et al., 2003), hipoglicêmica e hipolipidêmica de *C. cajucara* (SILVA et al., 2001), antimicobacteriana e antimalárica de *C. kongensis* (THONGTAN et al., 2003), antiproliferativa de *C. lechleri* (ROSSI et al., 2003), citotóxica de *C. oblongifolius* (SOMMIT et al., 2003), antitumoral do látex de *C. lechleri* (DESMARCHELIER et al., 1997).

Como constituintes químicos são citados uma enorme diversidade de compostos biologicamente ativos como principalmente diterpenóides (ésteres de forbol, clerodano, labdano, kaurano, traquilobano e pimarano) e alcalóides (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

1.8 *Croton celtidifolius* Baill

A *Croton celtidifolius* (Figura 3) pertencente à família Euphorbiaceae é uma árvore encontrada nos estados do Rio de Janeiro, Goiás e São Paulo, porém, seu predomínio maior se dá na Floresta Atlântica no sul do Brasil, principalmente no estado de Santa Catarina onde é conhecida popularmente como Sangue-de-Adáve, Sangue-de-Drage, Pau-Andrade, Pau-sangue (NARDI et al., 2006; NARDI et al., 2007).

Como características botânicas, esta árvore pode atingir até 6 metros de altura. Suas folhas são alternadas, pubescentes, rombiformes-ovadas, com duas grandes glândulas estipitadas na base, com cerca de

6,5-18 cm de comprimento. Esta planta apresenta a inflorescência em racemo com até 30 cm de comprimento, brácteas lanceoladas com 1-10 flores, as inferiores hermafroditas ou às vezes masculinas. Floresce de novembro a fevereiro, com frutos de janeiro a março. Os frutos são do tipo cápsula (CITADINI-ZANETTE; BOFF, 1992).

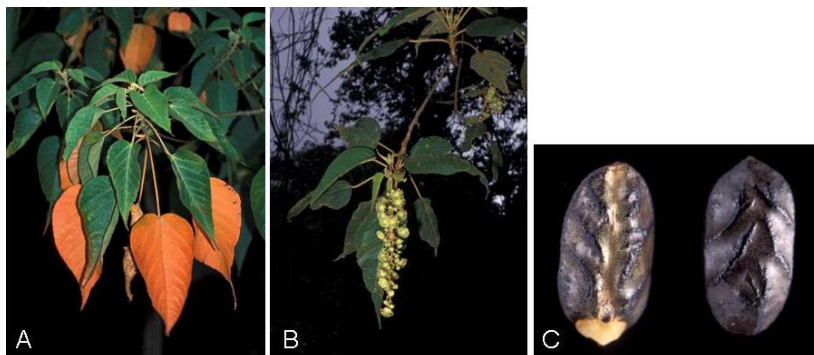


Figura 3. (A) Folhas de *C. celtidifolius*; (B) Inflorescência de *C. celtidifolius*, (C) Fruto de *C. celtidifolius*. Adaptado de: Berry (2010).

Esta espécie há muito tempo vem desempenhando um papel importante na medicina popular merecendo então que suas propriedades sejam reconhecidas pelo SUS como citado anteriormente (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Entre as utilizações populares da *C. celtidifolius* incluem-se o tratamento de câncer (leucemias), úlceras, reumatismo, constipação intestinal, diabetes, hipercolesterolemia, dor, febre, diarreia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, obesidade, feridas externas (DALBÓ et al., 2005; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Ainda existem poucos estudos que relatam as atividades biológicas desta planta. Nardi e colaboradores (2006) demonstraram efeito analgésico de vários extratos, frações e sub-frações obtidas a partir casca de *C. celtidifolius*. Ainda neste ano, também foi relatado o efeito antinociceptivo da fração rica em proantocianidinas (DALBÓ et al., 2005; 2006).

Posteriormente Nardi e colaboradores (2007) comprovaram as propriedades antioxidante e anti-inflamatória de frações e sub-frações, ambas ricas em proantocianidinas, um composto capaz de aumentar a atividade endógena da enzima superóxido dismutase (SOD), reduzindo

dessa forma tanto os parâmetros oxidativos como a migração celular, principalmente, de leucócitos polimorfonucleares.

Provavelmente os efeitos observados devem ser devido à ação direta do composto proantocianidina na capacidade scavenging de moléculas antioxidantes e na potencialização da ação antioxidante da enzima SOD (NARDI et al., 2007).

Apesar de pouco se saber a respeito da constituição química desta planta, alguns estudos demonstraram a presença de ciclitóis (1L-1-o-metil-mio-inositol, neoinositol e sitosterol) (MUKHERJEE; AXT, 1984), catequinas, galocatequinas e proantocianidinas em frações obtidas a partir do extrato bruto da casca (NARDI et al., 2003) e ainda alcalóides e saponinas também obtidos a partir da casca (AMARAL; BARNES, 1997).

Tendo em vista os tópicos acima discutidos, as plantas são consideradas fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos em processos tumorais, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. *C. celtidifolius* é uma dessas espécies, pois possui história de uso popular devido ao seu possível efeito antitumoral.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Levando em consideração todos os argumentos citados acima, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, nucleásico e antitumoral do látex de *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae), assim como analisar o efeito do látex sobre a angiogênese e mecanismos de proliferação e morte celular (apoptose) utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da composição química do látex de *C. celtidifolius* através de análises espectrofotométricas e cromatográficas;
- Avaliação da capacidade citotóxica do látex de *C. celtidifolius* sobre as linhagens celulares tumorais de Ehrlich e MCF-7 através do ensaio de citotoxicidade mitocondrial do MTT;
- Avaliação da atividade nucleásica do látex de *C. celtidifolius* através do ensaio de dano ao DNA plasmidial;
- Avaliação da atividade pró-apoptótica *in vitro* do látex de *C. celtidifolius* sobre as células do carcinoma de Ehrlich através da coloração diferencial por Brometo de etídio / Laranja de acridina;
- Avaliação da atividade antitumoral do látex de *C. celtidifolius* em camundongos isogênicos Balb/C inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) através da medida de viabilidade celular (corante azul de tripan), avaliação de parâmetros morfofisiológicos (peso, circunferência abdominal, volume de líquido ascítico, volume de células compactadas e sobrevida) no TAE;
- Avaliação da atividade antiangiogênica do látex de *C. celtidifolius* através do ensaio de CAM realizado em ovos fertilizados de *Gallus domesticus*, assim como a avaliação da morfogênese dos embriões submetidos ao tratamento.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DO MATERIAL

O látex de *C. celtidifolius* foi coletado no município de Lauro Müller pelos responsáveis da Pastoral da Saúde da região. Para realizar a coleta deste material foram feitos cortes na casca da árvore de forma a permitir que este escorresse e pudesse ser coletado em recipiente apropriado.

Juntamente com a coleta do látex foram recolhidas amostras de folhas e flores para a posterior identificação botânica da planta que foi realizada pela professora Dr.^a Vanilde Citadine Zanette. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade do Extremo Sul Catarinense em Criciúma (Brasil) (CRI 4309).

3.2 PREPARO DO LÁTEX DE *Croton celtidifolius*

Após a realização de alguns tratamentos, nos ensaios *in vivo*, com o látex de *C. celtidifolius* foi possível perceber uma reação bastante tóxica nos camundongos caracterizada pela ereção dos pêlos, prostração e ainda formação de uma massa branca na cavidade peritoneal dos animais observada após a sua morte. Levando em consideração estes efeitos, foram encontradas, na literatura, diversas formas de processamento de materiais constituídos por látex a fim de melhorar este material e reduzir os efeitos anteriormente relatados.

A metodologia mais interessante para o látex em questão foi adaptada ao material deste estudo e, à amostra do látex fresco foi adicionado tampão fosfato 10mM (pH 7,0) (1:1). A mistura foi mantida em repouso por um período de 12 horas, em geladeira (2-8°C), sendo posteriormente centrifugada a 5000g por 10 minutos a 25°C para a eliminação do pellet. O sobrenadante foi liofilizado para a posterior utilização nos experimentos subseqüentes (OLIVEIRA et al., 2007).

3.3 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX

Os ensaios referentes à composição química do látex foram realizados na Fondazione Edmund Mach, no Istituto Agrario San Michele all' Adige (IASMA), na Itália.

3.3.1 Análises espectrofotométricas

Os fenóis totais foram medidos diretamente usando o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) e as concentrações foram determinadas utilizando curva de calibração com ácido gálico, g/L de látex. As análises espectrofotométricas foram realizadas em triplicata.

3.3.2 Análises cromatográficas

As análises foram realizadas no sistema CLAE Waters 2960 (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com DAD Waters 996 e Micromassa ZQ com analisador quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray - espectrometria de massa (ESI-MS). As amostras foram filtradas através de um filtro de 0,22 μm do tipo seringa (Millipore, Bedford, MA) antes da injeção no sistema CLAE.

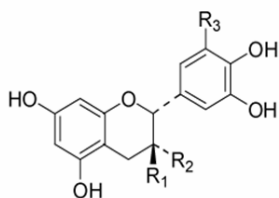
3.3.2.1 Conteúdo de flavan-3-óis

A separação e quantificação dos compostos foram realizadas conforme Gris e colaboradores (2010). A separação foi feita utilizando coluna Atlantis C18 (5,0 μm , 4,6 x 250 mm; Manchester, UK) protegida pela coluna de guarda do mesmo material. O fluxo utilizado foi 0,9 mL min^{-1} , o volume de injeção foi de 10 μL . A fase móvel consistiu de uma solução de ácido acético 2,5 % em água (A) e de metanol (B). A separação foi realizada à 40°C em 47 minutos, sob as seguintes condições: gradiente linear começando com 5 % do solvente B, atingindo 6 % do solvente B em 5 min., 18 % do solvente B em 25 min., 30 % do solvente B em 1 minuto e finalmente 100 % do solvente B em 16 minutos. A coluna foi então lavada com 100 % de B por 1 minuto e reequilibrada por 7 minutos.

A detecção foi realizada a 280 nm. O detector de espectrometria de massa foi operado a uma voltagem de capilaridade de 3000 V, tensão do extrator de 6 V, temperatura da fonte de 150°C, temperatura do gás de dessolvatação de 500°C, fluxo de gás para a dessolvatação do cone (N_2) de 50 L h^{-1} e um fluxo de gás de dessolvatação para a amostra de (N_2) 1200 L h^{-1} . ESI-MS variou de m/z 100-1500 com um tempo de permanência de 0,1 s.

A quantificação de flavan-3-óis livres (Figura 4) foi realizada por espectrometria de massa com base no tempo de retenção de seu íon molecular e fragmento principal dado pela espectrometria de massa através de comparação com os respectivos padrões externos. Os íons moleculares ($M-H$)⁻ utilizados que foram m/z 289,3 para catequina e epicatequina, m/z 305,3 para galocatequina e epigalocatequina. A voltagem dos cones para todos os íons foi 30 V.

FLAVAN-3-ÓIS



$R_1 = OH$;	$R_2 = H$;	$R_3 = H$:	Catequina
$R_1 = H$;	$R_2 = OH$;	$R_3 = H$:	Epicatequina
$R_1 = OH$;	$R_2 = H$;	$R_3 = OH$:	Galocatequina
$R_1 = H$;	$R_2 = OH$;	$R_3 = OH$:	Epigalocatequina

Figura 4. Estrutura dos principais compostos flavonóides (flavan-3-óis) encontrados no látex de *C. celtidifolius*.

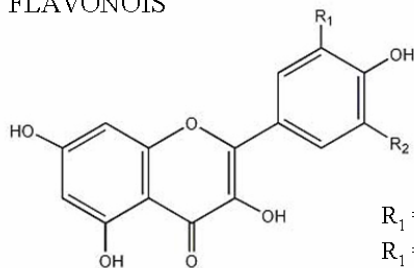
3.3.2.2 Conteúdo de flavonóis

A separação dos flavonóis (miricetina, quercetina e campferol) (Figura 5) foi realizada de acordo com Mattivi e colaboradores (2006) usando coluna de fase reversa Purospher RP18 250 mm x 4 mm, munida de uma pré-coluna (Merck, Alemanha). Os solventes utilizados foram os seguintes: A, $HClO_4$ 0,3% em água, e B, metanol. O gradiente linear da seguinte forma: de 40 a 90% de B em 30 min. A coluna foi equilibrada

durante 5 minutos antes de cada análise. A vazão foi de 0,45 mL/min, o volume de injeção 5µL.

