



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Rede Nordeste de Biotecnologia
Universidade Federal do Piauí
- Ponto Focal -

**MECANISMOS DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA E ANTINOCICEPTIVA DE UMA
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DA PLANTA *Casearia sylvestris* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMORES MURINOS E HUMANOS E DE DOR
ONCOLÓGICA**

Jurandy do Nascimento Silva

Teresina – Piauí
2019

Jurandy do Nascimento Silva

**MECANISMOS DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA E ANTINOCICEPTIVA DE UMA
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DA PLANTA *Casearia sylvetris* EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMORES MURINOS E HUMANOS E DE DOR
ONCOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências parciais para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Teresina – Piauí

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586m Silva, Jurandy do Nascimento.
Mecanismos da ação antineoplásica e antinociceptiva de uma fração acetato de etila obtida da planta *Casearia sylvestris* em modelos experimentais de tumores murinos e humanos e de dor oncológica / Jurandy do Nascimento Silva. – 2019.
191 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira”.

1. Diterpenos clerodânicos. 2. Atividade antitumoral.
3. Hollow fiber assay. 4. Carcinoma de colon. 5. Nocicepção.
I. Título.

CDD 615.1

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Jurandy do Nascimento Silva

TÍTULO DO PROJETO: “MECANISMOS DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA E ANTINOCICEPTIVA DE UMA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA DA PLANTA *Casearia sylvestris* EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMORES MURINOS E HUMANOS E DE DOR ONCOLÓGICA.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	<u>Paulo Michel</u>
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Fernanda</u>
Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Márcia</u>
Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes – UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Luciano</u>
Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro - UFC (Examinadora)	<u>SATISFATORIO</u>	<u>Raquel</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 05 de abril de 2019.

HORÁRIO: 14h

LOCAL: Auditório da Enfermagem (CCS/UFPI)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITORA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENACAO GERAL DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**

Profa. Dra. Lucymara Fassarella Agnez Lima

**VICE-COORDENADOR GERAL DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**

Profa. Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros

**COORDENACAO DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM
BIOTECNOLOGIA - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – PONTO
FOCAL PIAUÍ (RENORBIO-UFPI)**

Profa. Dra. Carla Eiras

Dedicatória



Aos meus pais, **Maria de Jesus** e **José Luiz**,
por sempre acreditarem no meu sucesso e
terem me dado como herança, um dos bens
mais valiosos, “o estudo”.

A minha irmã **Jamilly Silva**, também sempre
muito esforçada em seus estudos acadêmicos
e com certeza futura Eng^a. Sanitárista,
formação que muito admiro.

A minha esposa e amiga **Daniella Silva**, pelo
amor, paciência e companheirismo em todos os
momentos durante essa árdua caminhada.

Ao meu filho **João Victor** umas das razões do
meu empenho para conclusão desse trabalho,
que me furtaram muitos momentos de sua vida.

Aos demais **familiares e amigos** que sempre
me encorajaram e deram força para
concretização desse objetivo.

A todos minha valorosa gratidão e amor.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** pelo dom da Vida, que com seus desafios e mistérios nos convida sempre ao aprimoramento, a superação e constante aprendizado.

Aos meus **pais, esposa, irmã, filho e demais familiares**, por todo incentivo, apoio e compreensão das ausências muitas vezes sentidas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira**, agradeço imensamente pelo incentivo, disponibilidade e confiança em mim depositada durante essa árdua e prazerosa caminhada científica. Suas sugestões e conhecimentos sempre compartilhados foram inestimáveis na elaboração desse trabalho;

Ao **Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro** e demais pesquisadores e alunos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia (NuBBE) da UNESP que auxiliaram no processo de obtenção do material vegetal e amostras utilizadas nesse trabalho;

Ao **Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra** e seus alunos, pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho, possibilitando realização de alguns ensaios na FIOCRUZ-BA;

Ao amigo na época Pós Doutorando e hoje merecidamente **Prof. Dr. Jose Roberto de Oliveira Ferreira**, da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, pelo auxílio e ensinamentos prestados;

À **Profa. Dra. Joilane Alves Pereira Freire**, pelas dicas e palavras de apoio durante vários momentos;

À **Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa** pela disponibilidade e ajuda nas análises antiproliferativas na UFC;

Ao **Instituto Federal do Piauí – Campus Teresina Zona Sul**, por entender que a qualificação dos seus servidores engrandece a instituição e contribuí de varias formas a todos que fazem parte da instituição;

Aos **amigos de trabalho (IFPI-CTZS)**, os quais me deram sempre muito apoio e incentivo, em especial aos professores **Alessandro Lima** e **Emmanuel Wassermann**, que me iniciaram nessa prazerosa vida da pesquisa científica.

A **todos (as) colegas de Pós-Graduação** por todo companheirismo e horas compartilhadas “... gente não tem condições, esse seminário já pra amanhã... e biologia molecular é muito complicado...”;

Aos amigos **George Laylson** “já fez isso tudo?, “exatamente...”, “vai dar certo...” e **Oscar Almeida** “te mando já...”, “vai dar certo meu amigo”, “preocupe não...” pela amizade verdadeira desde o início desta caminhada;

As irmãs **Kátia Machado** “que?”... “ham?...” “ainda não fiii?” e **Keylla Machado** “como tá a tese?...”, “tá com dificuldade em que?...” “é assim mesmo fiii ...”, #elassecompletam e me ajudam muito;

A Técnica de Laboratório **Esp. Leane Brunelle dos Santos Alves**, pelas dicas, auxílio durante experimentos e conversas boas durante os cafés que sempre foram bem vindos “... eita Leane esse café tem gosto de dipirona ...”;

A todos os colegas pesquisadores que compõem o **Laboratório de Cancerologia Experimental (LABCANCER-UFPI)** que estiveram presentes durante as varias fases desse trabalho: **Super ICs**: Amanda Goldinho, Carla Lorena, Lara Polyana, Débora Caroline, Ian Jhemes; **Mestrandas**: Lívia Queiroz, Nárcia Mariana; **Doutorandas**: Denise Barbosa, Kátia Machado, Viviane Amorim, Lívia Almeida; **Pós Doutorandos**: José Roberto e Amanda Almeida e os **Professores**: Dra. Joilane Alves Pereira Freire, Dra. Marcilia Pinheiro da Costa e Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira;

Aos **membros da banca**, que gentilmente aceitaram o convite para examinarem esta tese de doutorado;

Aos **professores dos Cursos de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) e Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPI**, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO)** ponto focal Piauí, pelo apoio e incentivo;

A todos os **funcionários da UFPI e terceirizados** que prestam serviços no **Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF-UFPI)**, pelas descontrações e constante auxílio;

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a conclusão deste trabalho;

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional;

A todos, meus sinceros agradecimentos!!!!

Jurandy do Nascimento Silva

Epígrafe

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve. A vida é muito bela para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

SILVA, J. N. **Mecanismos da ação antineoplásica e antinociceptiva de uma fração acetato de etila obtida da planta *Casearia sylvestris* em modelos experimentais de tumores murinos e humanos e de dor oncológica.** 2019. 186p. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO). Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina-Piauí.

RESUMO

A espécie *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) é uma planta, bastante utilizada na América do Sul, com diversas atividades farmacológicas atribuídas principalmente a metabólitos da classe dos terpenos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação antitumoral e antinociceptiva de uma fração acetato de etila rica em diterpenos clerodânicos (FC) e do composto Casearina X (Cas X) extraídos de *C. sylvestris* Sw.. Camundongos Swiss portadores do tumor S-180 foram tratados com FC e Cas X por 7 dias, via i.p. e oral por gavagem. Após o tratamento revelaram taxas de inibição tumoral significativa ($p < 0,05$), seguidas de alterações histopatológicas como degeneração vacuolar no fígado e autólise em tecidos renais. Estudos *ex vivo* sugerem a necroptose como o principal modo pelo qual é desencadeada a morte celular. Análises antiproliferativas em linhagens tumorais humanas (HCT-116 e SF-295) foram realizadas em camundongos imunodeficientes (CB-17 SCID e BALB/c Nude). No ensaio com fibra oca (*Hollow Fiber Assay*) a FC reduziu a proliferação de células neoplásicas em todas as doses testadas por ambas as vias (2,5 e 5 mg/kg/dia i.p. e 25 e 50 mg/kg/dia v.o.). No ensaio em modelo xenográfico houve redução significativa dos tumores de HCT-116 em animais tratados com FC via i.p e v.o., com ausência de alterações em órgãos e parâmetros hematológicos. Fotomicrografias de tumores revelaram áreas necróticas e lesões morfológicas reversíveis no fígado e rins de animais tratados com FC. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste de formalina foram utilizados para avaliar a ação antinociceptiva, já o teste com filamento de Von Frey foi utilizado para determinar a alodinia mecânica. No teste de contorções a FC apresentou efeito antinociceptivo significativo em camundongos sadios e acometidos pelo tumor S-180. Na fase neurogênica do teste de formalina a FC reduziu o tempo de lambertura de pata em todas as doses e vias testadas e na fase inflamatória apenas os animais tratados com doses de 25 e 50 mg/kg v.o. esse efeito foi observado de forma significativa. Na avaliação do envolvimento de vias específicas a ação antinociceptiva periférica da FC parece ter participação, dos sistemas opioidérgico e nitrérgico, já na fase inflamatória, sugerem a participação das duas vias anteriores acrescidas das vias GABAérgica e colinérgica. A FC também demonstrou inibição da alodinia mecânica em camundongos portadores do tumor S-180 em até 4 horas com ausência de alterações em parâmetros comportamentais e motores. Esses achados corroboram com o uso popular de *C. sylvestris* Sw. para fins terapêuticos como proposto pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sugerindo o desenvolvimento de um fitomedicamento com ação anticâncer e analgésica, tendo como base moléculas de diterpenos do tipo clerodânicos.

Palavras-chave: Diterpenos clerodânicos. Atividade antitumoral. *Hollow fiber assay*. Carcinoma de colon. Nocicepção.

SILVA, J. N. **Mechanisms of antineoplastic and antinociceptive action of a fraction of ethyl acetate obtained from the *Casearia sylvestris* plant in experimental models of murine and human tumors and oncological pain.** 2019. 186p. Thesis (Postgraduate Program in Biotechnology – RENORBIO). Supervisor: Prof. Ph.D. Paulo Michel Pinheiro Ferreira. Federal University of Piauí (UFPI). Teresina-Piauí.

ABSTRACT

The species *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) is a plant, widely used in South America, with diverse pharmacological activities attributed mainly to metabolites of the terpene class. This study aimed to evaluate the antitumor and antinociceptive action of a ethyl acetate fraction rich in clerodic diterpenes (FC) and Casearine X (Cas X) extracted from *C. sylvestris* Sw.. S-180 tumor bearing Swiss mice were treated with FC and Cas X for 7 days, i.p. and oral by gavage. After treatment they showed significant tumor inhibition rates ($p < 0.05$), followed by histopathological changes such as vacuolar degeneration in the liver and autolysis in renal tissues. *Ex vivo* studies suggest necroptosis as the main mode by which cell death is triggered. Antiproliferative analyzes in human tumor lines (HCT-116 and SF-295) were performed in immunodeficient mice (CB-17 SCID and BALB/c Nude). In the Hollow Fiber Assay assay, FC reduced the proliferation of neoplastic cells at all doses tested by both pathways (2.5 and 5 mg/kg/day i.p. and 25 and 50 mg/kg/day o.v.). In the xenographic model, there was a significant reduction of HCT-116 tumors in animals treated with FC via i.p. and o.v., with no alterations in organs and haematological parameters. Photomicrographs of thyroids revealed necrotic areas and reversible morphological lesions in the liver and kidneys of FC treated animals. Abdominal writhing tests induced by acetic acid and the formalin test were used to evaluate antinociceptive action, whereas the Von Frey filament test was used to determine mechanical allodynia. In the contortion test the FC presented significant antinociceptive effect in healthy mice and affected by the S-180 tumor. In the neurogenic phase of the formalin test the FC reduced the paw licking time at all doses and routes tested and in the inflammatory phase only animals treated at doses of 25 and 50 mg/kg o.v. this effect was observed in a significant way. In the evaluation of the involvement of specific pathways the peripheral antinociceptive action of the FC seems to have participation, from the opioidergic and nitrergic systems, already in the inflammatory phase, suggest the participation of the two anterior pathways plus the GABAergic and cholinergic pathways. The FC also demonstrated inhibition of mechanical allodynia in S-180 tumor bearing mice within 4 hours without changes in behavioral and motor parameters. These findings corroborate the popular use of *C. sylvestris* Sw. For therapeutic purposes as proposed by the Unified Health System (SUS), suggesting the development of a phytomedication with anticancer and analgesic action, based on diterpene molecules of the clerodan type.

Keywords: Clerodanic diterpenes. Antitumor activity. Hollow fiber assay. Colon carcinoma. Nociception.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
INTRODUÇÃO	
Figura 1 - Organograma da Tese.....	28
REFERENCIAL TEÓRICO	
Figura 1 - Fatores envolvidos na carcinogênese.....	36
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimado para 2018 por sexo.....	38
Figura 3 - Escada analgésica proposta pela OMS.....	40
Figura 4 - Modulação terapêutica nos diferentes estágios de processamento da dor.....	44
Figura 5 - Alguns compostos utilizados no tratamento do câncer derivados de produtos naturais.....	50
Figura 6 - Moléculas dos análogos semi-sintéticos de camptotecina com atividade antitumoral.....	51
Figura 7 - Estrutura molecular base dos diterpenos clerodânicos.....	56
CAPÍTULO I	
GRÁFICO RESUMO.....	74
Figura 1 - Estrutura molecular dos diterpenos clerodânicos.....	79
Figura 2 - Fotomicrografia mostrando aspectos morfológicos do tumor Sarcoma 180 em camundongos Swiss após 7 dias de tratamento com uma Fração com Casearinas extraída de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	86
Figura 3 – Fotomicrografia em tecido hepático de camundongos tratados com Casearina X isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	87
Figura 4 - Fotomicrografia de tecido renal de camundongos tratados com Casearin X isolada das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	89
Figura 5 - Efeitos da fração com casearinas (FC) em culturas primária de células Sarcoma 180 <i>ex vivo</i> após exposição de 24 h e análise por citometria de fluxo.....	92
Figura 6 - Sobrevida de camundongos portadores do tumor murino S-180.....	93
CAPÍTULO II	
GRÁFICO RESUMO.....	105

Figura 1 - Fotomicrografia evidenciando células de carcinoma de colón humano (HCT-116) inoculadas em camundongos CB-17 SCID após 15 dias de tratamento com uma fração com casearinas.....	119
Figura 2 - Fotomicrografia de tecido hepático de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com casearinas.....	120
Figura 3 - Fotomicrografia de tecido hepático de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com casearinas, coradas com PAS.....	121
Figura 4 - Fotomicrografia de tecido renal de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com casearinas.....	122

CAPÍTULO III

GRÁFICO RESUMO.....	133
Figura 1 - Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	138
Figura 2 - Animal lambendo e/ou mordendo a pata durante o teste formalina.....	139
Figura 3 - Gaiola de observação espelhada utilizada para monitorar os animais durante o teste de formalina.....	140
Figura 4 - Indução intraplantar do tumor S-180 em camundongos saudáveis.....	141
Figura 5 - Determinação do volume da pata em pletismômetro digital.....	142
Figura 6 - Teste do campo aberto com camundongos.....	143
Figura 7 - Aparelho de <i>Rota-Rod</i> para camundongos.....	144
Figura 8 - Plataforma de avaliação no teste de Von Frey.....	145
Figura 9 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético após administração em dose única.....	146
FIGURA 10 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético após 7 dias de administração.....	147
Figura 11 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz no modelo de dor induzida por formalina após administração em dose única.....	148
Figura 12 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz no modelo de dor induzida por formalina durante a 1ª fase (neurogênica) na dose de 50 mg/kg via oral por gavagem.....	150
Figura 13 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz no modelo de dor induzida por formalina durante a 2ª fase (inflamatória) na dose de 50 mg/kg via oral por	151

gavagem.....	
Figura 14 - Camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 na região intraplantar após 14 dias da indução e tratados nesse mesmo dia com a fração com casearinas extraída das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	152
Figura 15 – Limiar nociceptivo mecânico em animais transplantados com o tumor S-180 na pata, avaliado pelo aparelho Von Frey após tratamento agudo com uma dose da fração com casearinas.....	153
Figura 16 - Efeito do tratamento com a fração com casearinas em diferentes parâmetros avaliados pelo teste do campo aberto.....	154
Figura 17 - Efeito da fração rica em casearinas sobre a atividade locomotora no teste do <i>Rota-Rod</i> em camundongos com o tumor S-180 na pata.....	155

LISTA DE TABELAS

Pág.

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Efeito de uma fração com Casearinas (FC) e de Casearina X (Cas X) extraídas de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> no peso relativo úmido de órgãos-chave e no crescimento tumoral em camundongos Swiss portadores de Sarcoma 180 após 7 dias de tratamento intraperitoneal ou oral.....	84
Tabela 2 - Perfil das células brancas do sangue periférico de camundongos Swiss portadores de Sarcoma 180 após tratamento intraperitoneal ou oral durante 7 dias com a fração com casearina extraída de folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	91

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Ação antitumoral da fração com casearinas (FC) extraída de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> em células de glioblastoma humano (SF-295) e carcinoma de cólon (HCT-116) determinada pelo ensaio <i>in vivo</i> com fibra oca (HFA).....	114
Tabela 2 - Efeito da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> sobre a massa tumoral em camundongos transplantados com carcinoma de cólon (HCT-116) após 15 dias de tratamento.....	115
Tabela 3 - Efeito da fração com casearinas (FC) obtidas das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> no peso relativo úmido de órgãos-chave e no peso de camundongos CB-17 SCID transplantados com carcinoma de cólon (HCT-116) após 15 dias de tratamento.....	116
Tabela 4 - Efeito da fração casearina sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos CB-17 SCID após 15 dias de tratamento.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluoruracil
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais.
ANOPs	Analgésicos não-opioides
ANOVA	Análise de variância
Cas F	Casearini F
CAS X	Casearina X
CDKs	Quinases dependentes de ciclina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
CIS	Comissões Interinstitucionais de Saúde
CN	Controle negativo
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSCs	Células tronco cancerígenas
DDR	Dano ao DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EOCS	Óleo essencial das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>
FC	Fração acetato de etila enriquecida com Casearinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCE-CS	Extrato hidroalcoólico bruto das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>
HE	Hematoxilina/Eosina
HFA	<i>Hollow Fibre Assay</i> (Ensaio com fibra oca)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
i.p.	Administração via intraperitoneal
i.pl.	Administração via intraplantar
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> (Associação Internacional de Estudos da Dor)
IGDE	Isobutil galato-3,5-dimetil éter
INCA	Instituto Nacional de Câncer
L-NAME	N _ω -nitro-L-arginina-metil-éster
MGDE	Metil galato-3,5-dimetil éter
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium

NCI-US	<i>National Cancer Institute of United States</i> (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
nm	nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
NuBBE	Núcleo de Bioensaios e Biofisiologia de Produtos Naturais
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> (Ácido periódico-schiff)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de proteínas)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PGE2	Prostaglandina E2
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RENISUS	Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Instituto Memorial Roswell Park)
S-180	Sarcoma 180
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
E.P.M.	Erro Padrão da Média
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	26
Referências	29
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Geral.....	33
2.2 Específicos.....	33
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	35
3.1 Aspectos Gerais da Biologia Tumoral.....	35
3.2 Epidemiologia.....	37
3.3 Dor Oncológica.....	39
3.4 Abordagens Terapêuticas no Tratamento do Câncer.....	45
3.5 Produtos Naturais e a Descoberta de Novas Moléculas Anticâncer.....	48
3.6 Espécie Vegetal de Interesse - <i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	54
Referências.....	56
CAPÍTULO I. Atividade antiproliferativa da fração com casearinas em células tumorais murinas.....	73
Gráfico Resumo.....	74
Resumo.....	75
Abstract.....	76
1 Introdução.....	77
2 Materiais e Métodos.....	78
2.1 Isolamento do composto e identificação estrutural.....	78
2.2 Produtos químicos.....	79
2.3 Animais.....	79
2.4 Análise da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	80
2.5 Análise por citometria de fluxo em células de Sarcoma 180.....	81
2.5.1 Integridade da membrana.....	81
2.5.2 Fragmentação de DNA.....	81
2.5.3 Potencial transmembrana mitocondrial.....	82
2.6 Ensaio de relaxamento de DNA.....	82
2.7 Sobrevida de camundongos portadores do tumor S-180.....	82
2.8 Análises estatísticas.....	82
3. Resultados.....	83
3.1 Atividade <i>in vivo</i> contra o tumor Sarcoma 180.....	83
3.1.1 Exames macroscópicos e microscópicos.....	85

3.1.2 Perfil dos glóbulos brancos do sangue periférico.....	89
3.1.3 Alterações fenotípicas em células de S-180.....	92
3.1.4 Relaxamento de DNA.....	92
3.1.5 Sobrevida.....	93
4 Discussão.....	93
5 Conclusão.....	97
Referências	98

CAPÍTULO II. Ação antineoplásica da fração acetato de etila obtida de *Casearia sylvestris* em modelos xenográficos de tumores sólidos..... 104

Gráfico Resumo.....	105
Resumo.....	106
Abstract.....	107
1 Introdução.....	108
2 Materiais e Métodos.....	109
2.1 Amostra vegetal.....	109
2.2 Animais.....	110
2.3 Ensaio Antitumoral com Fibra Oca - <i>Hollow Fiber Assay</i> (HFA).....	110
2.4 Avaliação Antiproliferativa em Modelo Xenográfico.....	111
2.5 Análises Estatística.....	113
3 Resultados.....	113
3.1 Ação antiproliferativa em células tumorais humanas em fibra oca (HFA).....	113
3.2 Atividade antitumoral em modelo xenográfico de carcinoma de colón humano.....	115
3.2.1 Avaliação de parâmetros fisiológicos sistêmicos.....	115
4 Discussão.....	122
5 Conclusão.....	126
Referências	127

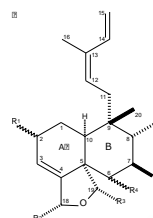
CAPÍTULO III. Ação antinociceptiva de uma fração rica em diterpenos clerodânicos..... 132

Gráfico Resumo.....	133
Resumo.....	134
Abstract.....	135
1 Introdução.....	136
2 Materiais e Métodos.....	137
2.1 Amostra vegetal.....	137
2.2 Animais.....	137
2.3 Atividade antinociceptiva.....	138
2.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	138

2.3.2 Teste de lambedura de pata induzida por formalina.....	139
2.4 Desenvolvimento de protocolo de dor oncológica induzida por Sarcoma 180 e avaliações comportamentais associadas.....	141
2.4.1 Volume tumoral na pata.....	142
2.4.2 Atividade exploratória.....	142
2.4.3 Coordenação motora.....	143
2.4.4 Avaliação nociceptiva mecânica (Von Frey).....	144
2.5 Análises Estatísticas.....	145
3 Resultados.....	145
3.1 Redução da nocicepção induzida por ácido acético.....	145
3.2 Redução da nocicepção induzida por formalina.....	147
3.3 Efeito antinocicpetivo pós-implantação de células do tumor S-180 na região intraplantar.....	151
3.3.1 Volume tumoral na pata.....	151
3.3.2 Efeito antialodínico demonstrado com filamentos de Von Frey.....	152
3.3.3 Alterações comportamentais e motoras.....	153
3.3.3.1 Teste campo aberto.....	153
3.3.3.2 Teste de <i>Rota-Rod</i>	155
4 Discussão.....	155
5 Conclusão.....	162
Referências.....	163
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	172
ANEXOS.....	173
ANEXO A - Comprovante de registro para coleta da <i>Casearia sylvestris</i> no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.....	174
ANEXO B - Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí.....	175
ANEXO C - Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).....	176
APÊNDICES.....	177
APÊNDICE A - Artigo publicado no <i>Journal of Ethnopharmacology</i> - “Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from <i>Casearia sylvestris</i> and its component Casearin X: <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> methods and microscopy examinations”.....	178
APÊNDICE B - Artigo submetido ao Journal: Toxicology Letters. “Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS)”.....	189



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O câncer corresponde a um grande e distinto grupo de doenças genéticas caracterizadas por um processo de vários estágios, resultando em uma divisão descontrolada e abrupta das células. É também considerado um sistema evolutivo, dinâmico e heterogêneo, explicando, pelo menos em parte, a dificuldade do seu tratamento e justificando o uso de diferentes terapias. A incidência de casos de cânceres tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, sendo considerada uma das principais causas de mortalidade na atualidade. Assim, do ponto de vista da saúde pública, essa doença representa a segunda causa de morte no mundo, onde na grande maioria dos casos, o tratamento tem caráter paliativo e/ou de baixa eficácia (GUERRA et al., 2005; FLOOR et al., 2012; RYUNO et al., 2017; SILVA et al., 2017; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ et al., 2018; SECA, PINTO, 2018, SIEGEL et al., 2018).

No Brasil, essa problemática vem ganhando relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, o tema conquista cada vez mais espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas governamentais. Como exemplo, o Ministério da Saúde brasileiro vê na investigação das propriedades terapêuticas de plantas medicinais uma de suas prioridades e implantou a fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) (SILVA et al., 2006, INCA, 2014).

Em todo o mundo as plantas têm sido um dos pilares da quimioterapia nos últimos 30 anos. Como exemplos temos os alcaloides da vinca, os taxanos e as camptotecinas, derivadas das plantas *Catharantus roseus* (L.) G. Don., *Taxus brevifolia* Nutt. e *Camptotheca acuminata* Decne., respectivamente. Porém, a grande heterogeneidade das células tumorais dificulta o tratamento e facilita a manifestação de resistência, fatores que estimulam a pesquisa por novos quimioterápicos (MANS et al., 2000; MANN, 2002; COSTA-LOTUFO et al., 2010; FREIRE, ALVES, 2014; FERREIRA-SILVA et al., 2017).

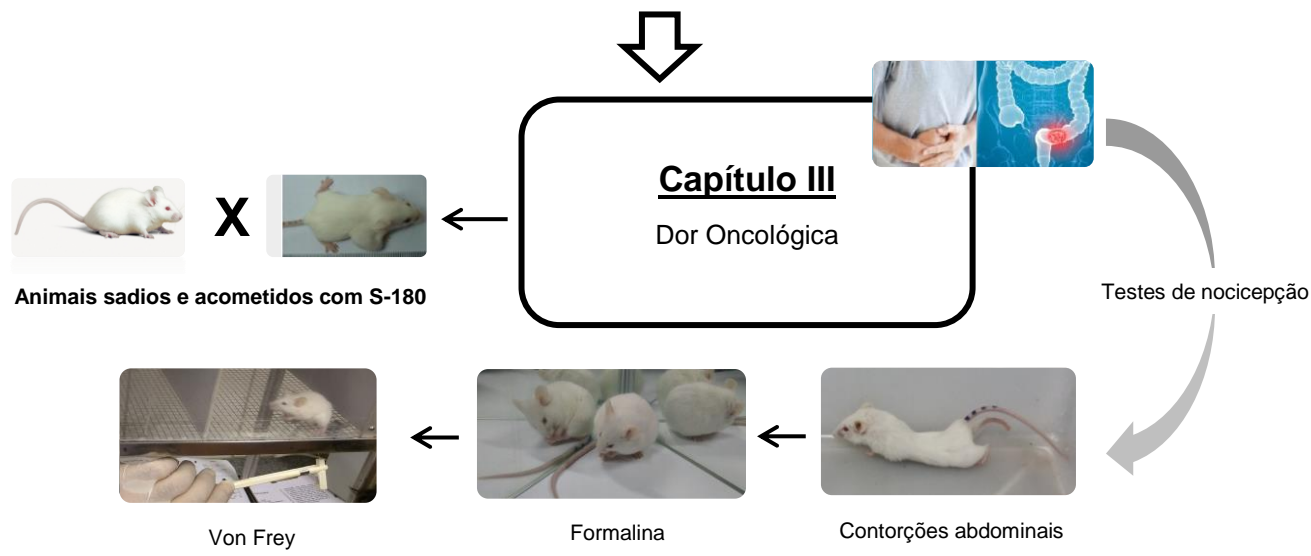
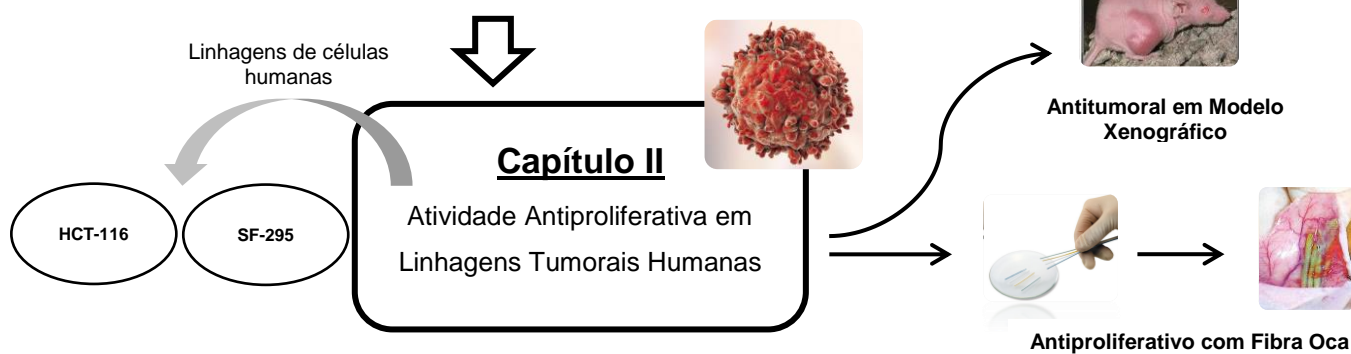
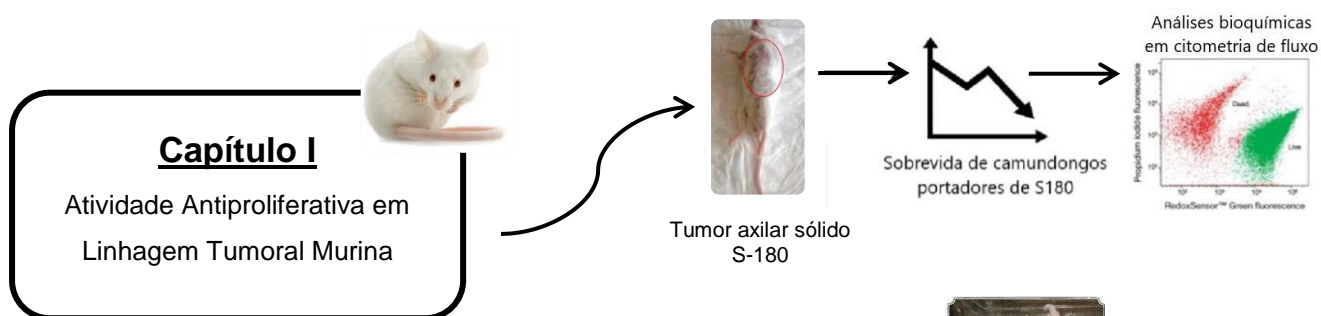
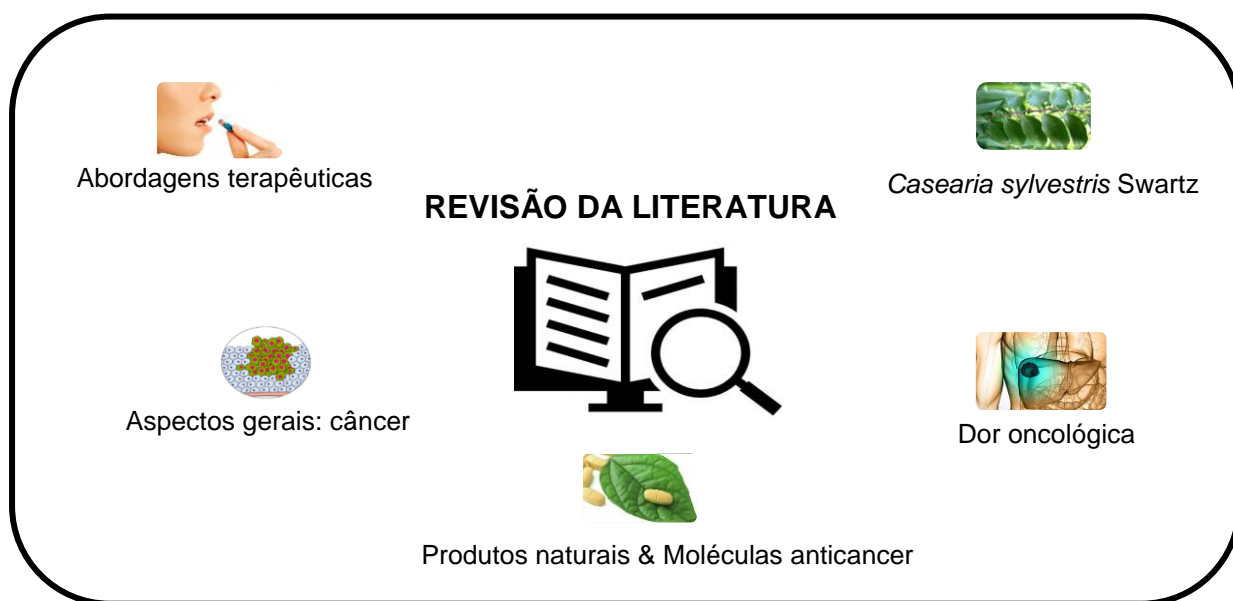
Nesse contexto, a espécie vegetal *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae), comumente presente em regiões tropicais e intertropicais do

Brasil e da América do Sul. Popularmente conhecida como "guaçatonga", "cafezinho-do-mato", "café-bravo", "erva-de-lagarto", "mata-gado" dentre outros nomes. Conforme a região em que ocorre. É amplamente utilizada na medicina popular brasileira para tratar várias enfermidades, como infecções, inflamações e mordidas de cobra (CARVALHO, 2007; BOU et al., 2013; FELIPE et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015).

É importante mencionar que a espécie vegetal de interesse nesse estudo (*C. sylvestris* Sw.), devido à sua relevância etnofarmacológica, está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema de Saúde Pública Brasileira (RENISUS), que é um relatório publicado pelo Ministério da Saúde que inclui 71 espécies de plantas medicinais com potencial para gerar produtos farmacêuticos de interesse ao Sistema de Saúde Pública no Brasil (Brasil, 2009). Os muitos estudos relacionados ao perfil químico e biológico dessa planta demonstram que a maioria das suas atividades farmacológicas está atrelada a presença de diterpenos clerodânicos também conhecidos como "Casearinas", presentes principalmente nas folhas (ITOKAWA et al., 1990; FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; FELIPE et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Diante do exposto e considerando a necessidade de novos compostos que possam melhorar as terapias convencionais já existentes, bem como fornecer novos agentes citotóxicos para o tratamento do câncer, o presente estudo visou avaliar o efeito tóxico e citotóxico em linhagens de células cancerígenas de origem murina e humana, procurando elucidar seu mecanismo de ação em nível celular, bem como sua atividade antinociceptiva induzida por uma fração acetato de etila rica em diterpenos clerodânicos (Casearinas) (**Figura 1**).

Figura 1 - Organograma da tese



REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. J.; OLIVEIRA, G. A.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.3, p.791-1803, 2015.

BOU, D. D.; LAGO, J. H.; FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; GUADAGNIN, R. C.; SOARES, M. G.; SARTORELLI, P. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound α -zingiberene and derivatives. **Molecules**, v.8, n.8, p. 9477-9487, 2013.

BRASIL, 2009. RENISUS: **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Espécies vegetais. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

CARVALHO, P. E. R. **Cafezeiro-do-Mato *Casearia sylvestris***. Comunicado Técnico 138, Embrapa, Colombo, 16p.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; SILVA, F. O.; BÜCKER, N. F.; FARIAS, M. S.; CASTRO, L. S.; SOUZA GRINEVICIUS, V. M.; MOTTA, N. S.; CORREIA, J. F.; ROSSI, M. H.; PEDROSA, R. C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.3, p. 1492-1499, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, n.3, p.497-504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C.; LIMA, D. J.; COSTA, N. D.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v.222, n.1, p.112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v.186, n.1, p. 270-279, 2016.

FERREIRA-SILVA, G. Á.; LAGES, C. C.; SARTORELLI, P.; HASEGAWA, F. R.; SOARES, M. G.; IONTA, M. Casearin D inhibits ERK phosphorylation and

induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicol In Vitro**, v.38, n.1, p. 27-32, 2017.

FLOOR, S. L.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C.; RASPE, E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in Molecular Medicine**, v.18, n.9, p. 509-515, 2012.

FREIRE, L. H. M. S.; ALVES, F. Ação de extratos naturais sobre o câncer. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 4, n. 8, p. 7-14, 2014.

GUERRA, M. R.; Gallo, C. V. M.; Mendonça, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, A. G.; JUÁREZ-PORTILLA, C.; OLIVARES-BAÑUELOS, T.; ZEPEDA, R. C. Anticancer activity of seaweeds. **Drug Discovery Today**, v.23, n.2, p. 434-447, 2018.

INCA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126 p.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, n.2, p. 143-148, 2002.

MANS, D. R.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v.5, n.3, p. 185-198, 2000.

RYUNO, H.; NAGURO, I.; KAMIYAMA, M. ASK family and cancer. **Advances in Biological Regulation**. v. 66, n. 1, p. 72-84, 2017.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.1, p. 1-22, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 455-62, 2006.

SILVA, R. M.; VERJEE, S.; GAITANI, C. M.; OLIVEIRA, A. R. M.; BUENO, P. C. P.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of the Intestinal Absorption Mechanism of Casearin X in Caco-2 Cells with Modified Carboxylesterase Activity. **Journal of Natural Products**, v.79, n.4, p.1084-1090, 2016.

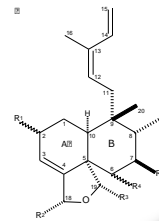
SILVA, G. A. F.; LAGES, C. C. L.; SARTORELLI, P.; HASEGAWA, F. R.; SOARES, M. G.; LONTA, M. Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v.38, n.1, p. 27-32, 2017.

TIRLONI, C. A. S.; TRAESEL, G. K.; LÍVERO, F. A. R.; NETO, S. D. V.; FARIA JUNIOR, R.; PAIM, T. C.; SANTOS, J. A.; OESTERREICH, S. A.; SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. C.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Short-term carcinogenesis evaluation of *Casearia sylvestris*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, n.5, p. 603-610, 2017.

WHO - World Health Organization. **Cancer: Fact Sheets**; WHO: Geneva, Switzerland, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (acessado em 15 de fevereiro de 2018).



OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

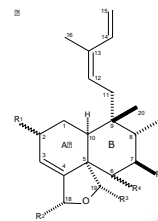
Avaliar a ação antitumoral e antinociceptiva da fração acetato de etila rica em diterpenos e do composto Casearina X extraídos das folhas de *Casearia sylvestris Swartz*.

2.2 Específicos

- Analisar a ação antitumoral de uma fração acetato de etila rica em casearinas (FC) e seu principal componente - Casearina X - no modelo tumoral murino Sarcoma 180;
- Investigar o mecanismo de ação antiproliferativa da FC por citometria de fluxo em células de Sarcoma 180 e o potencial de inibição das topoisomerases I e II em ensaios de relaxamento de DNA;
- Determinar alterações hematológicas e fisiológicas, verificando alterações teciduais em órgãos e tumores murinos;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vivo* da FC em linhagens tumorais humanas no ensaio de *Hollow Fiber* em camundongos imunodeficientes e em modelo xenográfico de carcinoma de cólon;
- Analisar o potencial antinociceptivo da FC em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Avaliar o mecanismo antinociceptivo da FC contra a nocicepção induzida por formalina usando bloqueadores farmacológicos;
- Desenvolver um protocolo pré-clínico de dor oncológica com o tumor experimental Sarcoma 180 para avaliar a hiperalgesia mecânica, atividade motora e comportamental.



REFERENCIAL TEÓRICO



3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Aspectos Gerais da Biologia Tumoral

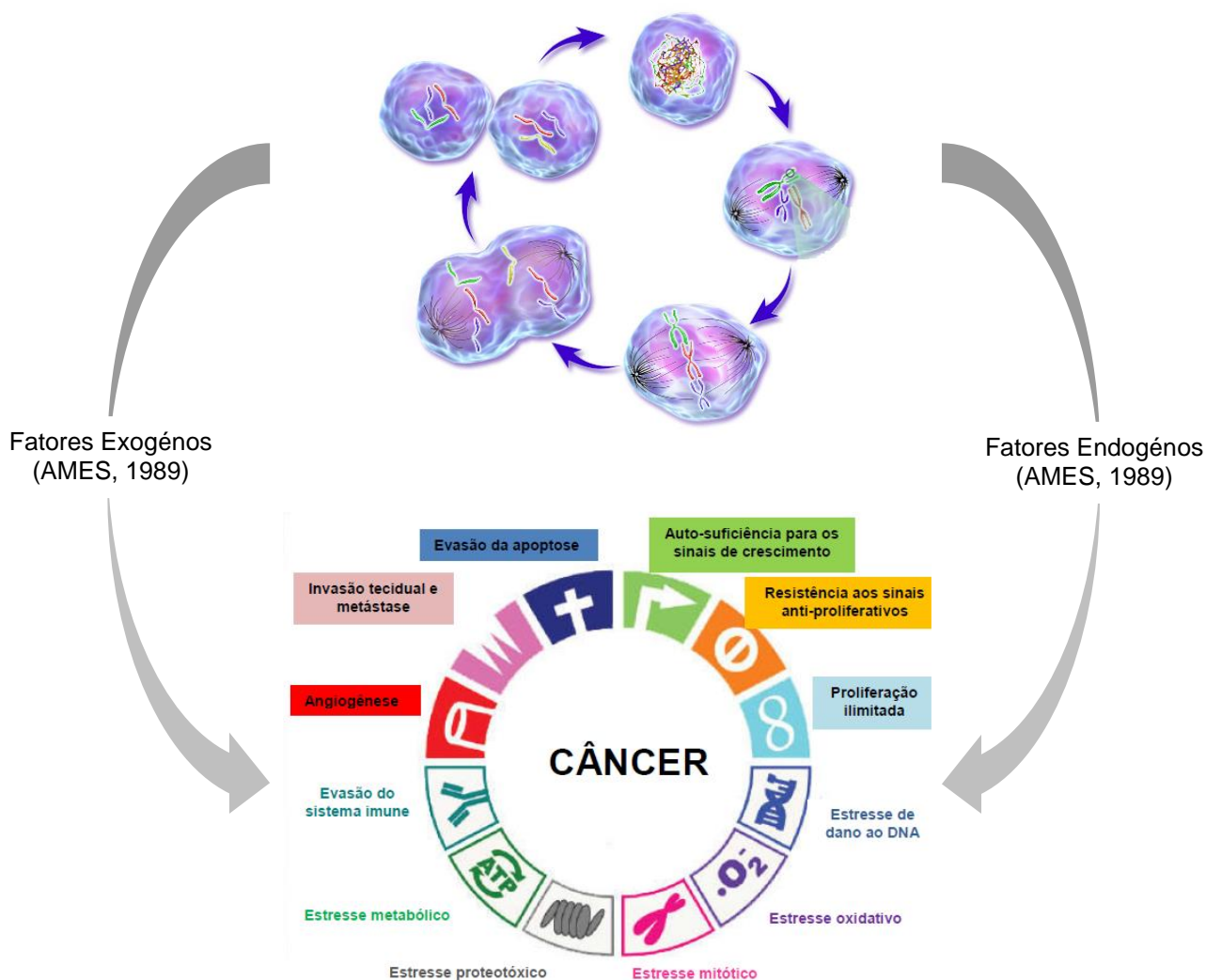
O câncer é uma doença caracterizada como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter proliferativo, mutacional, com crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de vários tipos presentes em um mesmo microambiente, geralmente se espalham pelos tecidos e órgãos adjacentes. Essa desordem é geralmente ocasionada por um acúmulo de mutações herdadas ou induzidas em oncogenes, genes supressores e em genes de reparo do DNA, o que caracteriza o câncer como uma doença genética. Além disso, sabe-se que essas mutações oncogênicas estão associadas à reprogramação metabólica da célula e influenciam coletivamente nas interações entre o tumor e seu microambiente (GRIVICICH et al., 2007; INCA, 2014; ROSKOSKI, 2014; FERREIRA, PESSOA, 2017; MIN, LEE, 2018).