A quantificação foi realizada por espectrometria de massa com o método de padrão externo usando íons moleculares (M-H), que foram m/z 319,2 para miricetina, m/z 303,2 para quercetina e m/z 287,2 para campferol. A tensão ótima para todos os íons foi 30 V. O detector de espectrometria de massa opera a uma voltagem capilar de 3000 V, voltagem do extrator de 5 V, temperatura da fonte de 105°C, temperatura de dessolvatação de 200°C, fluxo de gás (N_1) de 50 L.h⁻¹ e fluco de gás de solvatação (N_2) de 450 50 L.h⁻¹. A faixa de espectro ESI-MS de m/z 200 a 700 foram tiradas de modo positivo com um tempo de espera de 0,1 segundos. O coeficiente de variação obtido experimentalmente com 6 análises do mesmo material foi: miricetina 2,76%; quercetina 3,06% e campferol 3,71% e os resultados foram expressos em mg/L de látex.

FLAVONÓIS



$R_1 = H; R_2 = H$: Campferol

$R_1 = OH; R_2 = H$: Quercetina

$R_1 = OH; R_2 = OH$: Miricetina

Figura 5. Estrutura dos principais compostos flavonóides (flavonóis) encontrados no látex de *C. celtidifolius*.

3.4 CULTURA DE CÉLULAS

No presente estudo foram utilizadas células do carcinoma de Ehrlich isoladas de camundongos Balb/C que portavam o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e cultivadas em meio RPMI suplementado com soro bovino 10%, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL). Também foram utilizadas células de tumor de mama (MCF-7),

adquirida no Banco de células da UFRJ que passaram pelo mesmo processo de cultivo recebendo apenas meio de cultura diferente (DMEM). Ambas as linhagens foram mantidas até a densidade celular de $1-2 \times 10^6$ células/mL de meio de cultura à temperatura de 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ e 95% de umidade (KVIECINSKI et al., 2008).

3.5 COMITÊ DE ÉTICA

Antes de dar início à execução dos protocolos experimentais *in vivo*, os projetos referentes aos ensaios com camundongos Balb/C e com ovos de *Gallus domesticus* foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), os quais foram aprovados sob os números 23080.025627/2009-72 e 23080.003462/2010-11, respectivamente.

3.5.1 Animais

Para a realização dos ensaios referentes à avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g de peso), com idade aproximada de 60 dias. Estes animais foram obtidos a partir da reprodução controlada realizada no biotério do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) e mantidos conforme orientações reconhecidas internacionalmente destinadas ao manejo de animais para pesquisa.

Dessa forma, os animais utilizados neste experimento foram divididos em grupos ($n = 12$) conforme seu peso e mantidos sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $\sim 60\%$ umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum*.

3.5.2 Ovos fertilizados

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

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

3.6.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

O MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil) é um sal de coloração amarelo-ouro que atua como indicador da função mitocondrial de uma célula. Ao ser reduzido a formazan pelo metabolismo mitocondrial, este sal é capaz de gerar um composto de cor púrpura, indicando assim a viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

Para avaliar a citotoxicidade do látex de *C. celtidifolius* sobre ambas as linhagens celulares, estas foram colocadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 5×10^6 células/mL e incubadas conforme as condições ambientais descritas acima. 24 horas após a incubação das células, o meio foi removido e substituído por outro contendo o látex a ser analisado nas concentrações que abrangem a faixa de 31,25 – 500 µg/mL (KVICINSKI et al., 2008).

Decorridas 48 horas após o tratamento das células, o meio de cultura contendo o látex foi retirado, e o MTT (1 mg/mL) foi adicionado procedendo-se a uma nova incubação que teve duração de 4 horas. Após esse período, o MTT excedente foi removido e 100 µL de DMSO (PA) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, a absorbância das amostras foram lidas a 540nm em um leitor de placas (MOSMANN, 1983). Neste experimento, para ambas as linhagens celulares, foi utilizado como branco DMSO puro e, como controle negativo meio de cultura.

Cada uma das concentrações foi testada em oito replicatas, em três experimentos individuais que ocorreram em três dias diferentes. Os valores obtidos foram expressos em percentual de células viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

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

Os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) foram calculados por regressão linear e expressos em Média \pm Desvio Padrão. Considerou-se o valor do controle negativo como 100% de viabilidade celular sem a presença do látex testado.

3.6.2 Avaliação da atividade nucleásica

3.6.2.1 Dano ao DNA plasmidial

O DNA plasmidial é flexível o suficiente para adotar diversas formas. Além da sua forma normal superenovelada (FI), é possível que ele se transforme na forma circular aberta (FII) e na forma linear (FIII). Isso é decorrente de quebras que podem ocorrer na dupla hélice, sendo assim, se a quebra for simples a forma normal superenovelada transforma-se em forma circular aberta já, se a quebra for dupla a forma original transforma-se em forma linear (Figura 6) (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

Para que fosse possível a avaliação da atividade nucleásica do látex, este trabalho foi desenvolvido com a colaboração do professor Claus Troger Pich, em seu laboratório, na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Sendo assim, neste ensaio foi realizada uma incubação em microtubos, durante 16 horas, a 50°C, de 5 µL de uma solução de DNA plasmidial (600 ng), 5 µL de tampão HEPES (pH 7,4) e 10 µL do látex em concentrações que abrangem a faixa de 0,78 a 25,00 µg/mL.

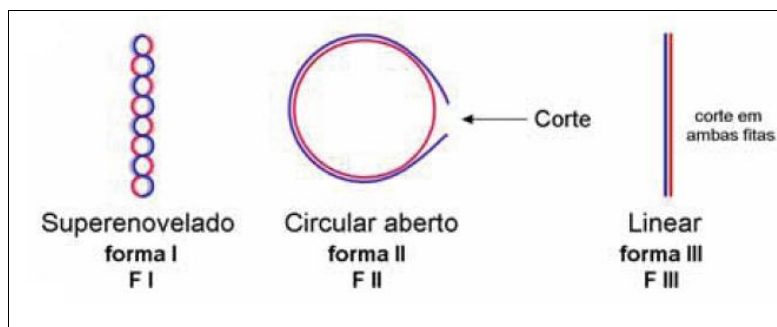


Figura 6. Três conformações que o DNA plasmidial pode apresentar. Ao sofrer quebra simples FI é transformado em FII; ao sofrer quebra dupla FI é transformado em FIII. Fonte: Adaptado de Berg; Tymoczko; Stryer (2004).

Cada uma dessas três formas que o DNA plasmidial pode adotar (FI, FII e FIII) possui velocidade eletroforética diferente o que pode ser

apresentado através de bandas distintas em géis de eletroforese como demonstrado na figura 7 (SREDDHARA; COWAN, 2001). Então, após o tempo de incubação, mencionado anteriormente, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose 0,8% seguida da revelação do gel com brometo de etídio. Dessa forma foi possível visualizar as bandas que representam o perfil de quebra do DNA plasmidial (forma normal superenovelada, forma circular aberta e forma linear, FI, FII e FIII respectivamente) induzido pelo látex.

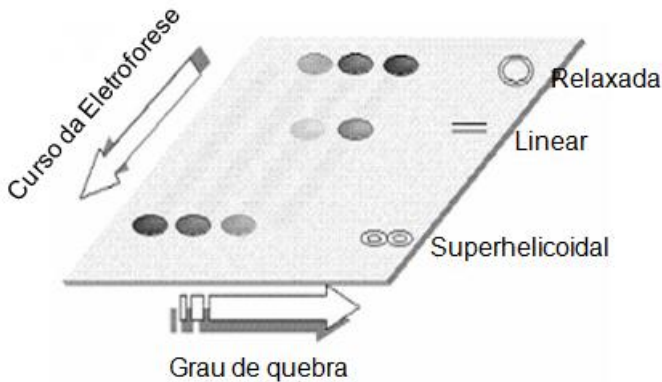


Figura 7. Imagem representativa de um gel de agarose 0,8% obtido a partir da eletroforese do DNA plasmidial após sua incubação com várias concentrações de compostos. Fonte: (MANCIN et al., 2005).

A utilização do programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.) permitiu a quantificação das bandas e a conseqüente determinação das quantidades das três formas adotadas pelo DNA plasmidial após sua corrida eletroforética (SCARPELLINI et al., 2003). A intensidade de DNA superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47 como um resultado de sua menor capacidade de corar com brometo de etídio (SREDDHARA; COWAN, 2001). Como controle negativo foi utilizado solução salina, o veículo de diluição do látex.

3.6.3 Avaliação da indução da apoptose

3.6.3.1 Coloração pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

A coloração diferencial pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite a diferenciação entre células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995).

Células do carcinoma de Ehrlich na densidade de 5×10^6 células/mL foram incubadas por um período de 24 horas, em estufa à 37°C com 95% de umidade e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂. Decorrido esse tempo, o meio foi removido e substituído por outro contendo o látex a ser avaliado. A concentração de látex utilizada (169 µg/mL) foi estimada a partir do CI₅₀ encontrada no MTT para a mesma linhagem celular. A suspensão de células foi transferida para um tubo do tipo eppendorf e centrifugada durante 10 minutos a rotação de 1000 rpm. O sobrenadante foi então descartado e as células ressuspensas em 25 µL de PBS. Em seguida, 10 µL da solução corante (1:1) de BE (100 µg/mL)/LA (100 µg/mL) foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferidas para uma lâmina sendo coberta então com uma lamínula e em seguida, levadas para o microscópio de fluorescência para observação dos efeitos celulares em aumento de 40x. A solução salina utilizada para a diluição do látex, foi utilizada como controle negativo (GENG; ZENG; WANG, 2003).

Para quantificar o percentual de cada um dos eventos celulares (células viáveis, necróticas, apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra, as quais foram montadas em lâminas e posteriormente fotografadas para o registro visual de possíveis alterações.

3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo*

3.7.1 Avaliação da atividade antitumoral

Para a execução deste modelo experimental foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C distribuídos em 4 (quatro) grupos experimentais diferentes (n = 12) agrupados conforme seu peso (20 ± 2 gramas).

- Grupo: 1) controle normal (solução salina);
2) controle negativo (TAE + solução salina);

- 3) controle positivo (TAE + Doxorubicina);
- 4) grupo tratado com látex (TAE + látex).

Todos os camundongos, exceto aqueles do grupo controle normal, foram inoculados em sua cavidade peritoneal, em condições assépticas, com uma suspensão de células tumorais na densidade de 5×10^6 células/mL. O dia no qual foi realizado a inoculação do tumor foi considerado como tempo zero (0). Sendo assim, o tratamento dos animais dos grupos 3 e 4 via intraperitoneal (i.p.), foi iniciado 24 horas após a inoculação das células tumorais através da administração de doxorubicina (1,2 mg/kg) ou do látex de *C. celtidifolius* (La1) 0,78; (La2) 1,56 e (La3) 3,12 mg/kg respectivamente, durante 9 dias consecutivos. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam 50 µL de uma solução salina diariamente durante o mesmo período de tratamento.

No décimo dia, seis animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, então, o líquido ascítico foi coletado para a realização das análises. Os outros seis animais restantes de cada grupo foram mantidos vivos para a avaliação da sobrevida (KVICINSKI et al., 2008).

3.7.1.1 Avaliações cronomorfológicas

3.7.1.1.1 Média de sobrevida

Para determinar a sobrevida foram utilizados 6 (seis) camundongos para cada grupo. Todos os animais inoculados com o TAE e tratados ou não com o látex de *C. celtidifolius* ou doxorubicina foram observados diariamente, por um período de 30 dias.

Com base nesse monitoramento, foi possível realizar o registro diário da mortalidade e posteriormente calcular o tempo média de sobrevida (TMS) e o percentual de aumento de longevidade (PAL), de acordo com as seguintes abaixo:

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

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

(QURESHI, 2001).