Condições multifatoriais estão envolvidas na iniciação, promoção e/ou progressão da carcinogênese (GOMES-CARNEIRO et al., 1997). À medida que a carcinogênese progride, promove o acúmulo de erros no DNA e eventualmente, desencadeia a divisão de células alteradas, muitas vezes para microambientes distantes do seu local de origem caracterizando um processo denominado metástase (GUPTA, MASSAGUÉ, 2006; STEINBICHLER et al., 2017). Esses fatores podem agir em conjunto ou em sequência como, por exemplo, a dieta, predisposição genética e fatores ambientais, que favorecem o aparecimento de um número maior de casos de cânceres (PY, JACQUES, 2003; REDDY et al., 2003; INCA, 2014). Um dos fatores típicos e fundamentais para o aparecimento de novos casos de cânceres é sua instabilidade genômica, que está associada a uma maior propensão ao acúmulo de danos ao DNA (O'CONNOR, 2015; BASU, 2018).

Dentre os fatores celulares e/ou moleculares que favorecem a carcinogênese podemos citar: a) evasão da apoptose (MOHAMED et al., 2017); b) auto-suficiência para os sinais de crescimento (HANAHAN, WEINBERG, 2011); c) resistência antiproliferativa (NOGUCHI, 2017); d) proliferação ilimitada (KONDO, 2007); e) danos ao DNA (BASU, 2018); f) estresse oxidativo (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA et al., 2017); g) estresse

metabólico (GIULIANI, DASS, 2014); h) evasão do sistema imune (VINAY et al., 2015); i) angiogênese (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA et al. 2017) e j) invasão tecidual e metástase (HANAHAN, WEINBERG, 2011) (**Figura 1**).

Figura 1 - Fatores envolvidos na carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Luo et al. (2009) e Blaus (2016).

Outro ponto determinante para o entendimento da malignidade do câncer é a metástase, responsável aproximadamente por 90% de todas as mortes e que tem seu início a partir da disseminação de tumores primários (ALJOHANI et al., 2018). Esse processo ocorre em duas fases: a primeira que envolve a translocação física de uma célula cancerosa para um órgão distante, enquanto a segunda envolve a capacidade dessa célula cancerosa se transformar em uma lesão metastática nesse novo local para onde migrou

(CHAFFER; WEINBERG, 2011). Para que esse processo ocorra deve ser levado em consideração a dependência de suas interações com os fatores homeostáticos que promovem o crescimento de células tumorais, sobrevivência, angiogênese, invasão e a própria metástase (FIDLER, 2003). Nesse contexto, o aprofundamento de estudos científicos mais recentes tornou claro que células-tronco têm um papel fundamental não apenas na geração de novos organismos multicelulares complexos, mas também no desenvolvimento e evolução de tumores, metástase, recorrência e na resistência aos agentes quimioterápicos (MOHARIL et al., 2017). Esses achados apoiam o fato de que esse tipo celular é parte integrante do desenvolvimento e perpetuação de várias formas de cânceres (JORDAN et al., 2006; LÓPEZ-LÁZARO, 2018).

Entender essa parte da biologia subjacente à evolução do câncer é importante para reduzir a carga econômica e social dessa doença (LOBELLO et al., 2018; MIN, LEE, 2018).

3.2 Epidemiologia



O câncer está atualmente no centro das atenções por ser considerado a principal causa de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BARBOSA et al., 2015). No Brasil, assim como no resto do mundo, essa doença desencadeia altas taxas de mortalidade e elevados custos clínicos assistenciais. A magnitude dos agravos varia de acordo com a localização primária do tumor, o gênero do paciente e a região do país (BOING et al., 2007). A frequência de distribuição dos diferentes tipos de câncer apresenta-se variável em função das características de cada região, o que enfatiza a necessidade do estudo das variações geográficas nos padrões desta desordem, para seu adequado monitoramento e controle (GUERRA et al., 2005).

Segundo Barbosa et al. (2015), existem pronunciadas diferenças regionais e de sexo na mortalidade por câncer no Brasil, e que essas discrepâncias continuarão aumentando até o ano de 2030, quando a região Nordeste apresentará as maiores taxas de mortalidade por câncer. O acúmulo de genes mutantes em uma determinada população pode, também, justificar em parte o aumento nessa região, haja visto que a forte herdabilidade de muitos tipos de câncer (YOU, HENNEBERG, 2018). Oliveira et al. (2016)

corroboraram essa informação e especificam que as taxas de mortalidade por câncer de laringe aumentarão nas regiões Norte e Nordeste para os homens e nas regiões Nordeste e Sudeste para as mulheres.

Conforme estimativa informada pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva para os dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2018 (**Figura 2**), o câncer de próstata continua sendo o tipo mais incidente em homens (excluindo câncer de pele não melanoma), correspondendo mais do triplo do segundo mais frequente (traqueia, brônquios e pulmão). Já nas mulheres, essa percentagem se repete com o câncer de mama, o qual representa a segunda maior causa de morte entre as mulheres no mundo (INCA, 2017; ABOTALEB et al., 2018).

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimado para 2018 por sexo. Exceto pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%		
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%		
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Mulheres		Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%		
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%		
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%		
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%		
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%		
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%		
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%		
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%		

Fonte: INCA, 2017

Segundo Esserman et al. (2009) abordagens mais precisas no rastreio precoce do câncer de próstata e de mama justificam esse aumento no número de casos diagnosticados, o que tem possibilitado uma redução da morbidade e mortalidade associadas a esses tipos de câncer.

Conforme descrito por Braga et al. (2002) essas análises epidemiológicas levam em conta a incidência, mortalidade e sobrevivência e podem gerar tendências geográficas e temporais úteis para o planejamento e avaliação de intervenções a serem utilizadas por autoridades e profissionais de saúde. Pois em um país que enfrenta uma tendência de aumento na incidência do câncer, é fundamental melhorar ainda mais a triagem e incorporar novos medicamentos e dispositivos de controle dessa doença (WERUTSKY et al., 2019).

3.3 Dor Oncológica

Segundo a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável proveniente de uma lesão tecidual real ou potencial. Dependendo do seu mecanismo fisiopatológico, ela pode ser classificada em dor nociceptiva e neuropática (TWYCCROSS, 1997; ROCHA et al., 2007; PULEIO et al., 2018).

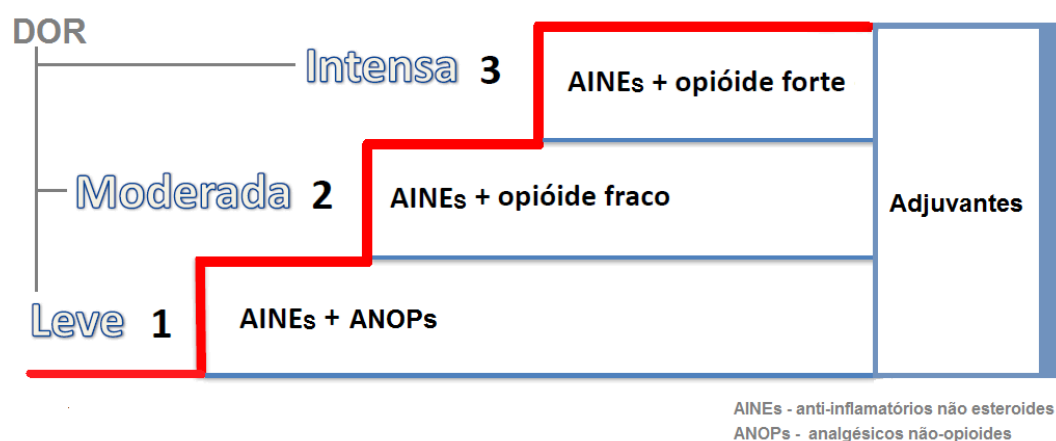
A dor é um sintoma muito frequente em doentes acometidos por câncer e é, seguramente, um dos principais fatores que comprometem a qualidade de vida desses pacientes e temor à sociedade moderna. Torna-se mais prevalente na doença avançada ou metastática e, muitas vezes, persiste apesar do tratamento e tem sido correlacionado com o aumento da morbidade, aumento da ansiedade e da depressão e redução na qualidade de vida. Há evidências de que a ansiedade desempenha um papel importante na modulação dessa dor, causando impacto severo na qualidade de vida por associação a inúmeras outras respostas psicossociais, exigindo, portanto, uma abordagem clínica e tratamento correto (AZEVEDO, 1996; ALMEIDA et al., 2005; CRUK, 2006; EVERDINGEN et al., 2016; GAMBETA et al., 2016; WOOD et al., 2018; SILVERMAN, GULATI, 2018). A população de sobreviventes que tiveram câncer está se expandindo rapidamente e muitos desses pacientes experimentam a dor como uma sequela causada pela própria doença ou como efeito direto do tumor e também pelo tratamento (BROWN, FARQUHAR-SMITH, 2017).

Embora a dor oncológica seja considerada um sintoma prevalente e comum e que muitas vezes persistem apesar do tratamento, estudos recentes sugerem que as terapias farmacológicas melhoraram durante a última década (GOUGH et al., 2014; EVERDINGEN et al., 2016; DELFINE et al., 2017). As opções para o tratamento farmacológico da dor são várias, estando disponíveis analgésicos, medicamentos não opióides, co-analgésicos e os opióides, sendo estes últimos mais utilizados no tratamento de pacientes com câncer (COSTA et al., 2007).

O método para alívio da dor do câncer proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), consiste em diretrizes para um tratamento em três etapas: anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), juntamente com analgésicos

não-opioides (ANOPs), AINEs juntamente com opióides fracos e depois AINEs juntamente com opióides fortes (**Figura 3**). Além disso, adjuvantes podem ser adicionados em qualquer etapa para tratar situações específicas, como dor óssea ou neuropática (VENTAFRIDDA et al., 1987; OMS, 1996; SCHUG, CHANDRASENA, 2015). No entanto, há poucas evidências de que a abordagem da OMS seja a melhor e, ainda, há vários pontos a serem debatidos sobre o tratamento da dor do câncer (NATOLI, LAZZARI, DAURI, 2015).

Figura 3 - Escada analgésica proposta pela OMS.



Fonte: Adaptada de OMS (1996).

Os AINEs são particularmente úteis no tratamento da dor relacionada a processos inflamatórios. Dentre eles podemos destacar o nefopam (NFP), ibuprofeno, piroxicam, tenoxicam, meloxicam, diclofenaco, paracetamol dentre outros que inibem a produção e o metabolismo das prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos por inibição da Ciclooxigenase (COX-1 e/ou -2), sendo os mais seletivos os inibidores da COX-2, como exemplo dessa classe de fármaco podemos destacar a indometacina, que pode apresentar uma atividade neuronal dependente da síntese de óxido nítrico. (DAVIES, WALLACE, 1996; MONTEIRO et al., 2008; WARREN-STOMBERG, BRATTWALL, JAKOBSSON, 2013; BELOEIL, 2015; LUCAS, 2016; MASEDA et al., 2019).

O uso adequado de analgésicos opióides, mesmo que orais, pode controlar 80% a 90% das dores causadas pelo câncer (GOUCKE; CHAUDAKSHETRIN, 2018). No entanto, apenas 6,7% dos opióides de uso

médico no mundo estão disponíveis em países subdesenvolvidos, embora tais fármacos sejam o pilar do tratamento médico da dor moderada a grave (REIS-PINA, et al., 2015). A rotatividade de uso dessas substâncias foi recentemente considerada uma opção terapêutica para pacientes com dor oncológica crônica (SCHUSTER et al., 2018).

Já entre os ditos opióides fracos destacamos a codeína e o tramadol. Segundo relatos de pesquisadores da *College of Physicians and Surgeons of British Columbia* (2016), existe uma escassez de evidências positivas para o uso dessa classe de opiáceos em relação ao tratamento da dor crônica como aquela sentida em pacientes com câncer. No entanto, a maioria das evidências e a própria OMS recomendam o uso desses fármacos no tratamento de dores moderadas (WIFFEN et al., 2017).

A eficácia da ação analgésica dos fármacos opióides está ligada principalmente a modulação de três receptores: μ (mu); κ (kappa) e δ (delta). Estes pertencem à grande superfamília de receptores acoplados à proteína G e são ativados tanto por peptídeos opióides produzidos endogenamente como por compostos opiáceos administrados exogenamente (WALDHOER, BARTLETT, WHISTLER, 2004; MARTINS et al., 2012).

Como exemplos da classe dos opióides fortes há o fentanil, comumente prescrito na clínica para pacientes oncológicos, tendo sua ação analgésica via receptores μ -opióides centrais e periféricos (SHINOHARA et al., 2018); a metadona, que se destaca como um opióide sintético eficaz no tratamento da dor nociceptiva e neuropática comumente coexistentes no câncer (HABASHY et al., 2018), e a morfina, que se destaca como um dos fármacos clinicamente mais eficazes para o tratamento paliativo da dor severa resultante do câncer (KHABBAZI et al., 2019). Para a morfina recomenda-se alternância em seu uso por outro opióide, caso haja ineficácia ou efeitos adversos durante o tratamento prolongado. Segundo Pergolizzi et al. (2008), os opióides da etapa III da escala analgésica são destinados aos pacientes com câncer e destaca a morfina como sendo a mais usada. Com base ainda em seu estudo, todos os opióides são considerados eficazes no tratamento da dor do câncer (embora somente partes da dor do câncer sejam sensíveis a essa classe de fármacos) (REDDY et al., 2014; SCHUG; CHANDRASENA, 2015;

COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS OF BRITISH COLUMBIA, 2016; REDDY et al., 2016).

Os opióides são considerados eficazes no tratamento da dor crônica não oncológica por até 3 meses e são bastante usados como analgésicos em pacientes com dor neuropática relacionada ao câncer (FALLON, 2013; MESKE et al., 2018). Porém, a terapia com essa classe de substância por períodos extensos tornou-se extremamente complexa, com conotações negativas relacionadas à escalada de abuso em seu uso, havendo também evidências crescentes de complicações como imunossupressão e risco de recorrência de câncer devido ao uso prolongado (HEBBES, 2016; MANCHIKANTI et al., 2018).

A morfina tem efeitos mediados, basicamente, por receptores μ -opioides, resultando em um aumento no limiar de estímulos dolorosos (BENYHE, 1994; ENRICO et al., 1998; AKÇA et al., 2002). Foi um dos primeiros medicamentos utilizados no tratamento da dor oncológica. Porém, seu uso em tratamentos prolongados, como no controle da dor do câncer, pode não promover um efeito analgésico pronunciado devido à tolerância adquirida e, como os demais opióides fortes, podem também acarretar uma maior incidência de efeitos adversos indesejados como: náuseas, constipação e disforia (NUNES et al., 2014, HEBBES, 2016; HENEKA et al., 2016, DAI et al., 2018).

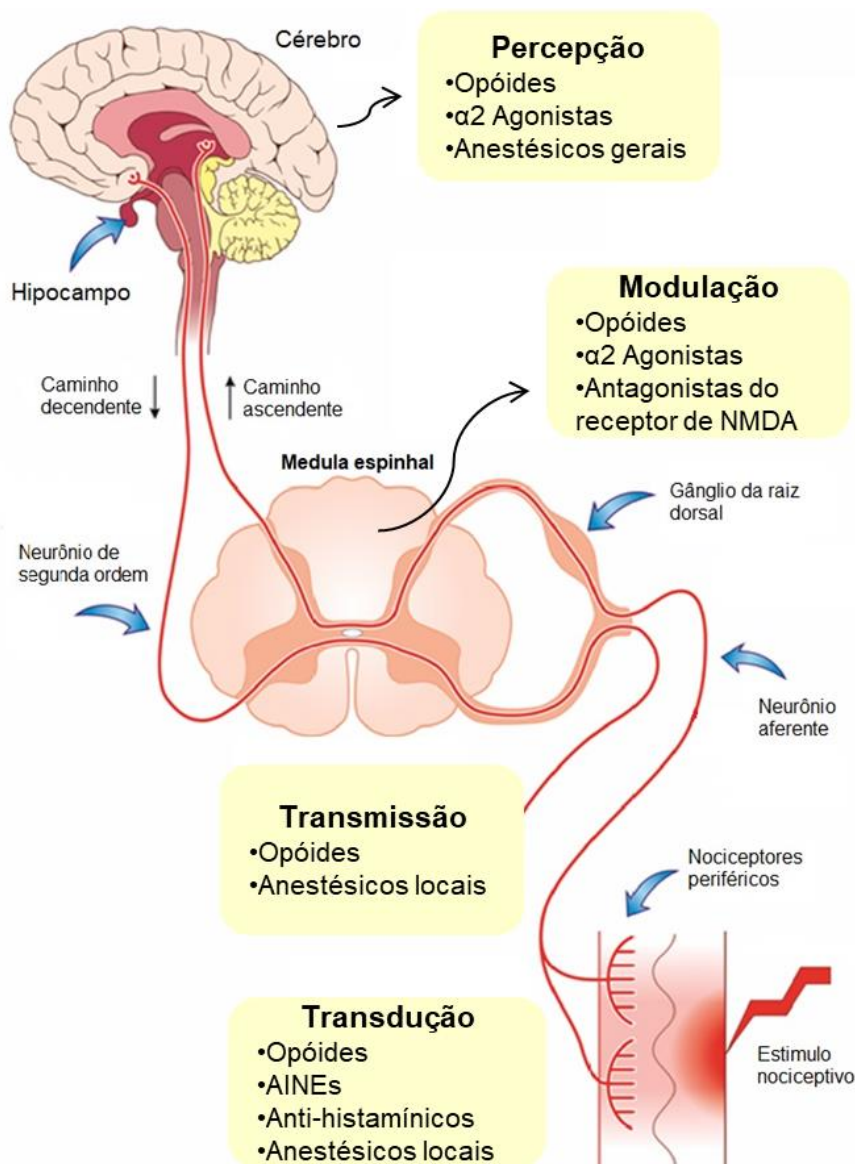
Apesar desses efeitos, os fármacos opióides, como a morfina, continuam sendo uma estratégia importante no manejo da dor oncológica em todo o mundo. Esses medicamentos agem modulando as vias ascendente e descendente e atuam em todos os estágios de processamento da dor, resultando em respostas analgésicas mais satisfatórias, tanto em nível periférico como central (**Figura 4**) (OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010).

No Brasil as prescrições médicas para uso desses medicamentos mostraram crescimento significativo, correspondendo a um aumento de produtos à base de codeína, oxicodona e fentanil em até 465% em apenas 6 anos (2009-2015). Esse fato tem preocupado especialistas e pesquisadores que recomendam um monitoramento mais eficaz por parte de autoridades e das agências reguladoras (KRAWCZYK et al., 2018). Nos Estados Unidos, estudos têm sugerido que o consumo e a prescrição alarmantes de opiáceos e

opioides levando ao uso inadequado, dependência e casos de overdose seriam responsáveis até mesmo por redução da expectativa de vida dos americanos de 78,9 para 78,7 anos. A última vez em que uma queda ocorrera fora em 1993, durante o auge da epidemia de AIDS. Enquanto isso, as taxas de mortalidade caíram em sete das dez principais causas de morte, incluindo doenças cardíacas, câncer, derrame e diabetes. (BBC, 2017).

Somente em 2016, overdoses relacionadas a opióides aumentaram 28%, matando 42.249 americanos, a maioria na faixa etária de 25 a 54 anos. Por trás do aumento dramático nas overdoses entre os usuários de heroína estão os opioides sintéticos, como o fentanil, que inundou o mercado americano e é 100 vezes mais poderoso que a heroína. Muitos usuários inadvertidamente injetam heroína que foi cortada com fentanil, deixando-os sem controle sobre a força do golpe que eles tomam.

Figura 4 - Modulação terapêutica nos diferentes estágios de processamento da dor. NMDA - N-metil D-Aspartato, AINEs - antiinflamatórios não esteroidais.



Fonte: Adaptado de Dureja et al. (2017).