3.7.1.1.2 Variação de peso dos animais

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

3.7.1.1.3 Inibição do crescimento do tumor

Para determinar a inibição do crescimento tumoral foi avaliada a variação da circunferência abdominal dos camundongos sendo calculada a diferença entre a medida final (após os 9 dias de tratamento) e a medida inicial (medida que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor, dia 0) da circunferência abdominal dos animais. Os resultados foram obtidos conforme fórmula apresentada a seguir e expressos em percentual de inibição do crescimento do tumor (%) (REBELLO, 2004).

$$\text{Inibição do crescimento do tumor (\%)} = \frac{[(\text{Circ. Abd.}_{(\text{TRAT})} \times 100) / \text{Circ. Abd.}_{(\text{CN})}] - 100}{}$$

3.7.1.2 Avaliações histocitológicas

3.7.1.2.1 Viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de tripan

O azul de tripan é um corante capaz de penetrar nas células mortas cujas membranas não conseguem mais excluí-lo. Este fenômeno permite estimar indiretamente o grau de integridade celular, dessa forma, o percentual de células que não se coram representam o índice de viabilidade celular (FRESHNEY, 1999).

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

3.7.1.2.2 Volume total de líquido ascítico e volume de células compactadas

O volume de líquido ascítico total foi mensurado utilizando tubos falcon graduados (15 mL). O volume de células compactadas foi determinado após a centrifugação (3000 rpm, 5 minutos) dos respectivos tubos falcon preenchidos com todo líquido retirado dos animais (REBELLO, 2004).

3.7.2 Ensaio da membrana corioalantóica (CAM)

A análise da atividade antiangiogênica do látex de *C. celtidifolius* foi realizada através do ensaio de CAM de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994). Cabe ressaltar que entre todos os ensaios utilizados para avaliação de vasos sanguíneos, este é o ensaio mais amplamente empregado.

Para a realização dos ensaios foram utilizados ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* (figura 8) que foram incubados em uma incubadora automática digital Chocmaster[®], na posição horizontal, à temperatura de 37°C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 horas (2 dias) de incubação, uma janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, no lado onde se encontra a câmara de ar do ovo, sendo retiradas cerca de 5 mL de clara objetivando evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Em seguida, outra janela com cerca de 15 mm de diâmetro foi aberta também na casca do ovo, na região posicionada acima do local onde se encontra a membrana corioalantóica dos embriões. Todas as duas janelas foram fechadas com auxílio de fita gomada e fita isolante de cor preta a fim de minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram por um período de 72 hs, sob incubação, até a idade embrionária de 6 dias quando um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com o látex a ser testado (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco), foi implantado sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. A janela foi novamente fechado com a fita isolante preta. A incubação prosseguiu por mais 48 horas até que o embrião atingisse a idade de 8 dias para que pudesse ser realizada a análise da atividade antiangiogênica.

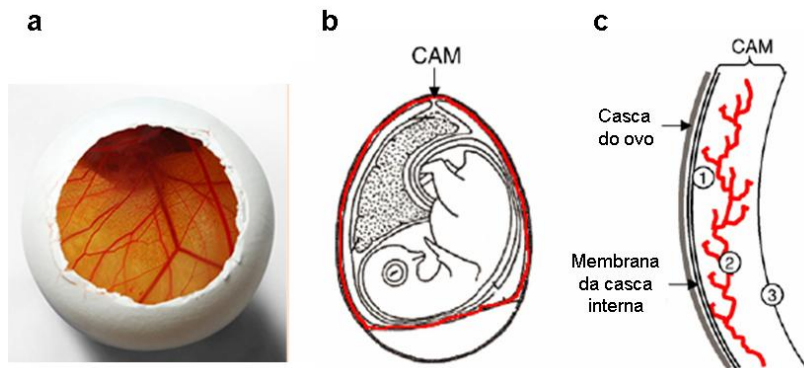


Figura 8. a) Ovos de *Gallus domesticus* fertilizados utilizados para a realização do ensaio de CAM; b) Localização da membrana corioalantóica (em vermelho) ao redor do embrião; c) Organização da membrana corioalantóica onde: 1 – epitélio coriônico; 2 – mesoderma contendo vasos corados em vermelho; 3 – epitélio alantóico. Adaptado de: Vargas e colaboradores (2007).

A fita isolante foi retirada e os dados observados em relação ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados. Uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com aumento de 20x capturou as imagens que foram enviadas para um computador, onde cada imagem foi utilizada para realizar a contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de $0,9 \text{ cm}^2$. Os resultados foram expressos como Percentual de vasos \pm Desvio-padrão.

Em seguida os embriões foram retirados dos ovos para a realização da morfometria sendo posteriormente fixados em formol a 10%. O comprimento embrionário foi expresso em milímetros (mm) e realizado através de medidas de comprimento corporal nos segmentos definidos como flexuras cefálico-cervical (CCV) e cervical-caudal (CVC) como apresentado na figura 9. Os eixos de comprimento foram relacionados por meio da razão CCV/CVC e CCV/CCV+CVC (mm).

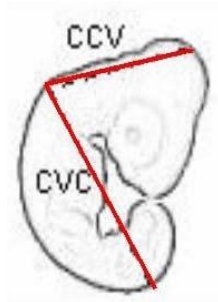


Figura 9. Medidas cefálico-cervical (CCV) e cervical-caudal (CVC) realizados nos embriões da espécie *Gallus domesticus*. Fonte: (DIAS et al., 2005).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LÁTEX

Os resultados obtidos no estudo da composição química do látex são apresentados na tabela 1. Nesta é possível perceber um alto conteúdo de compostos fenólicos. Em geral, o flavonol e flavan-3-ol presentes em maior quantidade no látex foram a miricetina e a epigalocatequina, respectivamente. Após o processamento do material o flavan-3-ol galocatequina não foi encontrado na amostra analisada.

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais (g/L), flavonóis (mg/L) e flavan-3-óis (mg/L) encontrados no estudo químico do látex de *C. celtidifolius*.

		LB	LU
Fenóis Totais (g/L)		18,54	18,29
Flavonóis	Miricetina (mg/L)	45,67	20,92
	Quercetina (mg/L)	18,01	9,31
	Campferol (mg/L)	1,26	0,54
Flavan-3-óis	Catequina (mg/L)	7,21	7,67
	Epicatequina (mg/L)	114,12	50,45
	Galocatequina (mg/L)	11,78	-
	Epigalocatequina (mg/L)	1527,41	1476,82

Nota: LB significa látex bruto e LP significa látex utilizado nos ensaios após passar pelo processamento explicado anteriormente.

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

4.2.1 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

A toxicidade provocada pelo látex de *C. celtidifolius* sobre as linhagens tumorais de Ehrlich e MCF-7 foi determinada *in vitro*, através do ensaio do MTT. Dessa forma, é possível afirmar que o tratamento com o látex (31,25 – 500 µg/mL) apresentou citotoxicidade sobre ambas

as linhagens celulares como se pode observar na figura 10. A maior concentração testada (500 $\mu\text{g/mL}$) causou 23% de viabilidade celular para Ehrlich e 16 % de viabilidade celular para MCF-7.

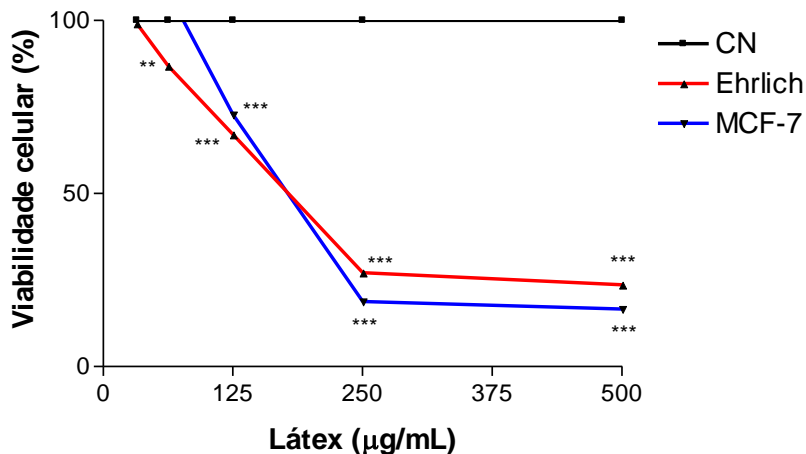


Figura 10. Efeito dose dependente do látex (31,25 - 500 $\mu\text{g/mL}$) de *C. celtidifolius* sobre a viabilidade celular nas linhagens Ehrlich e MCF-7 após 48 horas de tratamento. Os resultados foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão. (** e ***) representam diferença estatística significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) respectivamente, em relação ao controle negativo (meio de cultura); ($n = 3$).

A partir dos resultados mostrados anteriormente foram calculados, por regressão linear, os valores de CI_{50} (concentração inibitória 50%) que estão expostos na tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Valores de $CI_{50} \pm$ Desvio Padrão obtidos a partir do efeito citotóxico do látex de *C. celtidifolius* (32,5 – 500 $\mu\text{g/mL}$) sobre as linhagens tumorais Ehrlich e MCF-7 *in vitro*.

Linhagem tumoral	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ehrlich	$169 \pm 1,8$
MCF-7	$187 \pm 2,2$

4.2.2 Avaliação da atividade nucleásica

4.2.2.1 Dano ao DNA plasmidial

O DNA plasmidial, utilizado como substrato neste ensaio, é uma molécula de DNA superenovelado (FI) que ao ser exposto a qualquer composto pode adquirir outras formas como a circular aberta (FII) ou ainda a linear (FIII). Sendo assim, de acordo com a natureza de cada composto testado é possível mensurar a sua habilidade em provocar a clivagem deste DNA, indicando dessa forma um possível mecanismo de ação antitumoral (REY et al., 2009).

Então, como mostrado na figura 11 é possível verificar que o látex de *C. celtidifolius* apresenta atividade direta sobre o DNA plasmidial em todas as concentrações testadas (0,78 – 25,00 µg/mL).

As concentrações 0,78; 1,56 e 3,12 µg/mL foram capazes de reduzir significativamente (39,73; 28,04 e 15,99%, respectivamente) a quantidade de DNA plasmidial que se encontra na forma FI ao mesmo tempo em que aumentaram também de forma significativa (60,27; 71,96 e 84,01%, respectivamente) a quantidade de DNA plasmidial na forma FII, quando comparadas ao controle negativo utilizado (FI: 85,34%; FII: 14,66%).

A partir da concentração de 6,25 - 25,00 µg/mL ambas as formas FI e FII desapareceram estando presente somente a forma linear (FIII) que representa a quebra dupla do DNA plasmidial. Todas estas 3 concentrações apresentaram 100% de FIII, sendo considerado um resultado significativo em relação ao controle negativo (FIII: 0%).

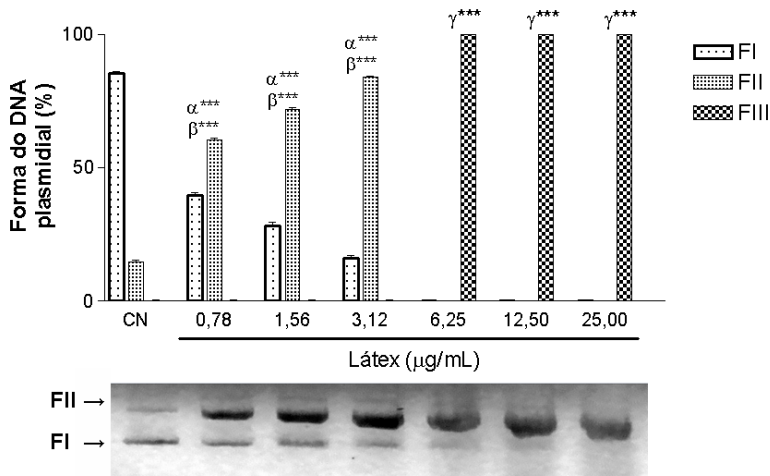


Figura 11. Mudanças na conformação do DNA plasmidial provocadas pelo efeito dose dependente do látex (0,78 - 25,00 µg/mL) de *C. celtidifolius*. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão do percentual da forma adotada pelo DNA plasmidial. (α***, β*** e γ***) representam diferença significativa ($p < 0,001$) das formas FI, FII e FIII, respectivamente, em relação ao CN (controle negativo: salina), ($n = 3$).