Assim, torna-se imperativa a minimização dos riscos no uso contínuo de opióides e fornecer novas estratégias eficazes para o tratamento da dor crônica oncológica, sugerindo-se, inclusive, a necessidade de um modelo mais abrangente de tratamento da dor do câncer, terapias combinadas e intervenções apropriadas, adaptadas às necessidades de cada indivíduo, com o objetivo de otimizar o alívio da dor e minimizar os efeitos adversos (RAPHAEL et al., 2010).

3.4 Abordagens Terapêuticas no Tratamento do Câncer

O uso da quimioterapia para tratar o câncer começou no início do século 20, com tentativas de estreitar o universo de substâncias que poderiam ter efeitos promissores contra essa doença. Nesse período, vários agentes citotóxicos não seletivos foram os pilares nas terapias anticâncer por vários anos (DeVITA Jr, CHU, 2008; ZAROGOULIDIS et al., 2018).

Atualmente, a quimioprevenção do câncer tem sido reconhecida como uma importante estratégia profilática para reduzir o ônus causado por essa doença e devido a isso, vários novos agentes quimioterápicos têm sido desenvolvidos e/ou descobertos. Muitos desses fármacos foram aprovados de forma acelerada pela sua significativa eficácia, como por exemplo, o palbociclib que recebeu aprovação acelerada da FDA em 2015 como tratamento, em combinação com letrozol, para pacientes com câncer de mama (FINN et al., 2015; GIAVINA-BIANCHI et al., 2017; RATHER, BHAGAT, 2018).

Os quimioterápicos, sejam de origem natural ou sintética, podem ser divididos em três principais grupos, com base em seus modos e sítios de ação: antimetabólitos, agentes genotóxicos e inibidores do fuso mitótico (IGNEY, KRAMMER, 2002). Os antimetabólitos interrompem a síntese do ácido nucleico interferindo na produção de um dos principais metabolitos nucleotídicos ou substituindo o metabolito natural. A ação destes compostos inibe a função normal dos ácidos nucleicos e desencadeia o processo de apoptose (SCHOLAR, 2007; AVENDAÑO, MENÉNDEZ, 2015). Os agentes genotóxicos podem modificar a estrutura normal do material genético causando mutações cromossômicas e gênicas (MOREIRA, 2002). Já os anti-mitóticos inibem a divisão celular ou mitose, ligando-se à tubulina e inibindo sua polimerização em microtúbulos. Esses inibidores afetam mais as células cancerígenas do que as células normais, porque essas se dividem mais rapidamente, portanto, são mais suscetíveis à sua ação (PAIER et al., 2018).

Infelizmente, uma vez que as substâncias são naturalmente tóxicas, na maior parte dos casos, a quimioterapia convencional causa efeitos adversos severos, como anemia, diarreia, dor, fadiga, mudança de apetite, perda de cabelo, além da múltipla resistência adquirida quando usadas por um longo período. Dessa forma, os próprios agentes antineoplásicos podem também, em certas circunstâncias, se comportarem como carcintogênicos. Essa

resistência abriu o caminho para desenvolver novas moléculas semissintéticas ou sintéticas que operam por mecanismos específicos de forma mais seletiva contra células tumorais (BERNARDI et al., 2003; MADER, HOSKIN, 2006; SAJITH et al., 2015). O sucesso da quimioterapia pode ser conseguido aumentando simultaneamente a morte celular das células cancerosas e prevenindo os efeitos tóxicos sobre as células normais (LIANG; LEUNG; MOK, 2008; KHADRAOUI et al., 2016).

Numerosos estudos pré-clínicos têm sugerido a combinação de terapias para uma melhor resposta clínica no tratamento do câncer (WANG et al., 2018; BEIK et al., 2019; KRYEZIU et al., 2019; YU et al., 2019). A combinação da quimioterapia mais radioterapia, por exemplo, é bastante utilizada no Brasil e tem como objetivo melhorar a entrega local de medicamentos e reduzir efeitos adversos. Outro exemplo é a combinação da doxorubicina com outros quimioterápicos. A Dox como também é conhecida, é uma antraciclina muito requisitada para tratar carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireoide e ovário, sarcomas ósseos e dos tecidos mole, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms, leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloblástica aguda (LMA) (WU et al., 2017).

Terapias com quimioterápicos são projetadas para matar células cancerosas principalmente induzindo danos no DNA. É importante tirar proveito dessas anormalidades na maquinaria de células cancerígenas, fornecendo biomarcadores ou alvos para sensibilização (HOSOYA, MIYAGAWA, 2014). A instabilidade genética causada por danos no DNA e ineficiências no reparo dessas moléculas são eventos moleculares importantes para o diagnóstico e prognóstico de terapia anticâncer (PAZ et al., 2018).

Outra estratégia considerada promissora para o aumento sinérgico da eficácia anticâncer consiste em identificar dano às células cancerígenas induzidas por radioterapia, o que expõe antígenos tumorais específicos que as tornam visíveis à vigilância imunológica do organismo (imunoterapia), promovendo a iniciação e ativação de células T (citotóxicas). Juntas, essas terapias oferecem potencial para eliminar as metastases, reduzir o tempo de recorrência e melhorar a sobrevida (CUSHMAN et al., 2018; WANG et al., 2018). Assim a terapia direcionada a inibição da resposta ao dano do DNA

(DDR) em cânceres oferece um potencial para uma janela terapêutica maior (O'CONNOR, 2015).

Alguns protocolos em andamento que fazem uso combinado de diversos agentes antineoplásicos estão conseguindo resultados com índices surpreendentes de cura de até 90%. No entanto, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado e a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Embora seja uma modalidade de tratamento bem estabelecida, os erros durante o tratamento também representam um risco potencialmente grave aos pacientes. Esses erros afetam pelo menos 1-3% dos pacientes oncológicos adultos e pediátricos e ocorrem em todas as fases do tratamento (WEINGART et al., 2018).

Durante as últimas décadas, a biologia do câncer se concentrou na ideia de que o câncer é causado por alterações genéticas e que essa doença pode ser tratada revertendo ou direcionando essas alterações. Surgiu então a epigenética como uma das questões mais importantes na dissecação de mecanismos e alvos terapêuticos dessa doença, mostrando que o surgimento e a transformação maligna de vários tipos de cânceres são causados por expressão não natural de genes relacionados ao câncer atribuídos a erros epigenéticos (NAKADE et al., 2018).

Além da poliquimioterapia, que faz uso de dois ou mais agentes antitumorais e da combinação de terapias, a última década testemunhou um progresso significativo no tratamento do câncer com a introdução da terapia com células tronco cancerígenas (LI et al., 2007; ANNETT, ROBSON, 2018), da imunoterapia e da terapia hormonal, mais comumente usada em tratamentos de cânceres de mama, próstata e endométrio (YARDEN, CALDES, 2014; ELDER et al., 2018; FERREIRA et al., 2018) e o entendimento do metabolismo lipídico que está relacionado em vários processos durante o desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (LIU et al., 2017).

O detalhamento/conhecimento de características moleculares de cada tumor poderá permitir predição do seu comportamento, ajudando a delinear estratégias terapêuticas mais eficazes (WARD, 2002). Assim, entender as características moleculares do tumor e do paciente e estabelecer sua relação com os resultados dos medicamentos será a base para tratamentos

individualizados (RODRÍGUEZ-ANTONA, TARON, 2015; WILKES, 2018) baseados em genes, o que pode ter um grande impacto na mortalidade. Contra essa possibilidade há o enorme número e variabilidade de alterações genéticas e fenotípicas encontradas em tumores humanos cuja complexidade e heterogeneidade estão diretamente atreladas à terapêutica (LÓPEZ-LÁZARO, 2010; MARUSYK et al., 2012; RAMÓN et al., 2017).

Apesar de décadas de pesquisa, não existe ainda uma terapia curativa disponível para a maioria das formas disseminadas de câncer, de modo que a descoberta e o desenvolvimento de agentes quimioterápicos eficazes contra o câncer são constantemente necessários (LOMBARDI et al., 2018; THOTA, 2018), quase sempre associados a melhores ferramentas prognósticas e preditivas para identificar melhores intervenções terapêuticas mais adequadas (SOMARELLI et al., 2017). Essa nova era na pesquisa do câncer exigirá uma compreensão mais profunda da biologia e aplicação criativa de novos conhecimentos na clínica, bem como mudanças políticas, sociais e culturais (VARMUS, 2006).

3.5 Produtos Naturais e a Descoberta de Novas Moléculas Anticâncer

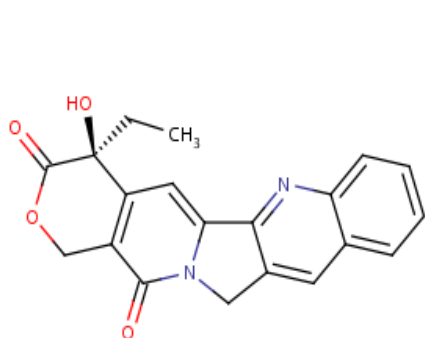
O conhecimento das propriedades medicinais das plantas tem sido o foco da investigação científica ao redor do mundo graças aos grandes avanços que a ciência tem proporcionado ao desenvolvimento da fitoquímica moderna e da química medicinal associado à chamada era pós-genômica (VALLI et al., 2012). Essas pesquisas permitem a descoberta de novos princípios ativos, ou ainda, a descoberta de novas atividades farmacológicas, aumentando a possibilidade de encontrar substâncias de interesse terapêutico (BUTLER, 2008; PASQUINI-NETTO et al., 2012).

A descoberta de medicamentos à base de plantas resultou principalmente no desenvolvimento de agentes anti-infecciosos e antitumorais e continua a contribuir para a entrada de novos compostos em ensaios clínicos (OLIVEIRA et al., 2010; SHAH et al., 2013).

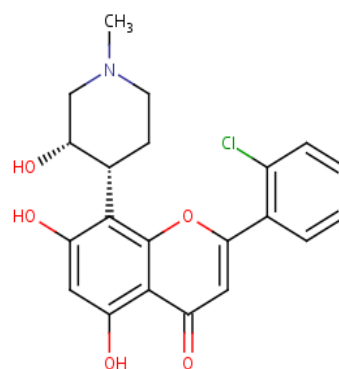
Ao longo da história, os produtos vegetais e seus análogos modificados têm sido ricas fontes de medicamentos antineoplásicos, desempenhando, assim, um papel importante na assistência farmacêutica. Através da bioprospecção de 114 mil extratos oriundos de aproximadamente 35 mil

espécies de plantas, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute of United States*, NCI-US) identificou importantes compostos antitumorais tais como paclitaxel, docetaxel, flavopiridol, vimblastina, vincristina, vindesina, camptotecina, irinotecano, etoposídeo e tenoposídeo (**Figura 5**) (DEWICK, 1996; WANG, 1998; SRIVASTAVA et al., 2005; NEWMAN; CRAGG, 2012; SHAH et al., 2013). Dados recentes da FDA mostraram que 40% das moléculas aprovadas são compostos naturais ou inspirados por eles, dos quais 74% são utilizados na terapia antineoplásico (SECA; PINTO, 2018).

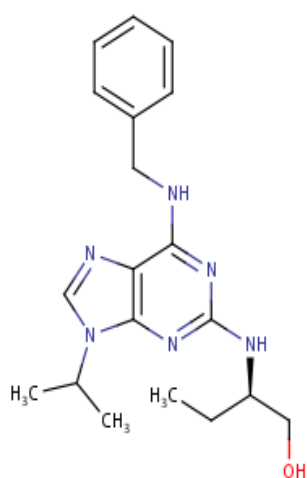
Figura 5 - Alguns compostos utilizados no tratamento do câncer derivados de produtos naturais.



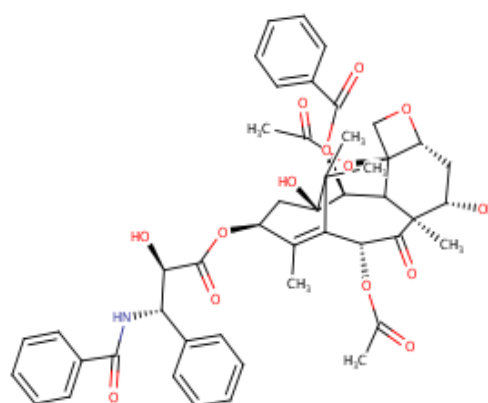
Camptotecina



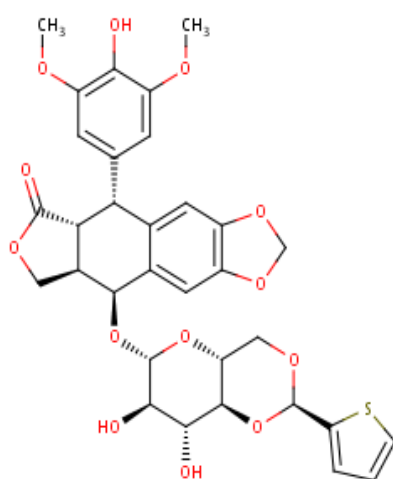
Flavopiridol



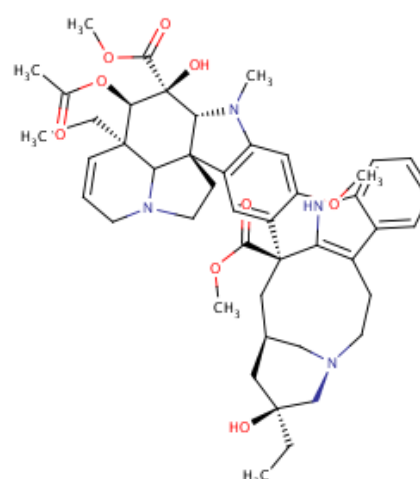
Roscovitine



Taxol



Teniposido



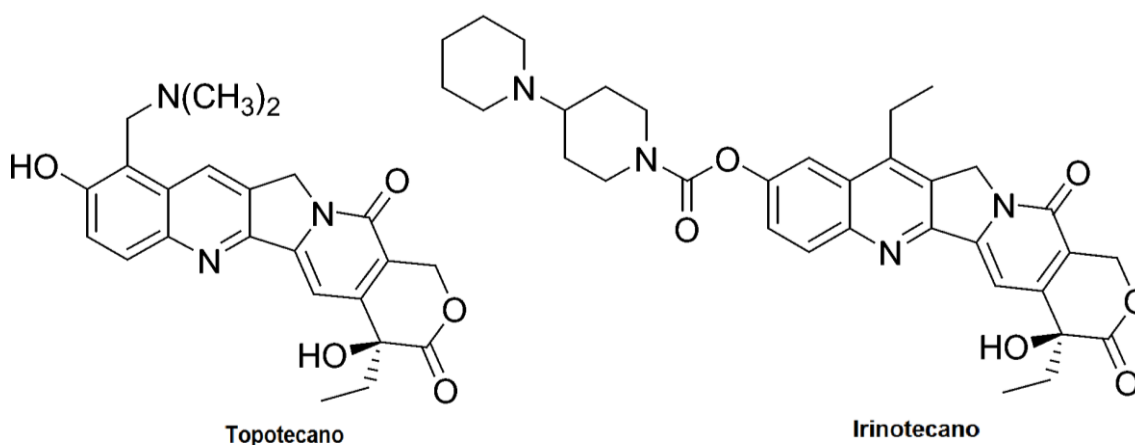
Vinblastina

Fonte: PDB (2018).

O século XX apresentou um avanço extraordinário na terapêutica antineoplásica e quimiopreventiva principalmente baseada em produtos naturais provenientes de plantas e microrganismos (CRAGG, NEWMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2007). Por outro lado, estudos recentes mostram que as aprovações anuais de novos fármacos têm se mantido em um nível constantemente baixo desde os anos de 1950, apesar de avanços tecnológicos. Em média, O custo atual para desenvolver um fármaco antineoplásico de conceito é cerca de US \$ 2,6 bilhões (STRATTON; NEWMAN; TAN, 2015).

O composto de origem natural camptotecina demonstrou promissora atividade antitumoral em ensaios clínicos preliminares, atuando como inibidor da síntese de ácidos nucleicos em células de mamíferos e um potente indutor de quebras das cadeias de DNA cromossômico, mas apresenta também baixa solubilidade e reações adversas a medicamentos. É um alcalóide isolado a partir da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*. Vários análogos semi-sintéticos da camptotecina têm demonstrado atividade antitumoral como o topotecano e irinotecano (**Figura 6**), que demonstraram ação contra carcinomas de mama, fígado e próstata (HSIANG et al., 1985; SRIVASTAVA et al., 2005; PDB, 2018).

Figura 6 - Moléculas dos análogos semi-sintéticos de camptotecina com atividade antitumoral.



Fonte: Adaptado de Mason e Bergman (2007).

Flavopiridol é um flavonóide sintético baseado originalmente em compostos purificados de *Dysoxylum binectariferum*, uma planta originária da Índia muito utilizada na medicina popular. Ele funciona inibindo quinases, e interferindo na divisão celular e causando apoptose. É investigado para tratamento de linfomas e de leucemia linfóide e cânceres de esôfago, pulmão e fígado (SEDLACEK et al., 1996; PDB, 2018).

Roscovitina é um derivado de olomucine, originalmente isolado a partir dos cotilédones do rabanete *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae), mas que agora é produzido sinteticamente. Este composto estimulou o interesse para tratamento do câncer em virtude da sua inibição da CDKs (quinases dependentes de ciclina) que desempenham um papel importante na progressão do ciclo celular (CRAGG; NEWMAN, 2005).

O Paclitaxel (Taxol[®]) é um diterpenóide complexo polioxigenado isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) indicado, atualmente, como primeira linha e posterior na terapia para o tratamento de carcinoma avançado de ovário, e outros cânceres, incluindo os de mama. Inicialmente, o paclitaxel mostrou resultados promissores nas fases I e II em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e foi aprovado pelo FDA para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER; VERMORKEN, 1998). Apesar de ter sido o fármaco mais vendido no ano de 2000, o paclitaxel apresenta baixa biodisponibilidade devido à baixa solubilidade em água (SCHIFF et al., 1979) e causa fortes náuseas, formigamento nos pés e mãos, leucopenia e trombocitopenia.

Alguns anos depois surgiu o Docetaxel (Taxotere[®]), um análogo estrutural com propriedades farmacológicas melhores que o taxol (atividade antitumoral e solubilidade aquosa), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão, embora cause supressão da medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos e alopecia (RINGEL; HORWITZ, 1991). Com solubilidade 1.800 vezes maior que o paclitaxel, a pró-droga Isotaxel surgiu como uma molécula inativa, mas após 12 min em pH fisiológico ocorre a conversão do isotaxel a taxol (HAYASHI et al., 2003). Já o Nab-paclitaxel (ABI-007; Abraxane[®]) é uma nova formulação do paclitaxel que dispensou o uso do cremofor como solvente, diminuiu os efeitos

adversos e aumentou a eficácia do tratamento, quando comparada ao paclitaxel e docetaxel (ISMAEL et al., 2008).

Há alguns anos foi relatada a presença do paclitaxel em uma espécie vegetal africana (*Dacrydioides gracilior* Pilger) pertencente à família Podocarpaceae, sendo o primeiro relato da presença deste composto em plantas fora da família Taxaceae (WANI et al., 1971; STAHLHUT et al., 1999; PDB, 2018).

O Tenoposideo é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, a principal substância ativa da resina de podofilina de *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi*. A podofilotoxina revelou capacidade em causar parada do ciclo celular na metáfase devido ao bloqueio irreversível da atividade catalítica da DNA topoisomerase II. O complexo molécula-DNA topoisomerase II induz quebras na cadeia dupla do DNA e impede a reparação por topoisomerase II. As quebras acumuladas no DNA evitam que as células entrem na fase mitótica do ciclo celular e conduzem à morte celular por apoptose. As moléculas podofilotoxina, tenoposideo e etoposideo tem mostrado atividade citotóxica e antitumoral experimental e são clinicamente aceitas para tratar tumores de Wilms, de pulmão, linfomas, leucemia aguda, pulmão, cérebro e contra vários cânceres genitourinários (ovário, bexiga e teratomas) (DIAS et al., 2006).

A Vimblastina é um alcalóide da vinca estruturalmente constituído por duas unidades semelhantes: vindolina e catarantina que teve suas propriedades antitumorais reconhecidas no final da década de 1960. Inicialmente, extratos da planta *Catharanthus roseus* foram investigados por suas propriedades hipoglicemiantes, mas foram observadas supressão da medula em ratos e efeitos antileucêmicos *in vitro*. Moléculas estruturalmente semelhantes, tais como a vindesina, vinorelbina e vincristina interferem na polimerização normal dos microtúbulos do fuso mitótico e do citoesqueleto e tem sido usadas no tratamento de tumores nos rins, testículos, cabeça e pescoço, coriocarcinomas, leucemia linfocítica aguda, pulmão e mama (SRIVASTAVA et al., 2005; PDB, 2018).

Por meio da compreensão dos mecanismos responsáveis pela progressão do câncer e da ação dos fármacos, algumas dessas moléculas citadas anteriormente foram descartadas por não apresentarem atividade satisfatória em testes clínicos, ou elevada toxicidade, e estão sendo novamente

investigadas e/ou modificadas quimicamente na tentativa de obtenção de protótipos mais adequados do ponto de vista da toxicidade, solubilidade em água e biodisponibilidade (BRANDÃO et al., 2010). Logo, a pesquisa por novas substâncias com potencial antitumoral é uma constante exigência e de grande importância para a saúde pública.

No Brasil, o reconhecimento da importância de plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e terapeuticamente mais eficazes foi finalmente e nacionalmente oficializado pelo lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto N° 5.813 em 22 de junho de 2006, a qual estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos e ao uso sustentável da Biodiversidade Brasileira (BRASIL, 2006), o que explica a explosão de estudos com produtos naturais nos últimos anos devido ao investimento em áreas estratégicas.

Análises criteriosas apontam um cenário com grande heterogeneidade e alta diversidade de espécies vegetais em biomas brasileiros como, por exemplo, o Caatinga e Amazônia (LEAL et al., 2003). A abundância de nichos e associações biológicas sugere também que exista uma grande quantidade de substâncias farmacologicamente ativas ainda pouco estudadas. Futuramente mesmo que moléculas isoladas não venham a se tornar fármacos, poderão ser utilizadas como protótipos e originarem compostos com utilidade clínica (MONTANARI; BOLZANI, 2001; FARIAS et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Mesmo assim, o mercado de medicamentos no Brasil é quase que completamente dependente da matéria-prima produzida por empresas estrangeiras multinacionais, as quais dominam o mercado farmacêutico (CALIXTO; SIQUEIRA Jr, 2008).

3.6 Espécie Vegetal de Interesse - *Casearia sylvestris* Swartz

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, com quase 19% da flora mundial e em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético tem, na atualidade, valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas

é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (GIULIETTI et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

Nesse contexto destaca-se a espécie *Casearia sylvestris* Swartz, família Salicaceae. No Brasil, existem cerca de 48 espécies do gênero *Casearia* em regiões subtropicais e tropicais do mundo, compreendendo cerca de 200 espécies. É uma planta medicinal usada na América do Sul, inclusive no Brasil, conhecida como “guaçatonga”, uma palavra originária do tupi-guarani, o que sugere seu remoto uso pelas comunidades indígenas. É também conhecida por outros nomes populares como: "erva-de-tiú", "cafezinho-do-mato", “erva-de-lagarto”, “língua-de-giú”, “café-bravo”, “corta-lengua” dentre outros conforme região. (HOEHNE, 1939; LITTLE, WADSWORTH, 1964; TORRES, YAMAMOTO, 1986; PEREIRA et al., 2017).

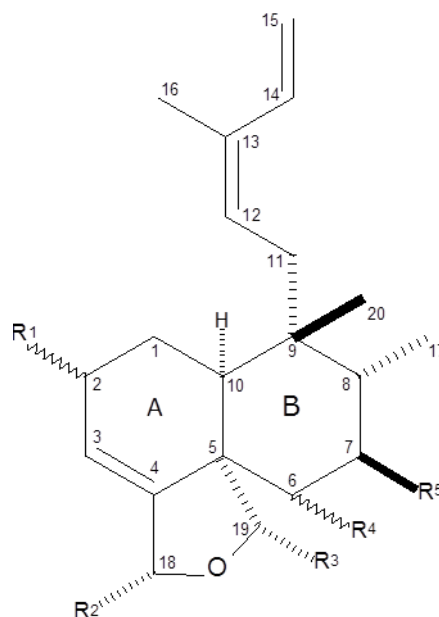
Existem muitos estudos relacionados ao perfil fitoquímico e ações farmacológicas atribuídas à espécie *C. sylvestris* Sw.. Dentre essas atividades podemos citar algumas atribuídas principalmente a metabólitos presentes nas folhas como: o efeito anti-hiperalgésico do extrato hidroalcolico (PIOVEZAN et al., 2017); atividade antifúngica do óleo essencial e fração enriquecida com sesquiterpenos (PEREIRA et al., 2017); efeito ansiolítico (ARAÚJO et al., 2017) da fração enriquecida com diterpenos clerodânicos; atividade anti-inflamatória e anti-bacteriana do extrato hidroalcolico (CAMPOS et al., 2015); atividade antioxidante *in vitro* da fração enriquecida de diterpenos clerodânicos (ARAÚJO et al., 2015; ESPINOSA et al., 2015); atividade leishmanicida do extrato metanólico (ANTINARELLI et al., 2015); atividade antimicrobiana e efeito hipolipemiante do extrato etanólico (ESPINOSA et al., 2015).

Na última década, nosso grupo de pesquisa tem revelado a potencialidade farmacológica *in vitro* e *in vivo* da fração rica em diterpenos clerodânicos obtidas das folhas de *C. sylvestris* Sw. e também de seus compostos, principalmente contra diversos tipos histológicos de linhagens tumorais (SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2011, 2010, 2014; ARAÚJO et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017).

Os principais compostos responsáveis pela maioria das atividades farmacológicas relatadas são, principalmente, metabólitos secundários da classe dos terpenos, dentre eles os diterpenos clerodânicos (casearinas, caseargrevinas, casealurcinas e caseamembrois), ligninas, neolignanas,

derivados do ácido gálico e flavonoides, destacando essa classe de moléculas como promissora na busca de novas atividades farmacológicas (**Figura 7**) (ITOKAWA et al., 1990; SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2014).

Figura 7 - Estrutura molecular base dos diterpenos clerodânicos.



REFERÊNCIAS

ABOTALEB, M.; KUBATKA, P.; CAPRINDA, M.; VARGHESE, E.; ZOLAKOVA, B.; ZUBOR, P.; OPATRILOVA, R.; KRUZLIAK, P.; STEFANICKA, P.; BÜSSELBERG, D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, n. 1, p. 458-477, 2018.

AKÇA, O.; DOUFAS, A. G.; SESSLER, D. I. Use of selective opiate receptor inhibitors to prevent postoperative ileus. **Minerva Anestesiologica**, v. 68, n. 4, p. 162-165, 2002.

ALJOHANI, H. M.; AITTALEB, M.; FURGASON, J. M.; AMAYA, P.; DEEB, A.; CHALMERS, J. J.; BAHASSI, E. M. Genetic mutations associated with lung cancer metastasis to the brain. **Mutagenesis**, v. 3, n. 1, p. gey003, 2018.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMES, B. N. Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 14, n. S16, p. 66-77, 1989.

ANNETT, S.; ROBSON, T. Targeting cancer stem cells in the clinic: Current status and perspectives. **Pharmacology & therapeutics**, p. 0-18, 2018

ANTINARELLI, L. M.; PINTO, N. C.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 733-742, 2015.

ARAÚJO, É. J.; OLIVEIRA, G. A.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1791-1807, 2015.

ARAÚJO, É. J. F.; ALMEIDA, A. A. C.; SILVA, O. A.; COSTA, I. H. F.; REZENDE-JÚNIOR, L. M.; LIMA, F. D. C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FERREIRA, P. M. P. Behavioral effects induced by antitumor clonode diterpenes from *Casearia sylvestris* and in silico interactions with neuron receptors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n. 1, p. 460-467, 2017.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Antimetabolites That Interfere with Nucleic Acid Biosynthesis. *In*: AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (Eds). **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 2 ed. Elsevier, 2015. p. 23-79.

AZEVEDO, P. Abordagem terapêutica da dor oncológica. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 2, n. 3, p. 223-228, 1996.

BARBOSA, I. R.; SOUZA, D. L.; BERNAL, M. M.; COSTA, Í. C. C. Cancer mortality in Brazil: Temporal Trends and Predictions for the Year 2030. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 16, p. 1-6, 2015.

BASU, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1-13, 2018.

BBC NEWS. **Opioid crisis linked to two-year drop in US life expectancy**. 2017. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/world-us-canada-42452733>>. Acesso em: 30 fev 2019.

BEIK, J.; KHATERI, M.; KHOSRAVI, Z.; KAMRAVA, K.; KOORANIFAR, S.; GHAZNAVI, H.; SHAKERI-ZADEH, A. Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 387, p. 299-324, 2019.

BENYHE, S. Morphine: New aspects in the study of an ancient compound. **Life Sciences**, v. 55, n. 13, p. 969-979, 1994,

BELOEIL, H. Postoperative non-opioid analgesics management. **La Presse Médicale**, v. 44, n. 6, p. 601-609, 2015.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 15, n. 9-10, p. 1-3, 2003.

BLAUS, B. **Illustration depicting the life cycle of a normal cell**. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Normal_Cell_Life_Cycle.png>, Acesso em: 26 mar 2018.

BOING, A. F.; VARGAS, S. A. L.; BOING, A. C. A Carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 4, p. 317-322, 2007.

BRAGA, P. E.; LATORRE, M. R. D. O.; CURADO, M. P. Câncer na infância: análise comparativa da incidência, mortalidade e sobrevida em Goiânia (Brasil) e outros países. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 33-44, 2002.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL, 2009. **RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Espécies vegetais. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_us_0603.pdf>. (Acessado em: Fevereiro, 2018).

BROWN, M.; FARQUHAR-SMITH, P. Pain in cancer survivors; filling in the gaps. **British Journal of Anaesthesia**. v. 119, n. 4, p. 723–736, 2017.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Productreports**, v. 25, p. 475–516, 2008.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98-106, 2008.

CAMPOS, E. P.; TROMBINI, L. N.; RODRIGUES, R.; PORTELLA, D. L.; WERNER, A. C.; FERRAZ, M. C.; OLIVEIRA, R. V.; COGO, J. C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; ARANHA, N.; GERENUTTI, M. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 269, p. 1-8, 2015.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.

COSTA, C. A.; SANTOS, C.; ALVES, P.; COSTA, A. Dor oncológica. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 13, n. 6, p. 855-867, 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer : estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS OF BRITISH COLUMBIA. **Prescrire international**, v. 25, n. 168, p. 45-51, 2016.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

CRUK - CANCER RESEARCH UNITED KINGDOM. **Cancer statistics**. Disponível em: <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>> (Acessado em: 06 outubro de 2018).

CUSHMAN, T. R.; GOMEZ, D.; KUMAR, R.; LIKACHEVA, A.; CHANG, J. Y.; CADENA, A. P.; PARIS, S.; WELSH, J. W. Combining radiation plus immunotherapy to improve systemic immune response. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. 3, p. S468-S479, 2018.

DAI, Z.; CHU, H.; MA, J.; YAN, Y.; ZHANG, X.; LIANG, Y. The Regulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of MicroRNAs: From Chronic Pain to Morphine Tolerance. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 80, p. 1-15, 2018.

DELFINO, V.; BERNASCONI, E.; BARDELLI, D.; SPATARO, V.; FUSI-SCHMIDHAUSER, T. Intractable Neck Pain in an Oncologic Palliative Care Setting: Is Cancer Always the Answer? **Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, v. 31, n. 1, p. 43-44, 2017.

DAVIES, N. M.; WALLACE, J. L. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2. Potential in elderly patients. **Drugs & Aging**, v. 9, n. 6, p. 406-417, 1996.

DeVITA Jr, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DEWICK, P. M. Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. Trease and Evans' pharmacognosy. **Londres: Saunders**, v.42, n. 246, p. 409-425, 1996.

DIAS, M. F. R. G.; SÁ, R. P.; SAMPAIO, F. M. S.; MACHADO, P. V.; MILLER, W. M.; KADI, N. T.; NERY, J. A. C. Evaluation of podofilotoxina 0,15% for treatment of hpv lesions. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 3, p. 194-199, 2006.

DUREJA, G, P.; IYER, R. N.; DAS, G.; AHDAL, J.; NARANG, P. Evidence and consensus recommendations for the pharmacological management of pain in India. **Journal of Pain Research**, v. 2017, n. 10, p. 10:709-736, 2017.

- EISENHAUER, E. A.; VERMORKEN, J. B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, v. 55, n.1, p. 5-30, 1998.
- ELDER, K.; DIXON, J. M.; BLACKMUR, J. P.; LAURIE, J. Endocrine therapy for cancer. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 3, p. 128-133, 2018.
- ENRICO, P.; MURA, M. A.; ESPOSITO, G.; SERRA, P.; MIGHELI, R.; NATALE, G.; DESOLE, M. S.; MIELE, M.; MIELE, E. Effect of naloxone on morphine-induced changes in striatal dopamine metabolism and glutamate, ascorbic acid and uric acid release in freely moving rats. **Brain Research**, v. 797, n. 1, p. 94-102, 1998.
- ESPINOSA, J.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, GÜNTZEL, A. R. C.; RÜCKER, B.; CASALI, E. A.; ETHUR, E. M.; WINK, M. R.; TORRES, I. L. S. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities and *in vivo* hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 305-315, 2015.
- ESSERMAN, L.; SHIEH, Y.; THOMPSON, I. Rethinking Screening for Breast Cancer and Prostate Cancer. **JAMA**, v. 302, n. 15, p. 1685-1692, 2009.
- EVERDINGEN, M. H. J. B.; HOCHSTENBACH, L. M. J.; JOOSTEN, E. A. J.; TJAN-HEIJNEN, V. C. G.; JANSSEN, D. J. A. Update on Prevalence of Pain in Patients With Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 51, n. 6, p. 1070-1090, 2016.
- FALLON, M. T. Neuropathic pain in cancer. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 105-111, 2013.
- FARIAS, D. F.; SOUZA, T. M.; VIANA, M. P.; SOARES, B. M.; CUNHA, A. P.; VASCONCELOS, I. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FERREIRA, P. M. P.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.
- FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.83, n.4. p.1373-1384, 2011.
- FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C.; LIMA, D. J.; COSTA, N. D.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor

clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, n. 1, p. 112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. Molecular biology of human epidermal receptors, signaling pathways and targeted therapy against cancers: new evidences and old challenges. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, p. 1-17, 2017.

FERREIRA, C. G.; MELO, A. C.; STEFANI, S.; VIANNA, D.; FERNANDES, G.; GADELHA, C. G. Increasing access to immuno-oncology therapies in Brazil. **Journal of Cancer Policy**, v. 16, n.1, p. 1-5, 2018.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n.1, p. 453-458, 2003.

FINN, R. S.; CROWN, J. P.; LANG, I.; BOER, K.; BONDARENKO, I. M.; KULYK, S. O.; Ettl, J.; PATEL, R.; PINTER, T.; SCHMIDT, M.; SHPARYK, Y.; THUMMALA, A. R.; VOYTKO, N. L.; FOWST, C.; HUANG, X.; KIM, S. T.; RANDOLPH, S.; SLAMON, D. J. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 1, p. 25-35, 2015.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neuroscience Letters**, v. 21, p. 100-105, 2016.

GIAVINA-BIANCHI, P.; PATIL, S. U.; BANERJI, A. Immediate Hypersensitivity Reaction to Chemotherapeutic Agents. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 5, n. 3, p. 593-599, 2017.

GIULIANI, C. M.; DASS, C. R. Metabolic stress and cancer: is autophagy the common denominator and a feasible target?. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 597-614, 2014.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Carderno de Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 27-38, 1997.

GOUCKE, C. R.; CHAUDAKSHETRIN, P. Pain: A Neglected Problem in the Low-Resource Setting. **Anesthesia and Analgesia**, v. 126, n. 4. p. 1283-1286, 2018.

GOUGH, N.; MIAH, A. B.; LINCH, M. Nonsurgical oncological management of cancer pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 2, p. 102-111, 2014.

- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p. 335-343, 2007.
- GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.
- GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006.
- HABASHY, C.; SPRINGER, E.; HALL, E. A.; ANGHELESCU, D. L. Methadone for Pain Management in Children with Cancer. **Paediatric drugs**, v. 20, n. 5, p. 409-416, 2018.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HAYASHI, Y.; SKWARCZYNSKI, M.; HAMADA, Y.; SOHMA, Y.; KIMURA, T.; KISO, Y. A novel approach of water-soluble paclitaxel prodrug with no auxiliary and no byproduct: design and synthesis of isotaxel. **Journal Medicinal Chemistry**, v.46, n. 18, p. 3782-3784, 2003.
- HEBBES, C. Non-opioid analgesics. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 9, p. 469-472, 2016.
- HENEKA, N.; SHAW, T.; ROWETT, D.; PHILLIPS, J. L. Quantifying the burden of opioid medication errors in adult oncology and palliative care settings: A systematic review. **Palliative Medicine**, v. 30, n. 6, p. 520-532, 2016.
- HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939, 355 p.
- HOSOYA, N.; MIYAGAWA, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. **Cancer Science**, v. 105, n. 4, 2014.
- HSIANG, Y. H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S.; LIU, L. F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 27, p. 14873-14878, 1985.
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-288, 2002.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 126p.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128p.
- ISMAEL, G. F. V.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, n.1, p.81-91, 2008.

ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., MORITA, H. N., TAKEYA, K., IITAKA, Y., SCHENKEL, E. P., MONTIDOME, M. New antitumor principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 3384-3388, 1990.

JORDAN, C. T.; GUZMAN, M. L.; NOBLE, M. Cancer Stem Cells. **The new England Journal of Medicine**, v. 355, n. 12, p. 1253-1261, 2006.

KHABBAZI, S.; HASSANSHAHI, M.; HASSANSHAHI, A.; PEYMANFAR, Y.; SU, Y. W.; XIAN, C. J. Opioids and matrix metalloproteinases: the influence of morphine on MMP-9 production and cancer progression. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 392, n. 2, p. 123-133, 2019.

KHADRAOUI, S.; HARROU, F.; NOUNOU, H. N.; NOUNOU, M. N.; DATTA, A.; BHATTACHARYYA, S. P. A measurement-based control design approach for efficient cancer chemotherapy. **Information Sciences**, v. 333, p. 108-125, 2016.

KRAWCZYK, N.; GREENE, M. C.; ZORZANELLI, R.; BASTOS, BASTOS, F. I. Rising Trends of Prescription Opioid Sales in Contemporary Brazil, 2009–2015. **American Journal of Public Health**, v. 108, n. 5, p. e1-e3, 2018.

KRYEZIU, K.; BRUUN, J.; GUREN, T. K.; SVENN, A.; LOTHE, R. A. Combination therapies with HSP90 inhibitors against colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 240-247, 2019.

KONDO, T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. **Cancer Biomarkers**, v. 3, n. 4-5, p. 245-250, 2007.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Ecologia e conservação da Caatinga: uma introdução ao desafio. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: EDUFPE, 2003. p. 13-16.

LI, F.; TIEDE, B.; MASSAGUÉ, J.; KANG, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. **Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 3-14, 2007.

LIANG, Y.; LEUNG, K. S.; MOK, T. S. K. Evolutionary drug scheduling models with different toxicity metabolism in cancer chemotherapy. **Applied Soft Computing**, v. 8, p. 140-149, 2008.

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

LIU, Q.; LUO, Q.; HALIM, A.; SONG, G. Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. **Cancer Letters**, v. 401, n. 1, p. 39-45, 2017.

LOBELLO, C.; BIKOS, V.; JANIKOVA, A.; POSPISILOVA, S. The Role of Oncogenic Tyrosine Kinase NPM-ALK in Genomic Instability. **Cancers**, v. 10, n. 3, p. 1-12, 2018.

LOMBARDI, V. R. M.; CARRERA, I.; CACABELOS, R. *In vitro* and *in vivo* cytotoxic effect of AntiGan against tumor cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 3, p. 2547-2556, 2018.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy. **Molecular Medicine**, v. 16, n. 3-4, p. 144-153, 2010.

LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. 1, p. 95-113, 2018.

LUCAS, S. The pharmacology of indomethacin. **Headache**, v. 56, n. 2, p. 436-446, 2016.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.

MADER, J. S.; HOSKIN, D. W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, n. 8, p. 933-946, 2006.

MANCHIKANTI, L.; MANCHIKANTI, K. N.; KAYE, A. D.; KAYE, A. M.; HIRSCH, J. A. Challenges and concerns of persistent opioid use in cancer patients. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 14, p. 1-14, 2018.

MARTINS, R. T.; ALMEIDA, D. B.; MONTEIRO, F. M. R.; KOWACS, P. A.; RAMINA, R. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n.1, p. 323–334, 2012.

MASEDA, D.; ZACKULAR, J.P.; TRINDADE, B.; KIRK, L.; ROXAS, J. L.; ROGERS, L. M.; WASHINGTON, M. K.; DU, L.; KOYAMA, T.; VISWANATHAN, V. K.; VEDANTAM, G.; SCHLOSS, P. D.; CROFFORD, L. J.; SKAAR, E. P.; ARONOFF, D. M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Alter the Microbiota and Exacerbate *Clostridium difficile* Colitis while Dysregulating the Inflammatory Response. **MBio**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2019.

MASON, J. J.; BERGMAN, J. Total synthesis of luotonin A and 14-substituted analogues. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 2486-2490, 2007.

MESKE, D. S.; LAWAL, O. D.; ELDER, H.; LANGBERG, V.; PAILLARD, F.; KATZ, N. Efficacy of opioids versus placebo in chronic pain: a systematic

review and meta-analysis of enriched enrollment randomized withdrawal trials. **Journal of Pain Research**, v. 11, p. 923-934, 2018.

MIN, H. Y.; LEE, H. Y. Oncogene-Driven Metabolic Alterations in Cancer. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 45-56, 2018.

MOHARIL, R. B.; DIVE, A.; KHANDEKAR, S.; BODHADE, A. Cancer stem cells: An insight. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 21, n. 3, p. 1-6, 2017.

MOHAMED, M. S.; BISHR, M. K.; ALMUTAIRI, F. M.; ALI, A. G. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. **Apoptosis**, v. 22, n. 12, p. 1487-1509, 2017.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; SILVA, J. J. O.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

NAKADE, S.; YAMAMOTO, T.; SAKUMA, T. Cancer induction and suppression with transcriptional control and epigenome editing technologies. **Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 2, p. 187-194, 2018.

NATOLI, S.; LAZZARI, M.; DAURI, M. Open questions in the treatment of cancer pain: time for a strong evidence-based approach?. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 1, p. 1-4, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NOGUCHI, K. Novel Mechanisms of Resistance to Investigational Molecularly Targeted Drugs. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 137, n. 2, p. 151-160, 2017.