As bandas presentes em gel de agarose logo abaixo do gráfico, juntamente com a figura 11, confirmam os valores citados anteriormente, ressaltando-se que o perfil de quebra a partir de 6,25 µg/mL foi tão intenso que as mesmas apresentaram-se borradas em todos os experimentos realizados.

4.2.3 Avaliação da indução da apoptose

4.2.3.1 Coloração pelo Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Os ensaios *in vitro* acima citados são essenciais para a determinação da atividade antitumoral do látex de *C. celtidifolius*, entretanto, a realização somente destes testes não é capaz de elucidar supostos mecanismos de ação que podem estar envolvidos no efeito antitumoral desta planta. Desta forma através da coloração diferencial pelo BE/LA e posterior análise por microscopia de fluorescência é

possível identificar o padrão de morte celular induzido pelo látex de *C. celtidifolius*.

Os resultados obtidos a partir do tratamento das células do carcinoma de Ehrlich com o látex (169 $\mu\text{g/mL}$) apresentados na figura 12 mostram $60 \pm 2,64\%$ de células viáveis e $41 \pm 2,0\%$ de células apoptóticas. Ambos os resultados obtidos são significativamente diferentes em relação ao controle positivo (viáveis: $5 \pm 2,0\%$ e apoptóticas: $95 \pm 3,0\%$) e ao controle negativo (viáveis: $88 \pm 2,0\%$ e apoptóticas: $11,3 \pm 1,5\%$).

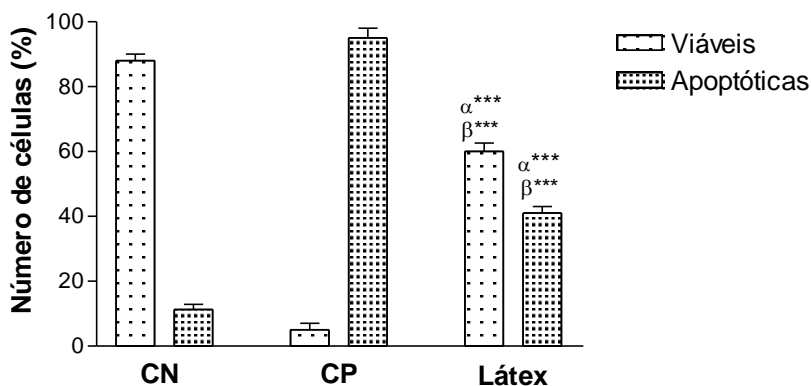


Figura 12. Tipo de morte celular induzida pelo tratamento de células do carcinoma de Ehrlich com o látex (169 $\mu\text{g/mL}$) de *C. celtidifolius* por um período de 48 horas. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão das porcentagens de células viáveis e apoptóticas. (α^{***} e β^{***}) representam diferença estatística significativa ($p < 0,001$) de células viáveis e apoptóticas em relação ao CN (controle negativo: meio de cultura) e CP (controle positivo: doxorrubicina), respectivamente, ($n = 3$).

Além da quantificação das células viáveis e apoptóticas a figura 13 apresenta os dados obtidos em imagem fotográfica da microscopia de fluorescência após 48 horas de tratamento com o látex. A figura 13a mostra o controle negativo onde ocorre o predomínio de células viáveis, coradas em verde. A figura 13b representa o controle positivo, tratado com doxorrubicina, onde ocorre o predomínio de células apoptóticas, coradas em alaranjado. E, a figura 13c apresenta o tratamento com o látex de *C. celtidifolius* onde se observa uma quantidade de células

apoptóticas bastante significativa em relação aos dois controles utilizados.

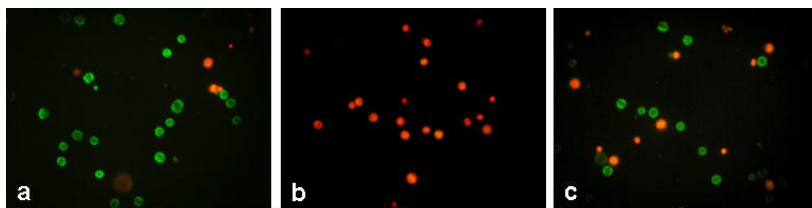


Figura 13. Tipo de morte celular observada através da coloração diferencial BE/LA no carcinoma ascítico de Ehrlich após 48 horas de tratamento com *C. celtidifolius*. (a, b e c) representam controle negativo (meio de cultura), controle positivo (doxorubicina) e tratamento com o látex (169 µg/mL), respectivamente. Obs: aumento 40x.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo*

4.3.1 Avaliação da atividade antitumoral

Os animais que foram inoculados intraperitonealmente com o tumor de Ehrlich foram tratados com o látex de *C. celtidifolius*, controle negativo (solução salina) e controle positivo (doxorubicina) por um período de 9 (nove) dias. Decorrido este prazo foram realizadas as avaliações cronomorfológicas e histocitológicas cujos resultados estão relatados na tabela 3.

Em relação ao peso corporal e ao volume tumoral é possível observar que concentração La1 do látex testada não apresentou diferença significativa em relação ao peso corporal, mas foi capaz de reduzir significativamente o volume tumoral já La2 e La3 apresentaram redução significativa em ambos os parâmetros em relação ao controle negativo, com destaque ao volume tumoral onde La2: $8,03 \pm 1,97$ e La3: $2,8 \pm 1,70$ mL; CN: $12,73 \pm 1,33$ mL. O volume de células compactadas apresentou significância apenas em La3 da mesma forma que o número de células / volume de tumor foi menor em relação ao controle negativo somente nesta concentração.

Tabela 3. Efeito do látex La1 (0,78 mg/kg); La2 (1,56 mg/kg) e La3 (3,12 mg/kg) de *C. celitidifolius* em camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich sobre os parâmetros morfológicos dos animais.

Parâmetro	C. Normal	C. Negativo	C. Positivo	Látex (mg/kg)		
				La1	La2	La3
Peso corporal (g)	3,3 ± 0,9***	12,18 ± 1,7	2,2 ± 0,8***	10,56 ± 2,12	8,10 ± 1,96**	7,57 ± 2,04**
Vol. Tumoral (mL)	-	12,73 ± 1,33	-	9,45 ± 0,94**	8,03 ± 1,97***	2,8 ± 1,70***
Vol. de células compactadas (mL)	-	2,21 ± 0,49	-	2,27 ± 0,5	2,25 ± 0,69	0,43 ± 0,45***
Número de células / vol. de tumor	-	0,19	-	0,24	0,28	0,12
Células inviáveis / células viáveis	-	0,01	-	0,029	0,013	0,038
TMS (dias)	30	13	30	15,5	16	17,5
PAL (%)	100	0	100	19,23	23,08	34,61

Nota: Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão, n = 6. (***) e **) representam diferença estatística ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) nos grupos tratados com o látex em relação ao controle negativo tratado somente com solução salina. C. Positivo: grupo controle positivo tratado com doxorubicina (1,2 mg/kg); TMS: tempo médio de sobrevida e PAL: percentual de aumento de longevidade.

Todas as concentrações do látex aumentaram a proporção de células inviáveis / células viáveis em relação ao controle negativo, porém a dose capaz de promover a morte de um maior número de células tumorais foi a La3. O TMS e o PAL foram bastante significativos para os animais tratados com o látex, indicando um efeito dose-dependente. O TMS encontrado mostra que o látex foi capaz de prolongar a sobrevivência dos animais inoculados com o tumor uma vez que este tratamento foi capaz de reduzir o volume tumoral e a quantidade de células apresentadas por aqueles animais que não receberam nenhum tratamento.

Outro parâmetro capaz de indicar quão eficaz foi o tratamento com o látex de *C. celtidifolius* é a inibição do crescimento do tumor através da redução da circunferência abdominal, uma vez que a medida da circunferência abdominal está diretamente relacionada ao volume de tumor existente. Os dados referentes a estes resultados estão apresentados na figura 14.

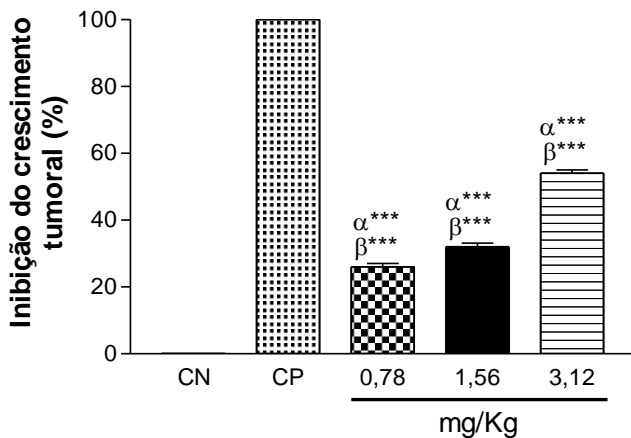


Figura 14. Efeito do tratamento com o látex (0,78; 1,56 e 3,12 mg/kg) de *C. celtidifolius* sobre a inibição do crescimento tumoral nos animais inoculados com o carcinoma ascítico de Ehrlich. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão (n = 6). (α^{***} e β^{***}) representam diferença estatística (p < 0,001) em relação ao CN (controle negativo: salina) e CP (controle positivo: doxorrubicina), respectivamente.

Como pode ser observado na figura 14, o tratamento com o látex de *C. celtidifolius* causou significativa inibição do crescimento do tumor com o aumento da concentração do mesmo (26, 32 e 56%).

4.3.2 Ensaio da membrana corioalantóica (CAM)

A neovascularização observada concomitantemente com a formação de uma massa tumoral é de extrema importância para que esta possa se desenvolver, pois será a partir destes novos vasos formados que o tumor receberá os nutrientes necessários à sua sobrevivência.

Sabendo da existência deste fator determinante para o desenvolvimento do tumor foi avaliada a atividade antiangiogênica do látex de *C. celtidifolius* pelo CAM, realizado em ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus*. Os resultados obtidos são apresentados na figura 15 onde se observa de forma dose-dependente uma redução no percentual de vasos sanguíneos à medida que se aumenta a concentração de látex utilizada.

As concentrações 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco apresentaram 41, 56, 66 e 75%, respectivamente, de redução do número vasos sanguíneos sendo todos estes valores significativos em relação ao controle negativo (CN: 100%) e ao controle positivo (CP: 14%).

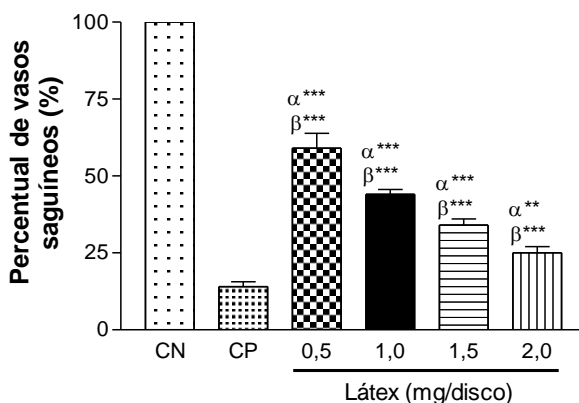


Figura 15. Percentual de vasos sanguíneos existentes após o tratamento com o látex (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco) de *C. celtidifolius*. Os resultados expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). (α** e α***; β***) significam diferença estatística (p < 0,01 e p < 0,001) em relação ao CN (controle negativo: salina) e CP (controle positivo: ácido retinóico (1μg/disco)); respectivamente.

A figura 16 apresenta as fotos que representam a redução no percentual de vasos sanguíneos existentes ao redor do disco de cada tratamento realizado, sendo possível uma melhor visualização da quantificação anteriormente mencionada (Figura 15).