NUNES, B. C.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Morphine as first medication for treatment of cancer pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 64, n. 4, p. 236-240, 2014.

O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, v. 60, n. 4, p. 547-560, 2015.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras , semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, N. P. D.; BARBOSA, I. R.; PAULINO, J. N. V.; CANCELA, M. C.; SOUZA, D. L. B. Regional and gender differences in laryngeal cancer mortality: trends and predictions until 2030 in Brazil. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 122, n. 5, p. 547-554, 2016.

Organización Mundial de la Salud (OMS). **Alivio del dolor en el cáncer**. 2 ed. Ginebra: OMS, 1996. p. 64.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

PAIER, C. R. K.; MARANHÃO, S. S.A.; CARNEIRO, T. R.; LIMA, L. M.; ROCHA, D. D.; SANTOS, R. S.; FARIAS, K. M. MORAES-FILHO, M. O.; PESSOA, C. Natural products as new antimetabolic compounds for anticancer drug development. **Clinics**, v. 73, n. 1, p. e813s, 2018.

PASQUINI-NETTO, H.; MANENTE, F. A.; MOURA, E. L.; REGASINI, L. O.; PINTO, M. E. F.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; VELLOSA, J. C. R. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 666-672, 2012.

PAZ, M. F. C. J.; ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JUNIOR, A. L.; CONCEIÇÃO MACHADO, K.; ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; SHILL, M. C.; AHMED, M. I.; UDDIN, S. J.; MATA, A. M. O. F.; CARVALHO, R. M.; MACHADO, K. C.; SOBRAL, A. L. P.; SILVA, F. C. C.; SOUZA, J. M. C.; ARCANJO, D. D. R.; FERREIRA, P. M. P.; MISHRA, S. K.; SILVA, J.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C. Correlations between Risk Factors for Breast Cancer and Genetic Instability in Cancer Patients-A Clinical Perspective Study. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. 236, p. 1-9, 2018.

PDB. **RCSB Protein Data Bank**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

PEREIRA, F. G.; MARQUETE, R.; DOMINGOS, L. T.; ROCHA, M. E. N.; FERREIRA-PEREIRA, A.; MANSUR, E.; MOREIRA, D. L. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2817-2824, 2017.

PERGOLIZZI, J.; BÖGER, R. H.; BUDD, K.; DAHAN, A.; ERDINE, S.; HANS, G.; KRESS, H. G.; LANGFORD, R.; LIKAR, R.; RAFFA, R. B.; SACERDOTE,

P. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). **Pain Practice : The Official Journal of World Institute of Pain**, v. 8, n. 4, p. 287-313, 2008.

PULEIO, M. L. Y.; GÓMEZ, K. V.; MAJDALANI, A.; PIGLIAPOCO, V.; CHOCLER, G. S. Opioid treatment for mixed pain in pediatric patients assisted by the Palliative Care team. Five years of experience. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 116, n. 1, p. 62-64, 2018.

PY, L. A.; JACQUES, H. **A linguagem da saúde**. 2. ed. São Paulo: Editora Campus, 2003. 296 p.

RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, D. M.; BAŁAN, B. J.; SKOPIŃSKI, P. Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. **Central-European Journal of Immunology**, v. 42, n. 4, p. 370-376, 2017.

RAMÓN, Y.; CAJAL, S.; CAPDEVILA, C.; HERNANDEZ-LOSA, J.; MATTOS-ARRUDA, L.; GHOSH, A.; LORENT, J.; LARSSON, O.; AASEN, T.; POSTOVIT, L. M.; TOPISIROVIC, I. Cancer as an ecomolecular disease and a neoplastic consortium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1868, n. 2, p. 484-499, 2017.

RAPHAEL, J.; AHMEDZAI, S.; HESTER, J.; URCH, C.; BARRIE, J.; WILLIAMS, J.; FARQUHAR-SMITH, P.; FALLON, M.; HOSKIN, P.; ROBB, K.; BENNETT, M. I.; HAINES, R.; JOHNSON, M.; BHASKAR, A.; CHONG, S.; DUARTE, R.; SPARKES, E. Cancer pain: part 1: Pathophysiology; oncological, pharmacological, and psychological treatments: a perspective from the British Pain Society endorsed by the UK Association of Palliative Medicine and the Royal College of General Practitioners. **Pain Medicine : The Official Journal of the American Academy of Pain Medicine**, v. 11, n. 5, p. 742-764, 2010.

RATHER, R. A.; BHAGAT, M. Cancer Chemoprevention and Piperine: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n.10, p. 1-12, 2018.

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

REDDY, A.; YENNURAJALINGAM, S.; DESAI, H.; REDDY, S.; CRUZ, M.; WU, J.; LIU, D.; RODRIGUEZ, E. M.; WALETICH, J.; SHIN, S. H.; GAYLE, V.; PATEL, P.; DALAL, S.; VIDAL, M.; TANCO, K.; ARTHUR, J.; TALLIE, K.; WILLIAMS, J.; SILVESTRE, J.; BRUERA, E. The opioid rotation ratio of hydrocodone to strong opioids in cancer patients. **The Oncologist**, v. 19, n. 11, p. 1186-1193, 2014.

REDDY, A.; TAYJASANANT, S.; HAIDER, A.; HEUNG, Y.; WU, J.; LIU, D.; YENNURAJALINGAM, S.; REDDY, S.; CRUZ, M.; RODRIGUEZ, E. M.; WALETICH, J.; VIDAL, M.; ARTHUR, J.; HOLMES, C.; TALLIE, K.; WONG, A.; DEV, R.; WILLIAMS, J.; BRUERA, E. The opioid rotation ratio of strong opioids to transdermal fentanyl in cancer patients. **Cancer**, v. 122, n. 1, p. 149-156, 2016.

REIS-PINA, P.; LAWLOR, P. G.; BARBOSA, A. Cancer-Related Pain Management and the Optimal Use of Opioids. **Acta Médica Portuguesa**, v. 28, n. 3, p. 376-381, 2015.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **Journal National Cancer Institute**, v.83, n. 4, p.288-291, 1991.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHELE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRÍGUEZ-ANTONA, C.; TARON, M. Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 2, p. 201-217, 2015.

ROSKOSKI, R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v.87, n. 87, p.42-59, 2014.

SAJITH, A. M.; KHADER, K. K. A.; JOSHI, N.; REDDY, M. N.; PADUSHA, M. P.; JOY, M. N.; BODKE, Y. D.; KARUVALAM, R. P.; BANERJEE, R.; MURALIDHARAN, A.; RAJENDRA, P. Design, synthesis and structure–activity relationship (SAR) studies of imidazo[4,5-b]pyridine derived purine isosteres and their potential as cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 21-31, 2015.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. G. R. Use of medicinal plants by the population of Ariquemes, in Rondonia State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 244-250, 2008.

SANTOS, A. G., FERREIRA, P. M. P., VIEIRA-JÚNIOR, G. M., PEREZ, C. C., TININIS, A. G., SILVA, G. H., BOLZANI, V. S., COSTA-LOTUFO, L. V., PESSOA, C., CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodanediterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemistry & Biodiversity** v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. **Natural**, v. 277, n. 22, p. 665-667, 1979.

SCHOLAR, E. Antimetabolites. *In*: ENNA, S. J.; BYLUND, D. B. (Eds). **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. Elsevier, 2007. p. 1-4.

- SHINOHARA, A.; ANDOH, T.; SAIKI, I.; KURAIISHI, Y. Analgesic effects of systemic fentanyl on cancer pain are mediated by not only central but also peripheral opioid receptors in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, n. 1, p. 275-282, 2018.
- SCHUG, S. A.; CHANDRASENA, C. Pain management of the cancer patient. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 1, p. 5-15, 2015.
- SCHUSTER, M.; BAYER, O.; HEID, F.; LAUFENBERG-FELDMANN, R. Opioid Rotation in Cancer Pain Treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 115, n. 9, p. 135-142, 2018.
- SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.1, p. 1-22, 2018.
- SEDLACEK, H.; CZECH, J.; NAIK, R.; KAUR, G.; WORLAND, P.; LOSIEWICZ, M.; PARKER, B.; CARLSON, B.; SMITH, A.; SENDEROWICZ, A.; SAUSVILLE, E. Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. **International Journal of Oncology**, v. 9, n. 6, p. 1143-1168, 1996.
- SHAH, U.; SHAH, R.; ACHARYA, S.; ACHARYA, N. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2013.
- SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Facourtiaceae). **European Journal of Pharmacology**, v. 608, n. 1-3, p. 76-83, 2009.
- SILVERMAN, J. E.; GULATI, A. An overview of interventional strategies for the management of oncologic pain. **Pain management**, v. 8, n. 5, p. 389-403, 2018.
- SOMARELLI, J. A.; WARE, K. E.; KOSTADINOV, R.; ROBINSON, J. M.; AMRI, H.; ABU-ASAB, M.; FOURIE, N.; DIOGO, R.; SWOFFORD, D.; TOWNSEND, J. P. PhyloOncology: Understanding cancer through phylogenetic analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1867, n. 2, p. 101-108, 2017.
- SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Ethnobotanical , phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.
- SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.

STAHLHUT, R.; PARK, G.; PETERSEN, R.; MA, W.; HYLANDS, P. The occurrence of the anti-cancer diterpene taxol in *Podocarpus gracilior* Pilger (Podocarpaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 6, p. 613-622, 1999.

STEINBICHLER, T. B.; DUDÁS, J.; RIECHELMANN, H.; SKVORTSOVA, I. The role of exosomes in cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 44, n. 1, p. 170-181, 2017.

STRATTON, C. F.; NEWMAN, D. J.; TAN, D. S. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, pp. 4802-4807, 2015.

THOTA, S. Recent Advances in development of Polyphenols as Anticancer agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2018.

TORRES, R. B., YAMAMOTO, K. 1986. Taxonomia das espécies de Casearia Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p.239-258, 1986.

TWYXCROSS, R. Cancer pain classification. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 41, n. 1, p. 141-145, 1997.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, Â. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VARMUS, H. The New Era in Cancer Research. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1162-1165, 2006.

VENTAFRIDDA, V.; TAMBURINI, M.; CARACENI, A.; CONNO, F. A validation study of the WHO method for cancer pain relief. **Cancer**, v. 59, n. 4, p. 850-856, 1987.

VINAY, D. S.; RYAN, E. P.; PAWELEC, G.; TALIB, W. H.; STAGG, J.; ELKORD, E.; LICHTOR, T.; DECKER, W. K.; WHELAN, R. L.; KUMARA, H. M. C. S.; SIGNORI, E.; HONOKI, K.; GEORGAKILAS, A. G.; AMIN, A.; HELFERICH, W. G.; BOOSANI, C.S.; GUHA, G.; CIRIOLO, M. R.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; AZMI, A. S.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; BHAKTA, D.; HALICKA, D.; FUJII, H.; AQUILANO, K.; ASHRAF, S. S.; NOWSHEEN, S.; YANG, X.; CHOI, B. K.; KWON, B. S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. 1, p. S185-S198, 2015.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. Opioid receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 953-990, 2004.

WANG, H. K. Plant-derived anticancer agents currently in clinical use or in clinical trials. **IDrugs : The Investigational Drugs Journal**, v. 1, n. 1, p. 92-102, 1998.

WANG, Y.; DENG, W.; LI, N.; NERI, S.; SHARMA, A.; JIANG, W.; LIN, S. H. Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 185, p. 1-11, 2018.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents: vi. the isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WARREN-STOMBERG, M.; BRATTWALL, M.; JAKOBSSON, J. G. Non-opioid analgesics for pain management following ambulatory surgery: a review. **Minerva Anestesiologica**, v. 79, n. 9, p. 1077-1087, 2013.

WEINGART, S. N.; ZHANG, L.; SWEENEY, M.; HASSETT, M. Chemotherapy medication errors. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 4, p. e191-e199, 2018.

WERUTSKY, G.; NUNES, P.; BARRIOS, C. Locally advanced breast cancer in Brazil: current status and future perspectives. **Ecancer Medical Science**, v. 13, n. 895, p. 1-7, 2019.

WIFFEN, P.J.; WEE, B.; DERRY, S.; BELL, R. F.; MOORE, R. A. Opioids for cancer pain - an overview of Cochrane reviews. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7, p. 1-21, 2017.

WILKES, G.M. Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents. **Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing**, v. 5, n. 2, p. 137-155, 2018.

WOOD, H.; DICKMAN, A.; STAR, A.; BOLAND, J. W. Updates in palliative care - overview and recent advancements in the pharmacological management of cancer pain. **Clinical medicine: Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 18, n. 1, p. 17-22, 2018.

WU, S. Y.; CHOU, H. Y.; YUH, C. H.; MEKURIA, S. L.; KAO, Y. C.; TSAI, H. C. Radiation-Sensitive Dendrimer-Based Drug Delivery System. **Advanced Science**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2017.

YARDEN, Y.; CALDES, C. Basic cancer research: why it is essential for the future of cancer therapy. **Bulletin du Cancer**, v. 101, n. 9, p. E25-E26, 2014.

YOU, W.; HENNEBERG, M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. **Evolutionary Applications**, v. 11, n. 2, p. 140-152, 2018.

YU, W. D.; SUN, G.; LI, J.; XU, J.; WANG, X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 452, n. 1, p. 66-70, 2019.

ZAROGOULIDIS, P.; PAPADOPOULOS, V.; MARAGOULI, E.; PAPATSIBAS, G.; KARAPANTZOS, I.; BAI, C.; HUANG, H. Tumor heterogeneity: multiple needle biopsies from different lesion sites-key to successful targeted therapy and immunotherapy. **Translational Lung Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. S46-S48, 2018.



CAPÍTULO I

Atividade antiproliferativa da fração com casearinas em células tumorais murinas

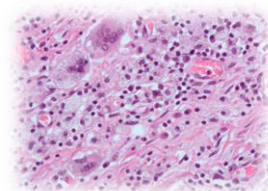
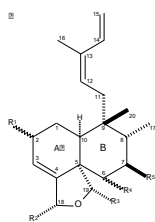
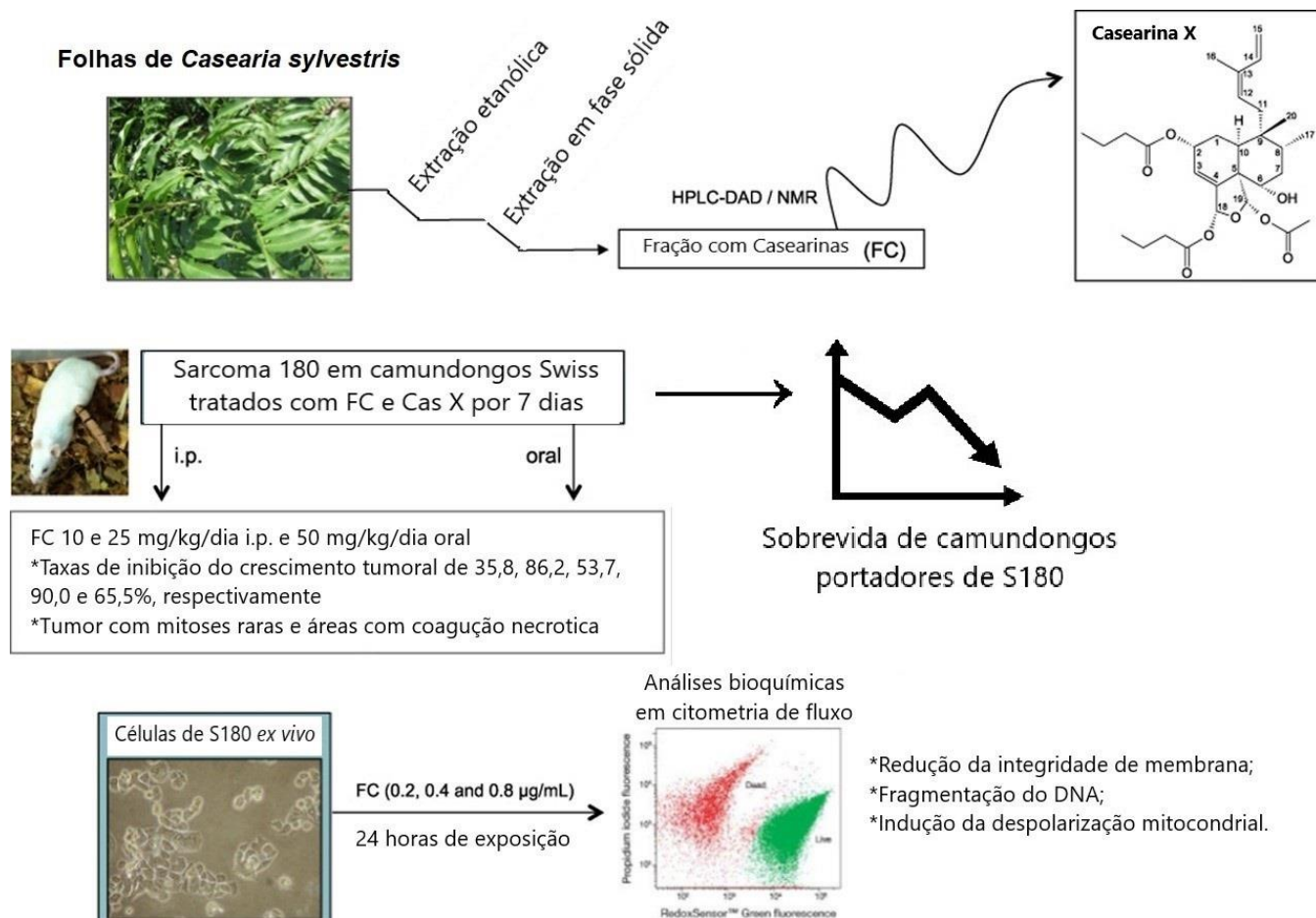


GRÁFICO RESUMO



RESUMO

Casearia sylvestris Swartz é uma espécie vegetal pertencente à família Salicaceae, presente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Apresenta diversas atividades farmacológicas como: atividade antiulcerogênica, citotóxica, antimicrobiana, antiinflamatória e anti-hipertensiva. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a ação antitumoral *in vivo* e *ex vivo* de uma fração com casearinas (FC) e seu principal componente (Casearina X) isolado de folhas de *C. sylvestris* Sw.. Inicialmente camundongos Swiss portadores do tumor Sarcoma 180 foram tratados com FC e Cas X por 7 dias. No 8º dia os animais foram sacrificados e quantificados a massa tumoral bem como alterações celulares em análises hematológicas e bioquímicas por citometria de fluxo e análises histológicas em órgãos e tumores. A viabilidade de células do tumor S-180 foi determinada por meio do ensaio com o corante azul de tripan. Em paralelo, grupos de animais portadores do tumor S-180, tratados e não tratados com FC foram acompanhados para se determinar a sobrevivência. FC 10 e 25 i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral e Cas X 25 i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral revelaram taxas de inibição do crescimento tumoral de 35,8, 86,2, 53,7, 90,0 e 65,5% respectivamente e em fotomicrografias dos tumores, foram verificadas mitoses, invasão muscular e áreas necróticas. Em grupos tratados com FC foram observadas alterações histopatológicas como, congestão passiva e degeneração vacuolar em tecido hepático e autólise e pontos hemorrágicos em tecidos renais. Análises a nível celular revelaram que o FC reduz a integridade da membrana e induziu a fragmentação do DNA e a despolarização mitocondrial ($p < 0,05$). Animais tratados com FC 25 mg/kg/dia i.p e oral, apresentaram uma maior sobrevivência quando comparados aos grupos controles negativos. FC e Cas X foram eficientes substâncias antitumorais contra células tumorais murinas, causando apenas alterações morfológicas reversíveis no fígado, rins e baços. Esses achados enfatizam os diterpenos clerodânicos como uma classe emergente de moléculas anticâncer.

Palavras-chave: Casearina X, Sarcoma 180, Antineoplásico, Toxicidade



ABSTRACT

Casearia sylvestris Swartz is a plant species belonging to the family Salicaceae, present in almost all tropical and subtropical regions of South America. The different pharmacological measures such as: antiulcerogenic, cytotoxic, antimicrobial, anti-inflammatory and antihypertensive activity. This work aimed to evaluate the *in vivo* and *ex vivo* antitumor action of a fraction with casearins (FC) and its main component (Casearina X) isolated from leaves of *C. sylvestris* Sw .. Initially Swiss mice bearing the Sarcoma 180 tumor were treated with FC and Cas X for 7 days. On the 8th day the animals were sacrificed and quantified the tumor mass as well as cellular alterations in hematological and biochemical analyzes by flow cytometry and histological analyzes in organs and tumors. The viability of S-180 tumor cells was determined by the trypan blue dye assay. In parallel, groups of animals bearing the S-180 tumor, treated and not treated with FC were monitored for survival. FC 10 and 25 i.p. and 50 mg/kg/day orally and Cas X 25 i.p. and 50 mg/kg/day orally revealed tumor growth inhibition rates of 35.8, 86.2, 53.7, 90.0 and 65.5% respectively and in photomicrographs of the tumors, mitoses, invasion muscular and necrotic areas. In groups treated with FC histological changes were observed, such as passive congestion and vacuolar degeneration in hepatic tissue and autolysis and hemorrhagic spots in renal tissues. Cellular analysis revealed that FC reduced membrane integrity and induced DNA fragmentation and mitochondrial depolarization ($p < 0.05$). Animals treated with FC 25 mg/kg/day i.p and oral presented higher survival when compared to the negative control groups. FC and Cas X were efficient antitumor substances against murine tumor cells, causing only reversible morphological changes in the liver, kidneys and spleens. These findings emphasize clerodan diterpenes as an emerging class of anticancer molecules.