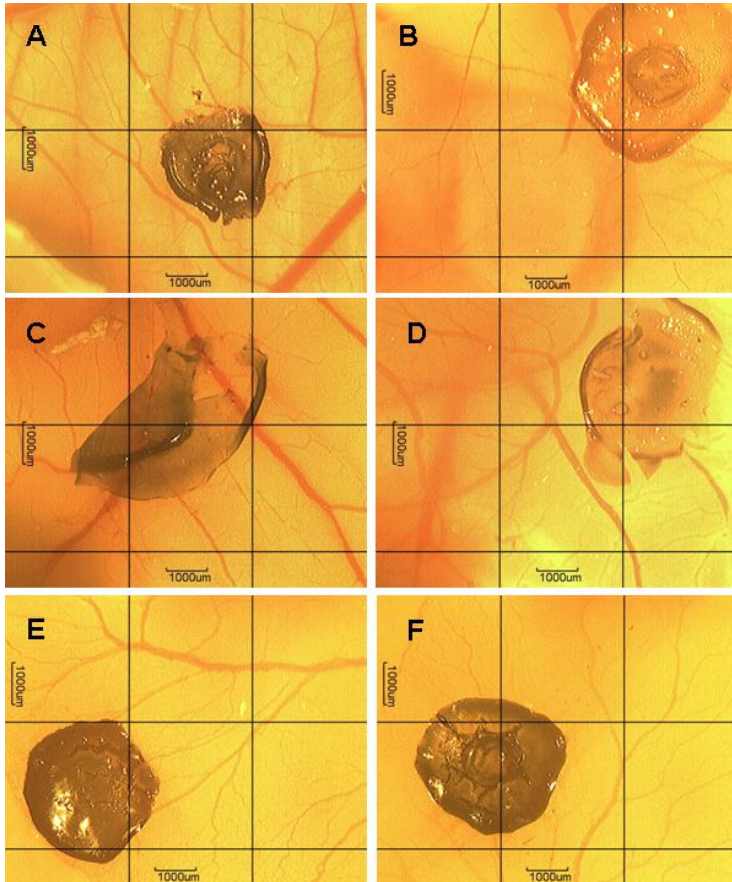


Figura 16. Efeito antiangiogênico do látex de *C. celtidifolius* sobre a vascularização da membrana corioalantóica de embriões de *Gallus domesticus* no oitavo dia de vida. A) Controle negativo tratado com solução salina; B) controle positivo tratado com ácido retinóico; C, D, E e F) tratamento com o látex (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/disco); respectivamente.

Adicionalmente à quantificação dos vasos sanguíneos, foi realizada a morfometria dos embriões de *Gallus domesticus* a fim de avaliar se o tratamento com o látex foi capaz de causar alterações no tamanho dos embriões em desenvolvimento. Dessa forma, o comprimento embrionário total foi mensurado assim como as flexuras mostradas anteriormente.

O comprimento embrionário total (mm) representado por (CCV+CVC) mostrado na figura 17 nos permite dizer que o tratamento (0,5 – 2,0 mg/disco) com o látex de *C. celtidifolius* não causou alteração significativa nos embriões (27,33; 28,33; 27,33 e 29,0 mm) em comparação aos controles negativo e positivo (28,58; 26,42 mm) respectivamente.

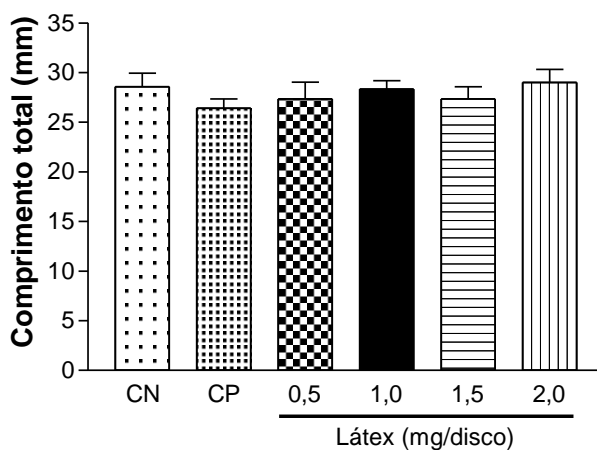


Figura 17. Efeito do látex de *C. celtidifolius* sobre o comprimento total dos embriões de *Gallus domesticus* no oitavo dia de vida. Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão ($n = 6$). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 μ g/disco)), respectivamente.

Outra análise de morfogênese realizada nos embriões foi a mensuração dos comprimentos CCV e CVC, sendo as proporções CCV/CVC e CCV/CCV+CVC apresentadas nas figuras 18 e 19 respectivamente. A figura 18 nos permite dizer que o látex nas concentrações (0,5 – 2,0 mg/disco) testadas não causou alterações

significativas (0,79; 0,68; 0,75 e 0,71) em relação ao controle negativo (0,69) e positivo (0,90).

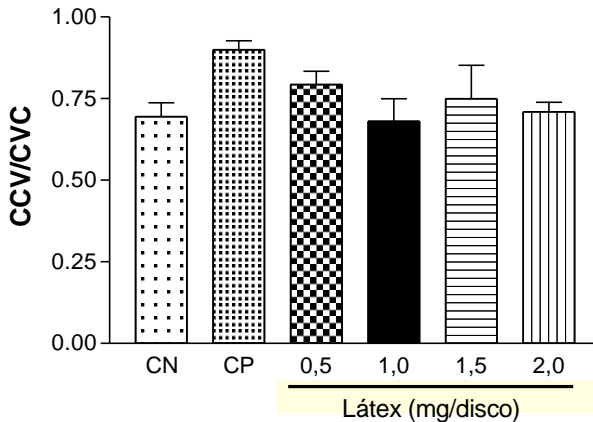


Figura 18. Efeito do látex na morfogênese dos embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A figura representa a razão do comprimento cefálico-cervical (CCV) pelo comprimento cervical-caudal (CVC). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 µg/disco)), respectivamente.

Neste sentido a figura 19, que representa a proporção $CCV/CCV+CVC$, também demonstra que não houve alteração significativa (0,40; 0,40; 0,42; 0,41) na morfogênese dos embriões quando tratados com o látex de *C. celtidifolius* (0,5 – 2,0 mg/disco) em relação aos controles negativo (0,41) e positivo (0,47) utilizados.

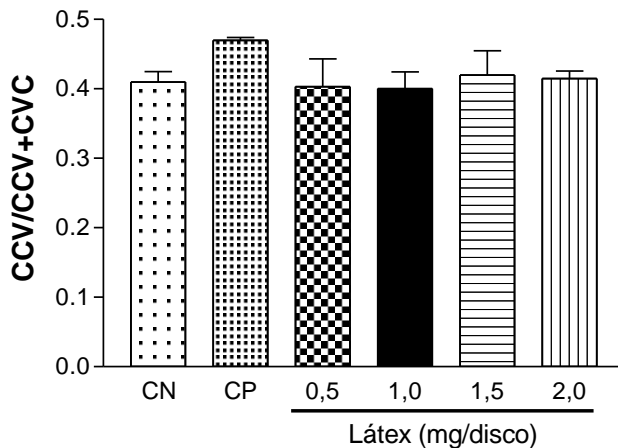


Figura 19. Efeito do látex na morfogênese dos embriões de *Gallus domesticus* com oito dias de desenvolvimento. A figura representa a razão do comprimento cefálico-cervical (CCV) pelo comprimento total (CCV + CVC). Os resultados foram expressos como Média ± Desvio Padrão (n = 6). CN representa controle negativo (salina) e CP o controle positivo (ácido retinóico (1 µg/disco)), respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Nos países em desenvolvimento estima-se que uma em cada três pessoas afetadas pelo câncer morre em consequência desta doença. Atualmente o câncer permanece entre as maiores causas de morte na população em geral, ficando somente atrás das doenças cardiovasculares. Levando em consideração este dado, é possível perceber que o impacto causado pelo câncer aumenta cada vez mais em decorrência do contínuo crescimento populacional bem como seu envelhecimento (KAMB, 2005; INCA, 2010).

Do ponto de vista terapêutico existem atualmente três formas de tratamento: cirurgia, radioterapia e quimioterapia que normalmente são utilizadas em associações. Um terço dos pacientes são curados através de medidas locais (cirurgia ou radioterapia), porém estas só são eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase. Nos demais casos o câncer se caracteriza pela presença de micrometástases que necessitam de tratamento sistêmico obtido através da quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005).

No ano de 1950 deu-se início a busca por novos agentes antitumorais, encontrados em fontes naturais como as plantas. Neste mesmo ano foi relatada a descoberta dos alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina) e derivados de podofilotoxinas, ambos atualmente muito utilizados na terapêutica. Entretanto, é preciso ressaltar que o arsenal antineoplásico disponível atualmente apresenta alguns inconvenientes como o desenvolvimento da resistência às drogas utilizadas e a existência de efeitos colaterais (JENDIROBA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005).

A maior parte dos medicamentos antineoplásicos utilizados não atuam de forma seletiva, assim, tanto células tumorais como células sadias são afetadas levando à perda celular também de tecidos saudáveis. Então, muitos são os questionamentos existentes a respeito destes medicamentos e seus efeitos colaterais apresentados durante o tratamento (De ALMEIDA, 2004).

Neste sentido, as plantas continuam sendo fonte importante na descoberta de novas moléculas agora mais seletivas para o tratamento dos mais variados tipos de câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Assim, o presente estudo objetivou a investigação do possível efeito antitumoral e prováveis mecanismos de ação do látex de *C. celtidifolius* através de ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*, uma vez que existem relatos da utilização popular desta planta para o tratamento do câncer (DALBÓ et al., 2005; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

A partir do momento em que se pretende caracterizar o efeito antitumoral de um composto parte-se do princípio de que este efeito é comprovado inicialmente através da capacidade do composto em questão (látex) de provocar a morte das células formadoras da massa tumoral (AJITH; JANARDTHANAN, 2003).

Desta forma a avaliação da citotoxicidade de um produto geralmente é o primeiro parâmetro a ser avaliado na pesquisa de agentes antitumorais. Neste contexto, a citotoxicidade do látex foi analisada através do ensaio do MTT sobre duas linhagens antitumorais diferentes (Ehrlich e MCF-7) (Figura 10).

Levando em consideração os resultados obtidos com o presente estudo é possível afirmar que o látex de *C. celtidifolius* apresentou importante efeito citotóxico para ambas as linhagens celulares analisadas, uma vez que segundo Suffines e Pezzuto (1990) somente extratos com valor de $CI_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ podem ser considerados ativos (Tabela 2).

Acerca do látex de *C. celtidifolius* não existem estudos que demonstram seu potencial citotóxico em células tumorais, porém os dados obtidos corroboram estudos onde este efeito foi avaliado em diversas linhagens celulares a partir de plantas que pertencem ao mesmo gênero, que são apresentados a seguir.

A infusão das folhas de *C. malambo* permitiu o isolamento de um diterpeno com esqueleto do tipo caurano (ent-16 β -17 α -dihidroxicaurano) que apresentou $CI_{50} = 12,5 \mu\text{g/mL}$ para células MCF-7 após 72 horas de tratamento (MORALES et al., 2005). Diterpenos clerodanos derivados de *C. cajucara* também apresentaram efeito citotóxico, porém para células de Ehrlich e K652 onde as CI_{50} encontradas foram $52,2 \mu\text{g/mL}$ e $14,9 \mu\text{g/mL}$, após 48 e 96 horas de tratamento, respectivamente (MACIEL et al., 2007).

Um estudo de Block e colaboradores (2002) demonstrou que o extrato diclorometano das folhas de *C. zambesicus* apresentou $CI_{50} = 36,2 \mu\text{g/mL}$ sobre células HeLa após 72 horas de tratamento. Mais tarde, no ano de 2004, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que diterpenóides com esqueleto traquilobano e isopimarano, isolados da mesma planta, apresentaram CI_{50} sobre mais outras duas linhagens tumorais: HL-60 e WI-38 ($28,9$ e $32,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) após 24 horas de tratamento.

Compagnone e colaboradores (2010) demonstram o efeito do óleo essencial das flores ($CI_{50} = 103,27$ e $87,91 \mu\text{g/mL}$) e das folhas ($CI_{50} = 45,85$ e $54,95 \mu\text{g/mL}$) de *C. micans* e do óleo essencial de *C.*

matourensis (CI₅₀ = 36,60 e 83,90 µg/mL) sobre as linhagens LoVo e HeLa, respectivamente após 72 horas de tratamento.

A figura 10 demonstra que a atividade citotóxica do látex desta planta se apresenta de forma dose-dependente para ambas as linhagens celulares utilizadas. E, através dos valores de CI₅₀ mostrados na tabela 2 é possível perceber que o látex apresentou uma maior toxicidade nas células de Ehrlich do que nas células MCF-7 após 48 horas de tratamento.

O látex de *C. celtidifolius* utilizado em todos os ensaios consiste em um material rico em compostos ainda não identificados. A metodologia empregada na análise química deste material teve como objetivo e resultados (tabela 1) a identificação de compostos fenólicos como flavan-3-óis (catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina) e flavonóis (miricetina, quercetina, campferol) como é esperado nas espécies do gênero *Croton* (PUEBLA, GUERRERO, CORREA, 2004).

Os compostos fenólicos são constituintes fundamentais dos vegetais, presentes principalmente em plantas, raízes e frutas. Assim como os alcalóides, terpenos, polienos e oliacetilenos, todos são resultantes do metabolismo secundário das plantas e intervêm diretamente na pigmentação, regulação do crescimento celular e na defesa contra agentes agressores (DELOIRE et al., 1998).

Itokawa e colaboradores (1991) relatam que alguns compostos isolados do gênero *Croton* apresentam citotoxicidade como é o caso do alcalóide taspina isolado da espécie *C. lechleri* que apresentou potente atividade contra células KB e V-79. A atividade citotóxica observada após o tratamento com o látex de *C. celtidifolius* pode também ter sido decorrente de outros compostos que não foram identificados no estudo químico deste material devido à ausência de padrões e metodologia, sendo necessária uma melhor caracterização dos compostos existentes.

Os resultados até agora discutidos apenas nos permitem afirmar que o látex foi capaz de induzir a morte celular nas linhagens estudadas. Porém, outros parâmetros ainda precisam ser observados para que se possa identificar como este efeito pode ser obtido. Partindo do princípio de que os compostos promissores possam atuar sob diversas vias, estabelecendo uma delas como mecanismo de ação, alguns mecanismos foram propostos neste trabalho.

O primeiro deles envolve um dos principais alvos para um novo agente antitumoral que é a molécula de DNA uma vez que ela está envolvida na replicação, transcrição e regulação de genes. Os agentes antineoplásicos mais antigos e mais utilizados terapeuticamente são

conhecidos como agente alquilantes e apresentam interação direta com o DNA (REY et al., 2009).

Estes agentes antitumorais citados são conhecidos por apresentarem mecanismo de ação ciclo-celular não específico, sendo divididos em subclasses de acordo com o modo de interação com a molécula de DNA que podem ser: inibição da síntese de nucleotídeos (análogos das bases nitrogenadas), efeito direto ao DNA (alquilantes como cisplatina), ligantes que interagem na fenda menor do DNA (berenil), alteração no pareamento de bases (proflavina; acridina) e inibição da DNA-girase (doxorubicina) (ALMEIDA et al., 2005).

A cisplatina, um composto genotóxico, amplamente utilizado no tratamento de tumores, é o exemplo clássico de medicamento antitumoral que tem como alvo a molécula de DNA. Ao se ligar a esta molécula o medicamento em questão é capaz de formar aductos cuja natureza afeta um determinado número de vias de sinalização bloqueando a duplicação e a transcrição induzindo a morte celular por apoptose ou necrose (FUERTES; ALONSO; PERES, 2003).

A classe dos antibióticos antitumorais (antraciclina) representada pelo medicamento doxorubicina, aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), também apresenta efeito alquilante cujo mecanismo de ação é a formação de ligações interfilamentares com o DNA que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da enzima topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos do DNA (ALMEIDA et al., 2005).

Neste sentido, a figura 11 demonstra o efeito direto do tratamento com o látex de *C. celtidifolius* sobre o DNA plasmidial, cujo potencial genotóxico identificado nos permite indicar sua atividade citotática. Também é possível perceber que desde a menor concentração de látex testada detectou-se a presença de mais de 50% de DNA plasmidial na forma FII demonstrando a alta capacidade desta planta em interagir com o DNA provocando o seu rompimento (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; CHING YU et al., 2005; RANG; DALE, 2007).

Até o presente momento, o conceito de desenvolvimento de fármacos antitumorais alvo-específicos para o tratamento do câncer não tem sido bem sucedido quanto se esperava. A taxa de sucesso para os fármacos antineoplásicos apresentadas entre 1991-2000 foi apenas cerca de 5% para as 10 maiores companhias farmacêuticas, sendo uma das principais causas de falha na clínica, a falta de eficácia dos mesmos. Estes dados estimularam o interesse de pesquisadores que passaram a

focar em ensaios que permitissem avaliar o tipo de morte celular induzida pelo fármaco em desenvolvimento (FAYAD et al., 2009).

Dessa forma, um segundo efeito avaliado para o látex seria a sua capacidade de inibição do crescimento tumoral através da observação do tipo de morte celular induzida, pois ambas, apoptose e necrose são mecanismos de morte celular efetivos na terapia do câncer porque favorecem a ativação do sistema imunológico contra o tumor a fim de eliminar células indesejáveis e danificadas (MASQUELIER et al., 2004).

Células apoptóticas e células necróticas diferenciam-se entre si em relação às suas características funcionais e morfológicas. A necrose é uma forma patológica de morte celular resultante de um insulto agudo à célula tipificado pelo rompimento das membranas celular e nuclear, enquanto que a apoptose, considerada um evento fisiológico é caracterizada por uma autodigestão controlada da célula onde a integridade da membrana celular é mantida. Neste processo são observadas ainda alterações características no núcleo celular assim como diminuição da função mitocondrial (THOMPSON, 1995).

Então, neste trabalho, a capacidade de indução de apoptose e/ou necrose provocada pelo látex foi avaliada através da coloração diferencial por BE/LA que tornou possível a quantificação dos dois tipos de morte celular citados anteriormente por meio da avaliação da permeabilidade da membrana (PIAZZA et al., 1995).

Como resultado, o látex de *C. celtidifolius* foi capaz de induzir a apoptose em uma quantidade bastante significativa de células que foram expostas ao tratamento (Figura 12 e 13), porém o mecanismo bioquímico através do qual o látex foi capaz de aumentar o número de células apoptóticas ainda precisa ser elucidado. Cabe ressaltar que a respeito de *C. celtidifolius* não foi encontrado nenhum estudo que relate sua atividade pró-apoptótica e ainda são pouquíssimos os que relatam esta atividade entre as espécies do gênero *Croton* e da família Euphorbiaceae.

Os agentes quimioterápicos mais apreciados atualmente são aqueles capazes de induzir a apoptose celular, neste contexto, o látex de *C. celtidifolius* apresenta-se como um composto promissor na terapia do câncer em vista deste e dos demais efeitos *in vitro* até agora apresentados (DEBATIN, 1999).

Estes resultados formam um conjunto de dados que podem ser relacionados entre si. Dessa forma, a partir da observação da atividade citotóxica do látex de *C. celtidifolius*, apresentada no ensaio do MTT, afirma-se que este composto é capaz de promover a morte de duas

linhagens celulares estudadas. Adicionalmente, o ensaio do BE/LA permite concluir que o tipo de morte celular induzida na maioria das células tratadas foi a apoptose que por sua vez é decorrente do possível dano ao DNA induzido pelo látex como demonstrado no ensaio da fragmentação do DNA plasmidial (CHEN et al., 2000).

Um dado que deve ser considerado em relação ao número de células apoptóticas observadas é o tempo de exposição das células ao tratamento e a concentração de látex utilizada. Em vista de que o ensaio de dano ao DNA plasmidial ocorre diretamente sobre esta molécula pode-se dizer que a concentração e o tempo de exposição da célula ao tratamento foram suficientes para promover a quebra do DNA responsável por desencadear a morte celular por meio de apoptose.

Estudos relatam que a quercetina isolada apresentou efeito pró-apoptótico em várias linhagens celulares (K562, Molt-4, Raji e MCAS) ao inibir a proteína HSP70 cuja principal função envolve a sobrevivência das células tumorais (WEI et al., 1994).

O campferol encontrado no estudo químico do látex de *C. celtidifolius* também teve seu efeito pró-apoptótico comprovado por Nguyen e colaboradores (2003) que relatam este efeito em células tumorais A549 ao perceber que o tratamento das células com este composto foi capaz de aumentar a expressão de moléculas pró-apoptóticas (Bax e Bad). Dessa forma, apesar dos estudos citados anteriormente terem utilizado flavonóis puros a indução da apoptose no presente estudo pode estar correlacionada a existência destes no látex.

Ahmad e colaboradores (1997) demonstraram que o composto epigalocatequina-3-galato, presente no chá verde, foi capaz de induzir a apoptose em células A431, porém em células não tumorais este efeito não foi observado. Assim, o efeito pró-apoptótico também pode ser decorrente da outra classe de compostos identificados no estudo químico látex (flavan-3-óis) uma vez que o composto epigalocatequina foi o composto majoritário identificado nesta classe de metabólitos secundários.

Para confirmar os resultados *in vitro* foram realizados ensaios *in vivo* a fim de caracterizar efetivamente a atividade antitumoral do látex de *C. celtidifolius*. Dessa forma, camundongos Balb/C foram inoculados com o TAE e tratados com o látex a fim de avaliar o efeito antitumoral desta planta, sendo que na tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos neste ensaio cuja percepção de inibição do crescimento tumoral foi bastante significativa.

Nota-se redução significativa no peso corporal dos animais tratados com todas as concentrações do látex, porém merece maior

destaque a capacidade de redução do volume de tumor (Líquido ascítico) e de células compactadas da maior concentração do látex (La3: 3,12 mg/kg). Todos estes três parâmetros avaliados apresentaram efeito dose-dependente.

Considerando que nos animais inoculados com o TAE o líquido ascítico atue como fonte nutricional direta às células tumorais, sempre se observa um rápido aumento na quantidade deste fluido uma vez que o aporte de nutrientes é um fator promotor do crescimento da massa tumoral (RAJESHWAR; GUPTA; MAZUMDER, 2005). Então, pode-se concluir que ao reduzir o volume de líquido ascítico, o tratamento com o látex de *C. celtidifolius* foi capaz de inibir o crescimento tumoral por redução do aporte de nutrientes ao tumor de Ehrlich.

Na literatura disponível não existem relatos a respeito do efeito antitumoral de *C. celtidifolius* sob células do TAE, entretanto algumas plantas pertencentes à mesma família já tiveram seu efeito antitumoral relatado frente à este tipo de tumor como é o caso da *Tragia plukenetii*.

Em vista da similaridade fitoquímica entre as plantas pertencentes à mesma família pode-se dizer que os resultados relatados neste trabalho corroboram os dados obtidos em relação à *T. plukenetii* onde o extrato etanólico testado promoveu a redução do peso corporal (27,32; 25,93 e 24,7 gramas) e o volume de células compactadas (1,4; 0,9 e 0,3 mL) de forma dose-dependente (100, 200 e 300 mg/kg) (MUTHURAMAN et al., 2008).

Adicionalmente aos resultados *in vivo* já apresentados, a figura 14 demonstra o potencial de inibição do TAE obtido através do tratamento com o látex de *C. celtidifolius* cujos valores de inibição tumoral encontrados foram 26; 32 e 54%.

O mesmo parâmetro foi observado em outra planta pertencente à família Euphorbiaceae, a *Synadenium umbellatum*, cujos valores obtidos para a inibição tumoral também foram dose-dependente onde a maior concentração testada de extrato bruto etanólico (25 mg/kg) apresentou 36,7% de inibição tumoral.