Key words: Casearin X. Sarcoma 180. Antineoplastic.Toxicity



1 INTRODUÇÃO

Casearia sylvestris Swartz (Salicaceae) é uma planta amplamente distribuída no Brasil conhecida como “guaçatonga”, “café silvestre” e “cafezinho do mato” dentre outros nomes conforme ocorrência regional. Extratos etanólicos e seus óleos essenciais obtidos das folhas têm atividade antiulcerogênica e reduzem o volume gástrico sem alterar o pH do estômago, o que corrobora seu uso em desordens gastrointestinais (ABOIN et al., 1987; BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005) e extratos aquosos apresentaram atividade inibitória da fosfolipase A₂ (PLA₂), prevenindo os efeitos de danos no tecido muscular após a inoculação de toxinas (BORGES et al., 2000, 2001; CAVALCANTE et al., 2007; SILVA et al., 2008a).

A espécie *C. sylvestris* Sw. apresenta também ação antimicrobiana contra patógenos como fungos e bactérias, o que explica seu uso tradicional no tratamento de feridas, ulcerações cutâneas, diarreia, gripes e resfriados pela tribo indígena Karajá (Brasil) e Shipibo-Conibo (Peru) (CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; MOSADDICK et al., 2004; SILVA et al., 2008b). O potencial antioxidante de espécies distintas de *Casearia* também foi demonstrado por sequestro de radicais livres em testes *in vitro* e *in vivo*. Dentre todos os compostos bioativos encontrados no extrato etanólico, os efeitos terapêuticos dos óleos essenciais têm sido atribuídos ao biciclogermacreno, um sesquiterpeno com atividade antiinflamatória (MENEZES et al., 2004; MOSADDICK et al., 2004; ARAÚJO et al., 2015). Os extratos metanólicos obtidos das folhas de *C. sylvestris* Sw. reduziram os lipídios séricos, a agregação plaquetária *in vitro* e o estresse oxidativo quando administrados oralmente em camundongos Swiss e preveniram o espessamento arterial induzido por dieta hiperlipídica (BRANT et al., 2014).

As propriedades farmacológicas de *C. sylvestris* Sw. são atribuídas principalmente a diterpenos clerodânicos, um metabólito secundário derivado de unidades de isopreno também conhecidos como “casearinas”, “casearvestrinas” e “caseargrevinas”, encontrados principalmente nas folhas dessa espécie (ITOKAWA et al., 1990; CARVALHO et al., 2009; SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2011a, 2014, ARAÚJO et al., 2014). Com base nesses extensos usos etnofarmacológicos, este estudo analisou a ação antitumoral *in vivo* e *ex vivo* de uma fração acetato de etila rica com Casearinas

(FC) e do seu principal constituinte (Casearina X) obtidos das folhas de *C. sylvestris* Sw. em modelo tumoral murino.

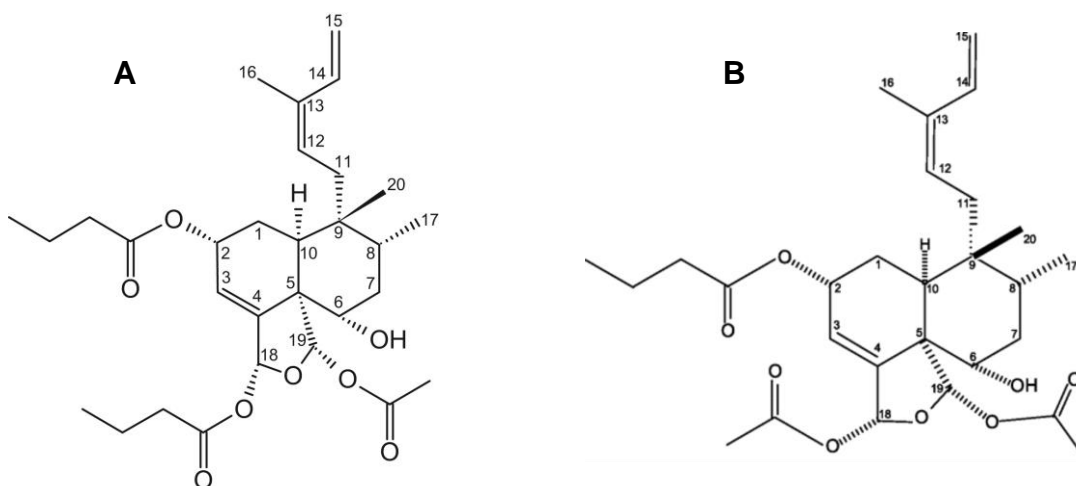
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolamento do composto e identificação estrutural

As folhas de *C. sylvestris* Sw. foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, SP) por pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP). Os espécimes de comprovante (AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19) foram depositados no Herbário Maria Eneida P. Kaufmann, do Instituto de Botânica do estado de São Paulo, Brasil. O extrato etanólico das folhas e sua fração foram obtidos conforme descrito em Santos et al. (2010). Resumidamente, o extrato foi fracionado através de uma extração em fase sólida usando carvão ativado/sílica gel 60–200 μm (1:1, m/m) como fase estacionária e hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol como a fase móvel, fornecendo três frações, respectivamente. A segunda fração obtida é denominada fração acetato de etila enriquecida com casearinas (FC).

Os isolados (diterpenos clerodânicos) foram identificados no Núcleo de Bioensaios e Biofisiologia de Produtos Naturais-NuBBE, do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, São Paulo, Brasil) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector *Diode Array* (HPLC-DAD), conforme descrito em Claudino et al. (2013) e ressonância magnética nuclear considerando dados da literatura (ITOKAWA et al., 1990; SANTOS et al., 2010). Essas análises mostraram que a FC constitui 56,5% da fração inicialmente obtida, sendo os isolados Caseargrewiin F (Cas F) e Casearin X (Cas X), as moléculas majoritárias, com uma ocorrência de 9,9 e 14,2%, respectivamente (FERREIRA et al., 2014) (**Figura 1**). Os registros no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) foram protocolados (#A00892A e #A33EA7A) de acordo com legislação brasileira de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional (Lei 13.123/2015).

Figura 1 – Estrutura molecular dos diterpenos clerodânicos. (A) Casearina X e (B) Caseargrewiin F.



2.2 Produtos químicos

O soro fetal bovino foi adquirido da Cultilab[®] (Campinas, SP), meio RPMI 1640, tripsina-EDTA, penicilina e estreptomicina foram adquiridas da GIBCO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 5-fluoruracil (5-FU), iodeto de propídio (PI), o brometo de etídio e a rodamina 123 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co[®]. (St. Louis, MO, EUA) e o triton X-100 foi adquirido da VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil).

2.3 Animais

Camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), fêmeas adultas foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí. Os animais foram mantidos em gaiolas bem ventiladas sob condições de luz padrão (ciclo claro/escuro de 12:12 h) e temperatura (22 ± 1 °C), e alojados com livre acesso à dieta comercial de roedores e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI n° 373/17 (CEUA/UFPI) e estão de acordo com as diretrizes brasileiras (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e internacionais sobre cuidados e uso de animais experimentais (Diretiva 2010/63/UE do Conselho do Parlamento Europeu) e seguiram os preceitos da Lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009.

2.4 Análise da atividade antitumoral *in vivo*

Células de Sarcoma 180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos. Células de tumor ascítico de Sarcoma 180 (S-180) com dez dias de manutenção foram removidas da cavidade peritoneal, contadas e implantadas subcutaneamente 0,5 mL (4×10^6 células/mL) na axila dianteira direita de animais saudáveis. No dia seguinte, eles foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n=10 cada) e as substâncias (FC e Cas X), dissolvidas em 4% de DMSO, foram administradas com injeção intraperitoneal ou via oral por gavagem por 7 dias nas doses de 10, 25 ou 50 mg/kg/dia. Os controles negativos e positivos receberam 4% de DMSO (i.p. e oral) e 5-Fluoruracil (25 mg/kg/dia, i. p.). No oitavo dia, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg)/xilazina (4,5 mg/kg) para coleta de sangue através de plexo retroorbital (WAYNFORTH, 1980) utilizando tubos estéreis e pipetas heparinizadas para determinar o perfil de leucócitos periféricos e analisados com aumento de 400x em esfregaços de sangue marcados com May-Grünwald-Giemsa (dois por animal) para obter quantidade diferencial de glóbulos brancos (WBC). A contagem absoluta de leucócitos foi calculada como o produto individual de sua respectiva porcentagem diferencial e contagem total de leucócitos (BIERMANN et al., 1999).

Posteriormente, todos os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos (fígados, baços, rins e estômagos) e tumores foram dissecados, pesados e fixados em formaldeído a 10% para exame de tamanho, alterações de cor e hemorragias. O percentual de inibição do crescimento tumoral (%) foi calculado conforme fórmula que segue:

$$\text{Percentual de inibição (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

Onde:

- A - peso médio do tumor no controle negativo;
- B - média para cada grupo tratado.

Tumores (de ambos os grupos tratados com FC e Cas X) e fígados, baços, rins e estômagos (de grupos tratados com Cas X) foram, posteriormente, seccionados em tamanhos menores e preparados para os

procedimentos histológicos de rotina e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada sob microscopia de luz com aumento de 100 a 400x.

2.5 Análise por citometria de fluxo em células de Sarcoma 180

Células do tumor ascítico S-180 foram obtidas entre 7 e 9 dias pós-inoculação da cavidade peritoneal de animais portadores sob condições assépticas. A suspensão celular tumoral foi centrifugada a 500 x g, por 5 min para obtenção de um *pellet* celular e lavada três vezes com meio RPMI. A concentração celular foi ajustada para $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino e fitohemaglutinina (2%). Logo após, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços e incubadas com concentrações crescentes de FC (0,2; 0,4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h (FERREIRA et al., 2014). Doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo (0,3 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente, foram realizadas as análises por citometria de fluxo - Guava EasyCyte Mine™ (software Guava Express Plus CytoSoft 4.1, Guava Technologies Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, USA), comparando populações de células, quanto às características de tamanho e granulosidade usando um laser de argônio (488nm). Cinco mil eventos foram contabilizados em cada experimento e os debris celulares foram omitidos das análises.

2.5.1 Integridade da membrana

A integridade da membrana celular foi avaliada pela exclusão do iodeto de propídio (PI) após 24 h de exposição. Resumidamente, 100 μL de células tumorais tratadas e não tratadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas com PI (50 $\mu\text{g/mL}$) durante 5 min a 37 °C, após esse tempo a integridade da membrana foi determinada (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

2.5.2 Fragmentação de DNA

Após 24 h de tratamento, as células tumorais ($0,5 \times 10^6$ cél/mL) foram incubadas a 37 °C por 30 min no escuro em uma solução de lise contendo 0,1 % de citrato, 0,1 % triton X-100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de PI. A fluorescência foi subsequentemente medida (FERREIRA et al., 2014).

2.5.3 Potencial transmembrana mitocondrial

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado com rodamina 123, um corante fluorescente, catiônico, permeável às células, prontamente sequestrado pelas mitocôndrias sem induzir efeitos citotóxicos. Após 24 h de tratamento, as células tumorais foram lavadas com PBS e incubadas com rodamina 123 a 37 °C durante 15 min no escuro. As células foram incubadas novamente em PBS a 37 °C por mais 30 min no escuro, e a fluorescência mensurada (CURY-BOAVENTURA et al., 2003).

2.6 Ensaio de relaxamento de DNA

Os efeitos inibitórios da FC nas topoisomerasas de DNA humano (I e II) foram examinados usando Kits de Triagem de Medicamentos Topo I e Topo II (TopoGEN, Inc.). O DNA plasmídico super enrolado (250 ng) foi incubado com Topo I ou II humano (4 UI) a 37 °C durante 30 min em tampão de relaxamento (10 mM tampão Tris pH 7,9, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1% de BSA, 0,1 mM espermidina e 5% glicerol), na presença ou ausência de FC (0,01, 0,1, 1 e 10 µg/mL). Camptotecina (1 µM) e etoposídeo (100 µM) foram utilizados como controles positivos. A reação foi terminada pela adição de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (2 µL) e proteinase K (50 µg/mL) e incubada a 37 °C por 30 minutos. As amostras de DNA (2 µL) foram adicionadas com corante e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% por 90 minutos à temperatura ambiente e coradas com brometo de etídio.

2.7 Sobrevida de camundongos portadores do tumor S-180

Diariamente, os animais de todos os grupos foram observados para registro de mortes e geração de uma curva de sobrevida tipo Kaplan-Meier. Foram analisados grupos de animais tratados diariamente com FC nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 25 e 50 mg/kg/dia oral, até a morte de cada animal. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia.

2.8 Análises estatísticas

De modo a determinar as diferenças entre os grupos, os dados (média ± E.P.M.) foram comparados por análise de variância unidirecional (ANOVA),

seguida pelo teste de múltiplas comparações Student Newman-Keuls, adotando como nível de significância $p < 0,05$ e utilizando o software GraphPad Prism[®].

3. RESULTADOS

3.1 Atividade *in vivo* contra o tumor Sarcoma 180

Após a administração da FC ou Cas X [intraperitoneal (10 e 25 mg/kg/dia) ou via oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia)] por 7 dias consecutivos, os camundongos foram sacrificados no 8º dia por deslocamento cervical e dissecados para remoção de tumor, fígado, baço, rins e estômago. Ambas as substâncias - FC 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral e Cas X 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral - reduziram o crescimento tumoral ($1,3 \pm 0,2$; $0,3 \pm 0,1$; $1,1 \pm 0,3$; $0,2 \pm 0,7$ e $0,7 \pm 0,1$ g, respectivamente) de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao controle negativo que recebeu DMSO 4% (FC: $1,9 \pm 0,2$ e $2,4 \pm 0,3$ g; Cas X: $2,3 \pm 0,2$ e $2,2 \pm 0,3$ g, para administração ip e oral, respectivamente) (**Tabela 1**). FC 10 e 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral e Cas X 25 mg/kg/dia i.p. e 50 mg/kg/dia por via oral revelaram taxas de inibição do crescimento tumoral de $35,8 \pm 8,9$ (FC 10 mg/kg/dia i.p.), $86,2 \pm 7,2$ (FC 25 mg/kg/dia i.p.), $53,7 \pm 10,9$ (FC 50 mg/kg/dia v.o.), $90,0 \pm 2,9$ (CAS 25 mg/kg/dia i.p.) e $65,5 \pm 6,6\%$ (CAS 50 mg/kg/dia v.o.). O controle positivo 5-FU também mostrou redução do tumor variando de $52,7 \pm 5,7$ a $83,9 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Efeito de uma fração com Casearinas (FC) e de Casearina X (Cas X) extraídas de folhas de *Casearia sylvestris* no peso relativo úmido de órgãos-chave e no crescimento tumoral em camundongos Swiss portadores de Sarcoma 180 após 7 dias de tratamento intraperitoneal ou oral.

Via de administração	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Peso camundongos (g)	g/100g				Tumor (g)	Inibição do Tumor (%)
				Fígado	Rim	Baço	Estômago		
Intraperitoneal	Controle	–	38,0 ± 1,2	5,31 ± 0,13	1,40 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,67 ± 0,07	1,9 ± 0,2	–
	5-FU	25	21,5 ± 1,0*	4,86 ± 0,27	1,28 ± 0,03	0,22 ± 0,01*	0,60 ± 0,04	0,3 ± 0,1*	83,9 ± 2,3*
	FC	10	36,3 ± 0,8	4,98 ± 0,15	1,37 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,59 ± 0,09	1,3 ± 0,2*	35,8 ± 8,9*
		25	24,6 ± 0,8*	4,52 ± 0,20*	1,43 ± 0,08	0,26 ± 0,06*	0,61 ± 0,05	0,3 ± 0,1*	86,2 ± 7,2*
Oral	Controle	–	36,2 ± 1,2	5,28 ± 0,18	1,35 ± 0,07	0,53 ± 0,02	0,69 ± 0,04	2,4 ± 0,3	–
	FC	25	35,0 ± 1,1	5,22 ± 0,16	1,34 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,83 ± 0,04	1,8 ± 0,3	24,9 ± 10,6
		50	31,3 ± 1,5	4,88 ± 0,22	1,44 ± 0,05	0,42 ± 0,03	1,02 ± 0,11*	1,1 ± 0,3*	53,7 ± 10,9*
Intraperitoneal	Controle	–	30,0 ± 0,8	5,62 ± 0,16	1,47 ± 0,07	0,65 ± 0,05	0,59 ± 0,09	2,3 ± 0,2	–
	5-FU	25	22,2 ± 1,0*	5,06 ± 0,15	1,51 ± 0,05	0,38 ± 0,03*	0,50 ± 0,08	1,0 ± 0,1*	52,7 ± 5,7*
	Cas X	10	30,9 ± 1,0	5,58 ± 0,27	1,58 ± 0,04	0,71 ± 0,03	0,63 ± 0,05	2,7 ± 0,3	-15,2 ± 13,7
		25	22,5 ± 0,8*	4,87 ± 0,31	1,61 ± 0,08	0,44 ± 0,03*	0,62 ± 0,06	0,2 ± 0,7*	90,0 ± 2,9*
Oral	Controle	–	28,0 ± 0,7	4,86 ± 0,07	1,04 ± 0,02	0,55 ± 0,04	0,66 ± 0,02	2,2 ± 0,3	–
	Cas X	25	29,5 ± 1,2	4,97 ± 0,18	1,18 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,64 ± 0,02	2,1 ± 0,3	0,5 ± 12,1
		50	27,4 ± 1,5	4,53 ± 0,17	1,20 ± 0,08	0,38 ± 0,04*	0,93 ± 0,06*	0,7 ± 0,1	65,5 ± 6,6*

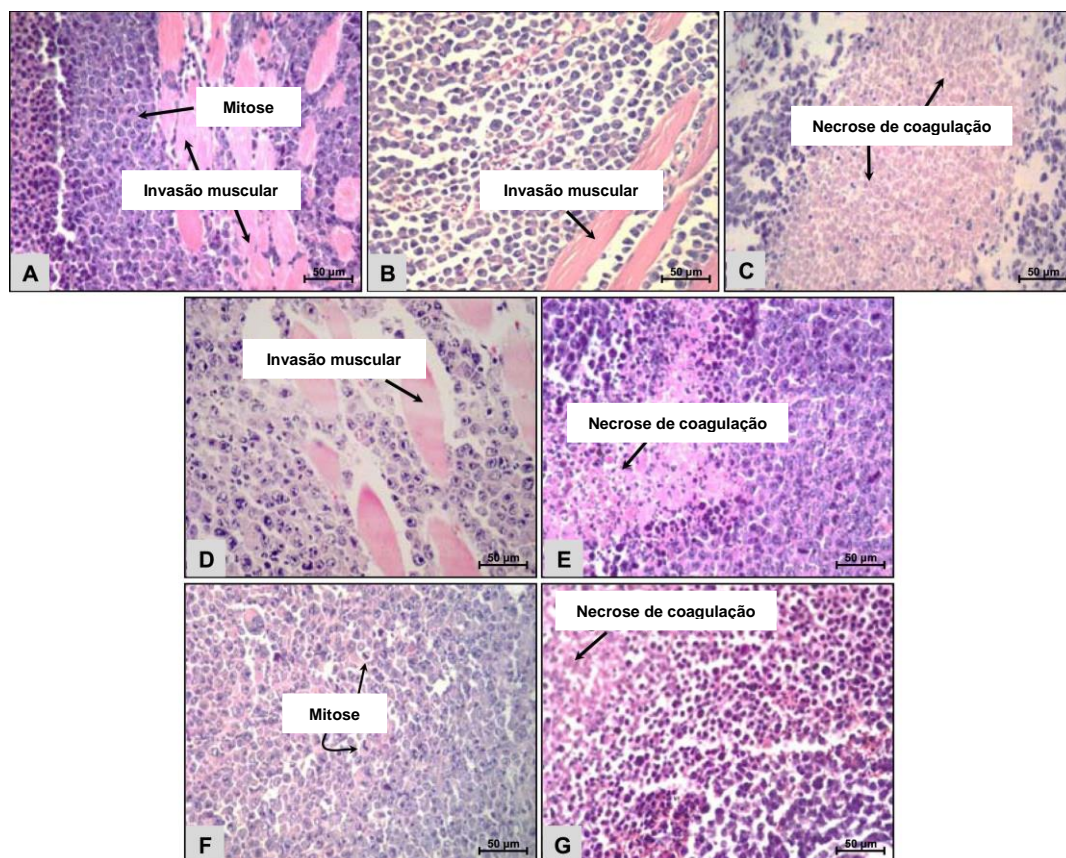
Valores correspondem a médias ± E.P.M., n=10 animais/grupo. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir as amostras (4% de DMSO). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) foi usado como controle positivo. *p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações Student Newman-Keuls.