A diferença existente entre as duas plantas relatadas é a concentração utilizada onde a dose do látex de *C. celtidifolius* capaz de inibir 54% de crescimento tumoral é cerca de 7,8 vezes menor do que a dose capaz de inibir 36,7% para *Synadenium umbellatum*, demonstrando mais uma vez o grande potencial antitumoral da planta analisada neste estudo (NOGUEIRA et al., 2008).

O número de células existentes no volume de tumor total assim como a proporção de células inviáveis/viáveis também são importantes para que o efeito seja realmente comprovado. Apesar de o volume

tumoral encontrado em La1 e La2 apresentar diferença estatística em relação ao grupo controle, o número de células praticamente se manteve inalterado nessas duas concentrações. Somente em La3 se observa uma quantidade de volume tumoral e número de células existentes neste volume significativamente reduzidos. A proporção de células inviáveis/viáveis se apresentou maior em La1 e La3 indicando, mais uma vez, o efeito citotóxico do látex de *C. celtidifolius* sobre as células do tumor de Ehrlich em decorrência de um aumento no número de células mortas.

Segundo Clarkson e Burchenal (1965) o critério mais confiável para julgar o valor de qualquer fármaco antitumoral é o prolongamento da vida dos animais (TMS e PAL). Através do ensaio realizado *in vivo* observou-se que o látex de *C. celtidifolius* aumentou o TMS e o PAL, conforme mostrado na tabela 3. O látex apresentou aumento de TMS e PAL de forma dose-dependente e bastante significativa sendo necessário ressaltar o PAL encontrado para a maior dose testada chegou a 34,61%.

Nardi e colaboradores (2003) apresentaram o efeito anti-inflamatório de frações obtidas a partir da casca de *C. celtidifolius*. Este resultado foi atribuído aos compostos proantocianidinas e flavonóides encontrados no estudo fitoquímico realizado previamente por este grupo. Apesar de o presente estudo ter utilizado o látex e não a casca da mesma planta, a mesma classe de compostos foram encontrados no estudo químico, assim, é possível correlacionar o efeito antitumoral ao efeito anti-inflamatório dos compostos pois as enzimas responsáveis pela resposta inflamatória (COX-1 e COX-2 principalmente) em tumores podem estar sendo inibidas com o tratamento utilizado.

Outro processo celular frequentemente associado ao câncer é a angiogênese, sendo fundamental a compreensão de como o processo de formação do tumor acontece e quais os possíveis agentes estimuladores deste evento. Há aproximadamente 65 anos atrás foi sugerido que fatores derivados de tumores eram responsáveis por promover o crescimento de novos vasos sendo pouco tempo depois proposto que o crescimento tumoral dependia crucialmente do desenvolvimento da angiogênese (FERRARA; KERBEL, 2005).

Hoje se sabe que tumores humanos assim como tumores animais se caracterizam por não serem angiogênicos no início do seu desenvolvimento. Alguns carcinomas *in situ* podem existir por meses ou anos sem neovascularização tendo como consequência um volume limitado e restrito a poucos milímetros cúbicos. Porém, com o passar do tempo alguns tumores podem desenvolver o fenótipo angiogênico permitindo o recrutamento de novos capilares sanguíneos que dão

suporte ao crescimento tanto das células angiogênicas como não angiogênicas (FOLKMAN, 1995).

Isso significa que até o tamanho de aproximadamente 1-2 mm o tumor pode absorver nutrientes existentes ao seu redor por difusão simples, a partir deste tamanho o aporte nutricional precisa envolver o recrutamento de novos capilares sanguíneos em direção à massa tumoral com a consequente infiltração neste tecido (PANDYA; DHALLA; SANTANI, 2006).

Apesar de alguns contratempos iniciais e resultados negativos na busca por agentes antiangiogênicos, grandes progressos têm sido alcançados nos últimos anos quando se põe em foco a angiogênese como terapia para algumas doenças. Portanto, inibir a angiogênese é uma estratégia promissora para o tratamento, por exemplo, do câncer e atualmente vêm sendo alvo de bastante interesse na comunidade científica quando se trata especificamente desta doença (FERRARA; KERBEL, 2005).

Os dados apresentados para o ensaio *in vivo*, mostrado anteriormente, nos permite afirmar que o látex apresentou efeito antitumoral ao inibir o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich nos camundongos. E, de forma complementar, a fim de elucidar mais um dos possíveis mecanismos de ação antitumoral do látex, a atividade antiangiogênica foi determinada também *in vivo* através do ensaio de CAM realizado com ovos de galinha fertilizados da espécie *Gallus domesticus*.

Como resultado do ensaio da membrana corioalantóica, nas figuras 15 e 16 são apresentados o percentual e a quantidade de vasos sanguíneos existentes em concentrações crescentes do látex, sendo claramente observada uma redução na quantidade de vasos à medida que se aumenta a concentração utilizada caracterizando um efeito dose-dependente.

Ng e colaboradores (2010) apresentam o efeito antiangiogênico de nove plantas medicinais, estando entre estas, três plantas do gênero *Phyllanthus*, pertencentes à família Euphorbiaceae. O extrato metanólico de *P. urinaria* apresentou 56,7% de inibição da angiogênese em aortas de ratos. Curiosamente as outras duas espécies deste gênero também foram capazes de inibir a formação de novos vasos, o que permite supor que o potencial antiangiogênico observado por estes autores pode ter sido derivado de compostos semelhantes como lignanos (hipofilantina, filantina, nirantina).

Por sua vez, o látex (Sangue-de-Drágo) de diferentes espécies do gênero *Croton* (Euphorbiaceae) também apresenta em sua

composição neolignanós (dihidrobencofurano) que foram testados no ensaio de CAM por Apers, Vlietinck e Pieters (2003) cujo efeito antiangiogênico apresentou capacidade intermediária quando testado na concentração de 50µg/pellet corroborando estudos mostrados anteriormente onde este efeito foi atribuído aos compostos desta mesma classe.

No presente trabalho sugere-se que o efeito antiangiogênico observado possa ser decorrente da existência de compostos como lignanos e neolignanós no látex de *C. celtidifolius*. Dessa forma, faz-se necessária uma caracterização química mais detalhada do material em questão uma vez que estes compostos são comuns em diferentes espécies deste gênero.

Outra possibilidade pela qual o efeito antiangiogênico pode ser obtido seria através da inibição da expressão e atividade da isoformas COX-1 e 2 uma vez que estas enzimas atuam na regulação da formação de novos vasos sanguíneos. Assim, o efeito do látex de *C. celtidifolius* também pode estar relacionado ao efeito anti-inflamatório observado em frações ricas em proantocianidinas (NARDI et al., 2007), corroborando dados encontrados no estudo da composição química do material utilizado neste trabalho (tabela 1).

Judah Folkman (1974) relata que o tratamento antiangiogênico precedendo a terapia antitumoral de escolha para cada paciente seria uma poderosa abordagem sinérgica. Neste sentido, estudos que permitam uma melhor compreensão destes possíveis agentes antiangiogênicos provavelmente irão fazer-lhes uma maior parte da terapia antitumoral no futuro.

Além da angiogênese promover a expansão da massa tumoral como já foi mencionado anteriormente, é preciso ressaltar que este mecanismo propicia, de forma bastante importante, a formação de metástases, onde os novos vasos formados funcionam como uma rota eficiente para a saída de células tumorais do seu sítio inicial para a circulação sanguínea com a posterior implantação destas células em outro tecido qualquer do organismo (ZETTER, 1998).

Portanto, à medida que a formação de novos vasos é inibida, a chance de um tumor liberar suas células à circulação se torna extremamente reduzida, implicando na diminuição do risco de desenvolvimento metastático. Dessa forma sugere-se que o látex de *C. celtidifolius* ao inibir o desenvolvimento dos vasos sanguíneos também dificulte a formação de metástases tumorais. Entretanto, cabe ressaltar a necessidade de uma série de experimentos para que estes possíveis mecanismos de ação de fato sejam comprovados.

Ainda no ensaio de CAM podem ser observados outros parâmetros importantes como, por exemplo, a capacidade do látex em causar alterações morfológicas no embrião de galinha. Dessa forma através dos resultados apresentados, a figura 17 nos permite dizer que o tratamento com a planta *C. celtidifolius* não apresentou efeito tóxico sobre os embriões uma vez que o comprimento total dos embriões submetidos ao tratamento não foi alterado em relação ao controle negativo.

O estudo da morfogênese ainda envolveu mais algumas medidas que estão apresentadas nas figuras 18 e 19 através da relação CCV/CVC e $CCV/CCV+CVC$. Estes dados corroboram o que foi afirmado acima demonstrando mais uma vez que o látex não causou alteração na morfogênese dos embriões.

Este conjunto de dados sugere que o látex de *C. celtidifolius* possui efeito antitumoral bastante significativo. Todos os dados obtidos podem ser correlacionados de forma que o conjunto de efeitos citotóxico, nucleásico e pró-apoptótico foram, possivelmente, os agentes promotores da morte das células tumorais. O látex ainda foi capaz de inibir a angiogênese agregando ainda mais valor ao seu potencial antitumoral.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados e discutidos no presente trabalho é possível concluir que o látex de *C. celtidifolius* pode ser considerado um produto promissor na pesquisa para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos uma vez que:

- Apresentou-se citotóxico em todas as concentrações testadas tanto para a linhagem tumoral de Ehrlich como para a linhagem MCF-7;
- Possivelmente alguns de seus constituintes tem interação direta com o DNA uma vez que o látex foi capaz de provocar quebras simples e dupla no DNA plasmidial *in vitro*;
- Tem efeito pró-apoptótico possivelmente decorrente da ação direta sobre o DNA claramente demonstrado pela coloração do núcleo celular com BE/LA;
- Apresentou atividade antitumoral *in vivo*, sendo capaz de reduzir o tumor uma vez que houve redução do peso dos animais, diminuição no volume de tumor, assim como diminuição do volume de células compactadas e da relação células/volume tumoral;
- Causou elevação do tempo médio de sobrevivência (TMS) e do percentual de aumento da longevidade (PAL) dos animais implantados com o TAE;
- Apresentou efeito antiangiogênico no ensaio de CAM cujo resultado foi uma redução significativa no número de vasos sanguíneos após o tratamento;
- Não alterou a morfologia dos embriões de *Gallus domesticus*, demonstrando ser atóxico nas concentrações utilizadas no ensaio de CAM.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados apresentados neste trabalho são apresentados como perspectiva:

- Estudo fitoquímico mais detalhado do látex de *C. celtidifolius* a fim de proporcionar uma melhor correlação entre os resultados analisados no que diz respeito à estrutura dos compostos e seus possíveis efeitos biológicos;
- Isolar a partir do látex de *C. celtidifolius* possíveis estruturas químicas cujo efeito antitumoral já é relatado e aplicá-las nos ensaios apresentados nesta dissertação;
- Submeter diferentes linhagens celulares, incluindo células não-tumorais, ao ensaio de citotoxicidade;
- Avaliar a expressão de proteínas associadas à biossinalização do processo de apoptose como p53, Bcl-2, Bax e citocromo c além da atividade da caspase 3;
- Avaliar o efeito do látex na expressão de fatores pró-angiogênicos, como VEGF, a fim de correlacionar os resultados do ensaio antitumoral com o efeito antiangiogênico observado;
- Avaliar o efeito do látex de *C. celtidifolius* no ciclo celular através do estudo da expressão das proteínas envolvidas no controle deste mecanismo, assim como a distribuição das células nas diferentes fases do mesmo.

8 REFERÊNCIAS

ACS – American Cancer Society. **Cancer statistics 2009**. Disponível em:
<http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_2008.asp?sitearea=STT&level=1>. Acesso em: 05 de Fevereiro de 2010.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508. 2008.

AHMAD, N.; FEYES, D. K.; NIEMINEN, A. L.; AGARWAL, R.; MUKHTAR. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallato and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of National Cancer Institute*, v. 89, n. 24, p. 1881-1886, 1997.

AJITH, T. A.; JANARDTHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162. 2003.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129. 2005.

AMARAL, A. C. F.; BARNES, R. A. Alkaloides from *Croton celtidifolius*. **Planta Medica**, v. 63, p. 485. 1997.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58. 2007.

APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry reviews**, v. 2, p. 201-217. 2003.

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

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life science**, v. 78, p. 431-441. 2005.

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

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

BERRY, P. E. **Flora brasiliensis**. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB/index.html>>. Acesso em: 15 agosto 2010.

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

BLOCK, S.; STÉVIGNY, C.; PAUW-GILLET, M. C. D.; HOFFMANN, E.; LLABRÈS G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Ent-trachyloban-3 β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. **Planta Medica**, v. 68, p. 647-649. 2002.

BOGLIOLO, Luigi; BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1328 p.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653-660. 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nature*, v. 9, n. 6, p. 653-660. 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 15, p. 932-936. 2005.

CHEN, Y.; LIU, X.; PISHA, E.; CONSTANTINOU, A. I.; HUA, Y.; SHEN, L.; BREEMEN, R. B.; ELGUINDIN, E. C.; BLOND, S. Y.; ZHANG, F.; BOLTON, J. T. A metabolite of equine estrogens, 4-hydroxyequilenin, induces DNA damage and apoptosis in breast cancer cell lines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 342-350. 2000.

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

CITADINI-ZANETTE, V.; BOFF, V. P. Levantamento Florístico em Áreas Mineradas a Céu Aberto na Região Carbonífera de Santa Catarina, Brasil; Florianópolis. Secretaria de Estado da Tecnologia, Energia e Meio Ambiente. 1992. 160p.

CLARKSON, B. D.; BURCHENAL, J. H. Preliminary screening of antineoplastic drugs. **Progress in clinical cancer**, v. 1, p. 625-629. 1965.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G. ; ARVELO, F. ; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 2, p. 101-108. 2010.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79. 2005.

DALBÓ, S.; JÜRGENSEN, S.; HORST, H.; RUZZA, A. A.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 765-771. 2005.

DALBÓ, S.; JURGENSEN, S.; HOST, H.; RUZZA, A. A.; SOETHE, D. N.; SANTOS, A. R.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 317-323. 2006.

DALBÓ, S.; MOREIRA, E. G.; BRANDÃO, F. C.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; MICKE, G. A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-Rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. **Journal of pharmacological sciences**, v. 106, p. 234-241. 2008.

De ALMEIDA, José Ricardo Chamhum. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. 1. ed. Ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 358 p.

DEBATIN, K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer drugs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 457, p. 237-244. 1999.

DELOIRE, A.; KRAEVA, E.; DAÍ, G. H.; RENAULT, A. S.; ROCHARD, J.; CHATELAIN, C. ; CARBONNEAU, A. ; ANDARY, C. Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. **Phytoma**, v. 510, p. 46-51. 1998.

DESMARCHELIER, C.; SCHAUS, F. W.; COUSSIO, J.; CICCÀ, G. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell. Arg. on de production of active oxygen radicals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 103-108. 1997.

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

ELVIN-LEWIS. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164. 2001.

FAYAD, W.; FRYKNÄS, M.; BRNJIC, S.; OLOFSSON, M. H.; LARSSON, R.; LINDER, S. Identification of a novel topoisomerase inhibitor effective in cells overexpressing drug efflux transporters. **PLoS ONE**. v. 4, n. 10, p. 1-8. 2009.

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967-974. 2005.

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

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis factor. **Cancer research**, v. 34, p. 2109-2113. 1974.

FORONES, N. M.; CARVALHO, A. P. S.; GIANNOTTI-FILHO, O.; LOURENÇO, L. G.; OSHIMA, C. T. F. Cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and intestinal metaplasia. **Arq. Gastroenterol**, v. 42, n. 1, p. 30-34. 2005.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond and antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 1303-1314. 2009.

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

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanism of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chemical reviews**, v. 103, n. 3, p. 645-662. 2003.

GENENTECH. **Angiogenesis**. Disponível em: <
<http://www.gene.com/gene/research/images/angiogenesis.jpg>>. Acesso em: 16 agosto 2010.

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

GILLET, J. P.; GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. **Methods in molecular biology**, v. 596, p. 47-76. 2010.

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

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

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. **Food Chemistry** (2010), doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.102.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343. 2007.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's Blood: Botany, chemistry and therapeutics uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 361-380. 2008.

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

HOLLSTEIN, M; RICE, K.; GREENBLATT, M. S.; SOUSSI, T.; FUCHS, R; SORLIE, T.; HOVIG, E.; SMITH-SORENSEN, B.; MONTESANO, R.; HARRIS, C. C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n.17, p. 3551-3555. 1994.

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

INCA – Ministério da Saúde. **Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 05 de Fevereiro de 2010.

ITOKAWA, H.; ICHIHARA, Y.; MOCHIZUKA, M.; ENOMORI, T.; MORITA, H.; SHIROTA, O.; INAMATSU, M.; TAKEYA, K. A cytotoxic substance from Sanguis de Grado. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1041-1042. 1991.

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

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

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 505-515. 2000.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Medicine**, v. 3, n. 6, p. 614-620. 1997.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MARLONI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S. MELINO, G. Classification of the cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1463-1467. 2005.

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

KVIECINSKI, M. R.; FELIPE, K. B.; SCHOENFELDER, T.; WIESE, L.P.L.; ROSSI, M. H.; GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; FILHO, D. W., PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of Bidens

pilosa (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p. 69–75. 2008.

LEHNINGER, Albert Lester; J. R. Magalhaes. **Bioquimica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 4 v.

LORENZI, Harri; MATOS, F. J. de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MACIEL, M. A. M.; MARTINS, J. R.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHAVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and Human K562 leukemia cells. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 391-396. 2007.

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

MASFERRER, J. L.; LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; SETTLE, S. L.; WOERNER, B. M.; EDWARDS, D. A.; FLICKINGER, A. G.; MOORE, R. J.; SEIBET, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, v. 60, p. 1306-1311. 2000.

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

MATSUMOTO, Y.; KUNISHIO, K.; NAGAO, S. Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide resistant mutants of human glioma cell line. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 45, p. 37-46. 1999.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOWSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7692-7702. 2006.

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

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

MORALES, A.; PÉREZ, P.; MENDONZA, R.; COMPAGNONE, R.; SUAREZ, A. I.; ARVELO, F.; RAMÍREZ, J. L.; GALINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cancer Letters**, v. 218, p. 109-116. 2005.

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

MUKHERJEE, R.; AXT, E. M. Cyclitols from *Croton celidifolius*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2682-2684. 1984.

MUTHURAMAN, M. S.; DORAIRAJ, S.; RANGARAJAN, P.; PEMAIHAH, B. Antitumor and antioxidant potential of *Tragia plukenetii* R. Smith on Ehrlich ascites carcinoma in mice. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3527-3530. 2008.

NARDI, G. M.; DALBÓ, S.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 73-78. 2006.

NARDI, G. M.; FELLIPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A. K.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v. 10, p. 176-184. 2003.

NARDI, G. M.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 115-122. 2007.

NCI – National Cancer Institute. **Doxorubicin hydrochloride**. Disponível em: <www.cancer.gov>. Acesso em: 24 fevereiro 2010.

Ng, K-W.; SALHIMI, S. M.; MAJID, A. M. S. A.; CHAN, K-T. Anti-angiogenic and cytotoxicity studies of some medicinal plants. **Planta Medica**, v. 76, p. 935-940. 2010.

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

NGUYEN, M.; TRAN, E.; ONG, C. K.; LEE, S. K.; DO, P. T.; HUYNH, J. J.; NGUYEN, T. H.; LEE, J. J.; TAN, Y.; ONG, C. S.; HUYNH, H. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. **Journal of Cellular Physiology**, v. 197, n. 1, p. 110-121. 2003.

- NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306. 1997.
- NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 474-478. 2008.
- O' REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W. S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J. R.; OLSEN, B. R.; FOLKMAN, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 277-285. 1997.
- OLIVEIRA, J. S., BEZERRA, D. P., FREITAS, C. D. T., MARINHO FILHO, J. D. B., MORAES, M. O., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L. V., RAMOS, M. V. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 1563-1573. 2007.
- ORMROD, D.; SPENCER, C.M. Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung cancer. **Drugs**, v. 58, n. 3, p. 533-551. 1999.
- OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **The Oncologist**, v. 9, p. 361-377. 2004.
- PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vascular pharmacology**, v. 44, p. 265-274. 2006.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n. 2, p. 138-144. 2001.

PIAZZA, G. A.; RAHM, A. L. K.; KRUTZSCH, M.; SPERL, G.; PARANKA, N. S.; GROSS, P. H.; BRENDEL, K.; BURT, R. W.; ALBERTS, D. S.; PAMUKCU, R.; AHNEN, D. J. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. **Cancer Research**, v. 55, p. 3110-3116. 1995.

PUEBLA, P.; GUERRERO, M. F.; CORREA, S. C. Flavonoids del género *Croton*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, v.33, n. 1, p. 77-85. 2004.

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

RAJESHWAR, Y.; GUPTA, M.; MAZUMDER, K. Antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Mucana pruriens* (Fabaceae) seeds against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Iranial Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 4, p. 46-53. 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. Maureen. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2007. 829 p.

REBELLO, J. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas**. 2004. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REY, N. A.; NEVES, A.; SILVA, P. P.; PAULA, F. C. S.; SILVEIRA, J. N.; BOTELHO, F. V.; VIEIRA, L. Q.; PICH, C. T.; TERENCEZI, H.;

PEREIRA-MAIA, E. C. A synthetic dinuclear copper (II) hydrolase and its potential as antitumoral: cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1323-1330. 2009.

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

ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton Lechleri*. **Phytomedicine**, v. 10, p. 139-144. 2003.

RUBIN, Emanuel; FARBER, John L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1564 p.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33. 2007.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. S. Sangre de grado *Croton palonostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 121-129. 2002.

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

SCHONN, I.; HENNESEN, J.; DARTSCH, D. C. Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. **Apoptosis**, v. 15, p. 162-172. 2010.

SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C. Blood glucose – and triglyceride – lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in mice. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 3, p. 452-456. 2001.

SILVA, T. H. A.; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 1-17. 2007.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, p. 144-158. 1965.

SOMMIT, D.; PETSOM, A.; ISHIKAWA, T.; ROENGSUMRAN, S. **Cytotoxic** activity of natural labdanes and their semi-synthetic modified derivatives from *Croton oblongifolius*. **Planta Medica**, v. 69, p. 167-170. 2003.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312. 2004.

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

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

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

TESKE, Magrid; TRENTINI, Anny Margaly M. **Herbarium: compêndio de fitoterapia**. 3. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997. 317 p.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **Science**, v. 267, p. 1456-1462. 1995.

THOMPSON, M. W.; THOMPSON, J. S.; NUSSUBAUM, R.; MCINNES, R.; WILLARD, H.. **Genética médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 387 p.

THONGTAN, J.; KITTA KOOP, P.; RUANGRUNGSI, N.; SAENBOONRUENG, J.; THEBTARANONTH, Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 868-870. 2003.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its corioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, p. 1162-1176. 2007.

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

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p. 239-254. 1996.

WANG, T.; WANG, H.; SOONG, Y. Paclitaxel-induced cell death. Where the cell cycle and apoptosis come together. **American Cancer Society**, v. 88, n. 11, p. 2619-2628. 2000.

WEBSTER, G. L. The genera of Euphorbiaceae in the South-Eastern United States. **Journal of Arnold Arboretum**, v. 48, p.313. 1967.

WEI, Y.; ZHAO, X.; KARIYA, Y.; FUKATA, H.; TESHIGAWARA, K.; UCHIDA, A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. **Cancer Research**, v. 54, p. 4952-4957. 1994.

WEINBERG, Robert. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 864 p.

WILSON, S. R.; NEUBERT, L. A.; HUFFMAN, J. C. The chemistry of the Euphorbiaceae. A new diterpene from *Croton californicus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 12, p. 3369-3374. 1976.

YUNES, Rosendo Augusto; CALIXTO, João Batista. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. Chapecó: ARGOS, 2001. 523 p.

ZETTER, B. C. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annual reviews of Medicine**, v. 49, p. 407-424. 1998.