3.1.1 Exames macroscópicos e microscópicos

Houve uma redução no peso dos animais tratados com FC ($24,6 \pm 0,8$ g) e Cas X ($22,5 \pm 0,8$ g) na dose de 25 mg/kg /dia i.p. (**Tabela 1**). Alterações no peso relativo dos órgãos também foram observadas nos animais tratados por FC e Cas X via intraperitoneal. Houve uma diminuição dos fígados ($4,52 \pm 0,20$ g) e baços ($0,26 \pm 0,06$ g) dos animais tratados com FC 25 mg/kg/dia e achados semelhantes foram observados com baços ($0,44 \pm 0,03$ g) de camundongos tratados com Cas X em comparação com seus respectivos controles negativos ($0,51 \pm 0,03$ e $0,65 \pm 0,05$ g) ($p < 0,05$). O controle positivo 5-FU também reduziu significativamente os pesos relativos do baço em ambos os protocolos experimentais ($0,22 \pm 0,01$ e $0,38 \pm 0,03$ g). Por outro lado, doses orais de 50 mg/kg/dia em ambos os grupos tratados com FC e Cas X causaram aumento dos estômagos ($1,02 \pm 0,11$ e $0,93 \pm 0,06$ g) e FC 50 mg/kg/dia e também induziram a diminuição do baço ($0,38 \pm 0,04$ g) ($p < 0,05$). Não foram constatadas mortes durante o tratamento dos camundongos com a FC ou Cas X, embora os animais tratados com FC e Cas X 25 mg/kg/dia i.p. tenham apresentado diarreia a partir da segunda dose, resultando em perda de peso ao final do tratamento.

Os tumores dos grupos controle negativo [i.p. e oral DMSO 4% (**Figuras 2A e B**, respectivamente)] e grupos tratados com FC e Cas X 10 mg/kg/dia i.p. e FC e Cas X 25 mg/kg/dia via oral (**Figuras 2D e F**) apresentaram características de malignidade (anaplasia), consistindo em células redondas e poliédricas com anisocariose, binucleação, mitoses comuns, diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear, grandes áreas de invasão muscular e pontos de necrose de coagulação. Análise dos grupos que receberam 5-FU (**Figura 2C**), FC e Cas X 25 mg/kg/dia i.p. (**Figura 2E**) e 50 mg/kg/dia por via oral (**Figura 2G**) mostraram, como descrito acima, morfologia típica de células neoplásicas, mas esses grupos demonstraram mitoses raras e áreas de necrose de coagulação mais frequentes.

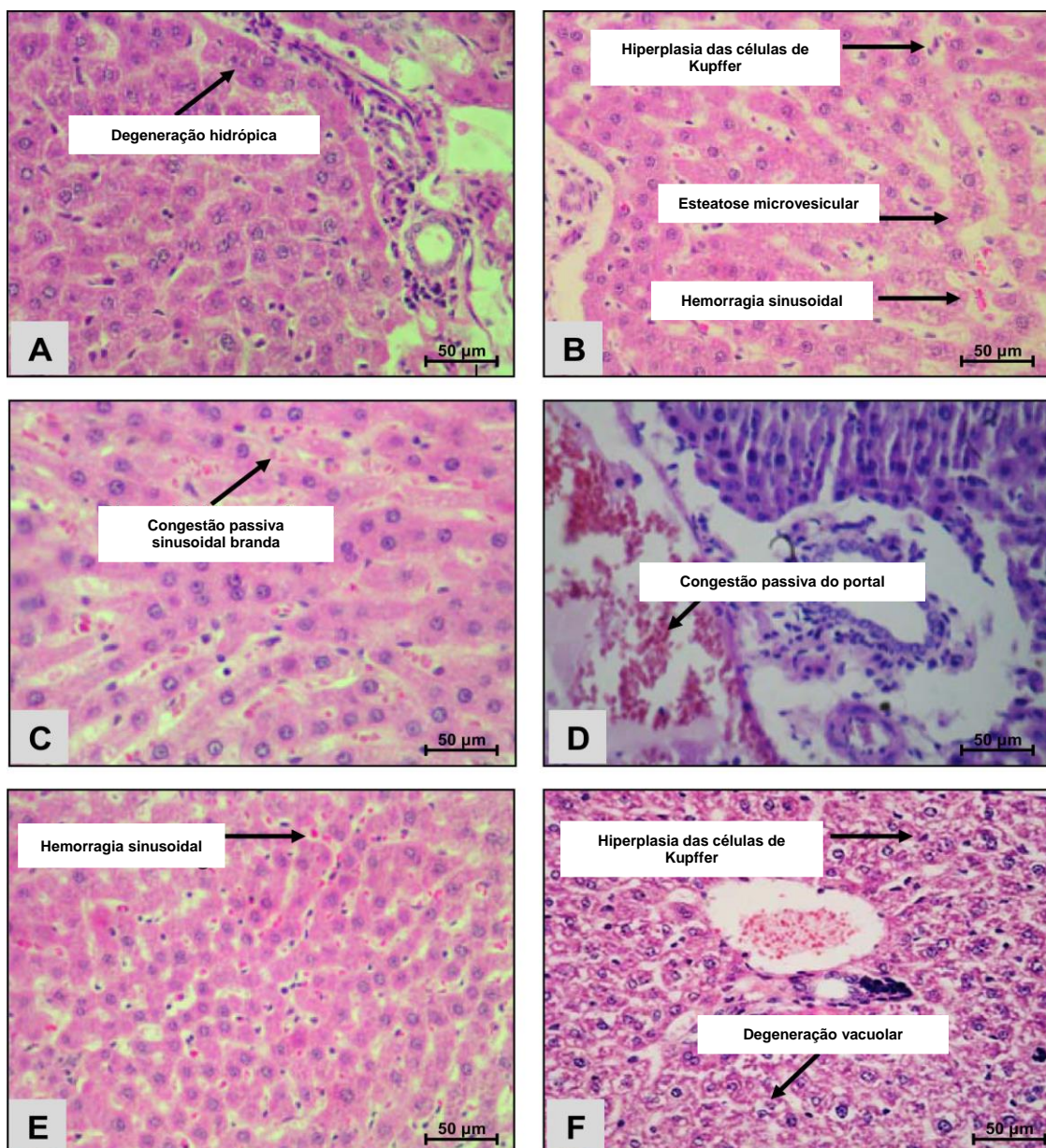
Figura 2 – Fotomicrografia mostrando aspectos morfológicos do tumor Sarcoma 180 em camundongos Swiss após 7 dias de tratamento com uma Fração com Casearinas extraída de *Casearia sylvestris*. Os animais foram tratados por injeção (10 e 25 mg/kg/dia: D e E) ou gavagem (25 e 50 mg/kg/dia: F e G, respectivamente). O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a substância (4% de DMSO i.p. e oral; A e B). 5-Fluorouracil foi usado como controle positivo i.p. (C). Coloração com hematoxilina-eosina. Barra de escala = 50 μ m.



Órgãos dos animais do grupo controle negativo não apresentaram sinais de toxicidade hepática, embora alguns pontos de edema celular (degeneração vacuolar) (**Figura 3A**) e rins com hemorragia glomerular e tubular leves tenham sido encontrados (**Figura 4A**). Baços com folículos visíveis e muitos megacariócitos também foram observados. Os estômagos não apresentavam estrias de hemorragia, a região da cárdia apresentava cobertura escamosa queratinizada sem alterações diagnosticada nas regiões da cárdia, fundo e corpo e pilórica e nas células parietais e zimogênicas, e visualizadas mucosa e submucosa normais. Por outro lado, as investigações mostraram que apenas Cas X 25 mg/kg/dia i.p. foi capaz de induzir alterações histopatológicas significativas em tecido hepático, uma vez que a toxicidade foi diagnosticada por áreas focais de células inflamatórias, congestão passiva do

portal em veia centrolobular (**Figura 3D**). Além disso, degeneração vacuolar mais visível foi encontrada em animais tratados com Cas X com 50 mg/kg/dia por via oral (**Figura 3F**).

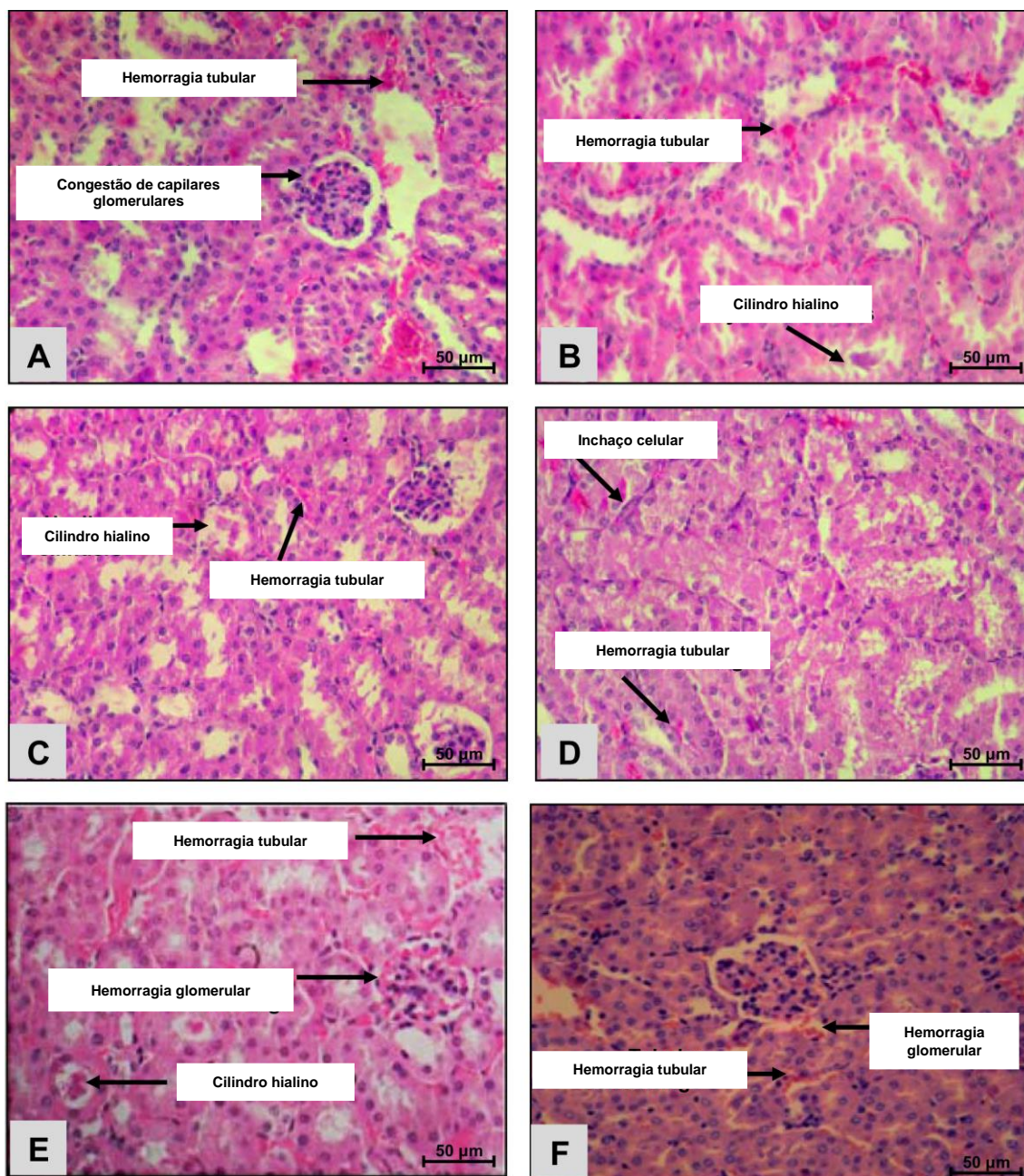
Figura 3 – Fotomicrografia em tecido hepático de camundongos tratados com Casearina X isolada das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. Doses de 10 (C) e 25 mg/kg/dia i.p. (D) e 25 (E) e 50 mg/kg/dia oral (F) durante 7 dias. Controle negativo (DMSO 4%) (A). 5-Fluorouracil (5-FU) foi usado como controle positivo (B). Coloração com Hematoxilina-Eosina. Barra de escala = 50 μ m.



Os rins dos animais que receberam 25 mg/kg/dia i.p. de Cas X mostraram aspecto macroscopicamente esbranquiçado quando comparado

com o controle negativo e, microscopicamente, houve hemorragia glomerular e tubular com intenso aumento de volume das células tubulares e presença de cilindros hialinos (**Figura 4D**). O foco de hemorragia e os cilindros hialinos também foram observados em todos os outros grupos (**Figura 4**). Baços dos grupos FC e Cas X a 25 mg/kg/dia i.p. e FC 50 mg/kg/dia oral mostrou diminuição no tamanho dos folículos. Os estômagos foram semelhantes aos animais de controle negativo e alterações morfológicas nos grupos tratados com FC e Cas X não foram detectadas, apesar do aumento significativo dos pesos relativos.

Figura 4 – Fotomicrografia de tecido renal de camundongos tratados com Casearin X isolada das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. Doses de 10 (C) e 25 mg/kg/dia i.p. (D) e 25 (E) e 50 mg/kg/dia oral (F) durante 7 dias. O controle negativo (A) recebeu DMSO 4%. 5-Fluorouracil (5-FU) foi usado como controle positivo (B). Coloração com Hematoxilina-Eosina. Aumento em microscopia de luz de 400x. Barra de escala = 50 μ m.



3.1.2 Perfil dos glóbulos brancos do sangue periférico

Camundongos Swiss portadores de Sarcoma 180 e tratados com FC também foram analisados quanto à contagem de glóbulos brancos. Foi encontrado um decréscimo no número total de leucócitos no grupo 5-FU ($2,6 \times 10^3/\mu\text{L}$) devido à redução de monócitos ($0,1 \pm 0,01 \times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos ($0,1 \pm$

$0,002 \times 10^3/\mu\text{L}$) e linfócitos ($2,4 \pm 0,2 \times 10^3/\mu\text{L}$). Por outro lado, houve aumento de neutrófilos ($5,0 \pm 0,3 \times 10^3/\mu\text{L}$) e redução de linfócitos ($2,0 \pm 0,1 \times 10^3/\mu\text{L}$) em animais tratados com FC 25 mg/kg/dia i.p. (**Tabela 2**, $p < 0,05$), embora não tenham sido observadas alterações em relação ao número total de leucócitos quando comparado ao controle negativo ($8,8 \pm 0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$), presumivelmente devido à compensação na contagem geral ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Perfil das células brancas do sangue periférico de camundongos Swiss portadores de Sarcoma 180 após tratamento intraperitoneal ou oral durante 7 dias com a fração com casearina extraída de folhas de *Casearia sylvestris*.

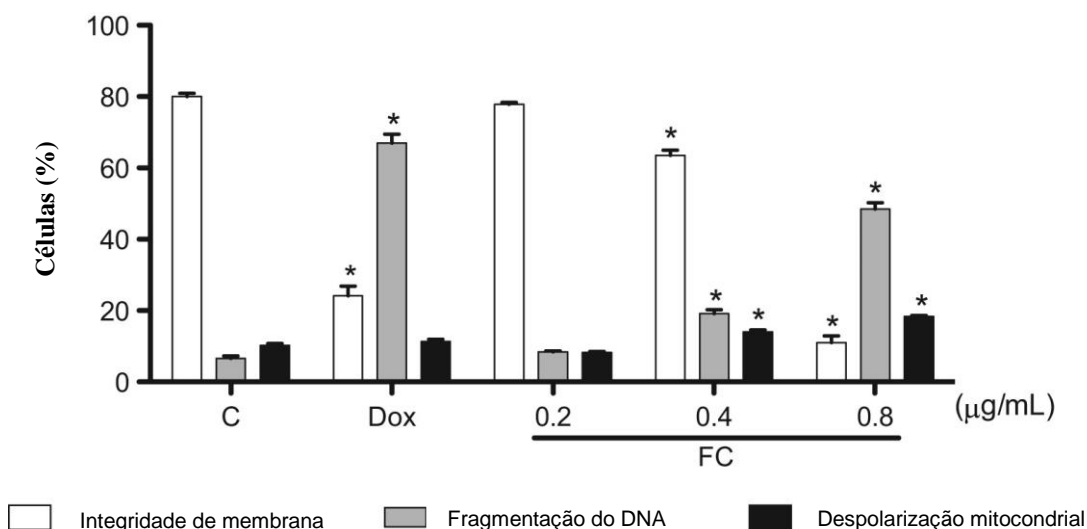
Via de administração	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Leucócitos Totais ($10^3/\mu\text{L}$)	Contagem diferencial de leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)			
				Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
Intraperitoneal	Controle	–	8,8 ± 0,6	0,1 ± 0,01	4,7 ± 0,7	3,7 ± 0,5	0,28 ± 0,1
	5-FU	25	2,6 ± 0,1*	0,0 ± 0,0	2,4 ± 0,2*	0,1 ± 0,002*	0,1 ± 0,01*
	FC	10	7,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	3,9 ± 0,1	3,0 ± 0,6	0,3 ± 0,1
		25	7,3 ± 0,7	0,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1*	5,0 ± 0,3*	0,3 ± 0,1
Oral	Controle	-	6,5 ± 0,9	0,1 ± 0,1	3,7 ± 0,9	2,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1
	FC	25	8,4 ± 0,8	0,2 ± 0,1	4,1 ± 0,4	3,7 ± 0,5	0,4 ± 0,1
		50	6,9 ± 0,6	0,2 ± 0,1	3,4 ± 1,1	2,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1

Valores correspondem a médias ± E.P.M., n=10 animais/grupo. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir as amostras (4% de DMSO). O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) foi usado como controle positivo. *p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações Student Newman-Keuls.

3.1.3 Alterações fenotípicas em células de S-180

Os resultados revelaram que a FC nas concentrações de 0,4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ reduz a integridade de membrana ($63,5 \pm 1,5$ e $11 \pm 1,8\%$), causa fragmentação do DNA ($19,1 \pm 1,1$ e $48,4 \pm 1,8\%$) e induz despolarização mitocondrial ($14,0 \pm 0,5$ e $18,3 \pm 0,3\%$) em culturas primárias de células S-180 quando comparadas com o controle negativo ($80,0 \pm 0,1$; $6,7 \pm 0,6$ e $10,3 \pm 0,4\%$), respectivamente, após 24 h de exposição (**Figura 5**). A doxorubicina também causou alterações semelhantes ($p < 0,05$).

Figura 5 - Efeitos da fração com casearinas (FC) em culturas primária de células Sarcoma 180 *ex vivo* após exposição de 24 h e análise por citometria de fluxo. A integridade da membrana celular foi avaliada pela exclusão do iodeto de propídio. A avaliação da fragmentação do DNA foi realizada por fluorescência nuclear usando iodeto de propídio, triton X-100 e citrato. O potencial transmembranar mitocondrial foi determinado pela retenção de rodamina 123. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo usado para diluir a substância testada. Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (Dox). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de medição (E.P.M.) de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.



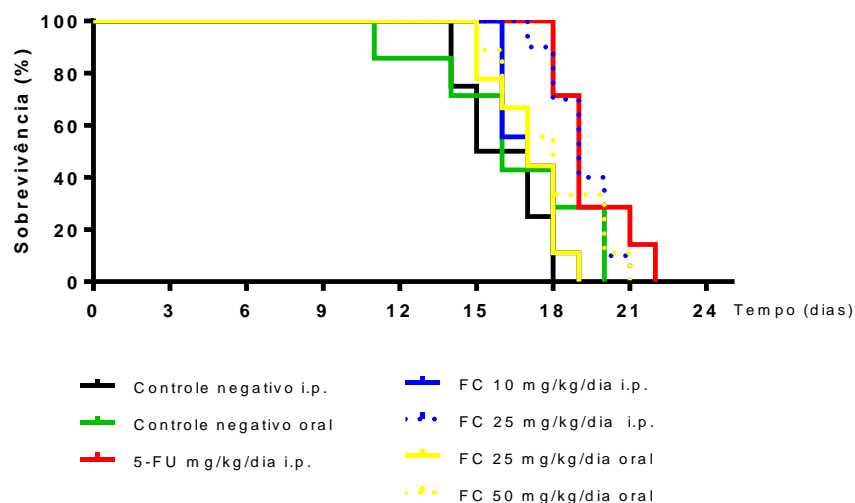
3.1.4 Relaxamento de DNA

A ação da FC sobre atividade de topoisomerasas I e II avaliada em experimentos de relaxamento de DNA plasmidial superenrolado não revelou alterações topológicas de DNA (0,01; 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, a camptotecina e o etoposídeo, utilizados como controles, inibiram a atividade das topoisomerasas I e II, respectivamente.

3.1.5 Sobrevida

As primeiras mortes de camundongos ocorreram a partir do décimo primeiro dia nos animais pertencentes ao grupo controle negativos tratados por via oral. O grupo tratado com o quimioterápico 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia i.p. apresentou os animais com uma maior sobrevida, seguidos pelos grupos FC 25 mg/kg/dia oral e i.p. com 22 e 21 dias, respectivamente (**Figura 6**), mas nenhuma das doses testadas da FC foi capaz de aumentar a sobrevida de forma estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 6 - Sobrevida de camundongos portadores do tumor murino S-180.



4 DISCUSSÃO

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer estima que 14,1 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados em 2017. Atualmente, as pesquisas que buscam novas substâncias anticâncer vêm apresentando uma mudança em seu foco: da quimioterapia citotóxica generalizada para uma mais seletiva, o que tem levado a melhores resultados clínicos (EFFERTH, 2017; PINTO, SILVA, 2017).

Em relação à espécie *C. sylvestris* Sw., estudos químicos têm isolado diferentes diterpenos, cujas moléculas exibem notável atividade *in vitro* e *in vivo* para diferentes linhagens histológicas de cânceres humanos e murinos,

como Ehrlich, Lewis, Células S-180, leucemias (HL- 60, CEM, K-562), colón (HCT, HCT-8, HCT-116), mama (MDA/MB-231, Hs578-T, MX-1, MCF-7), melanoma (MDA/MB-435, A2058, B-16/F10, B16F10-Nex2), próstata (PC-3, DU-145), ovário (A-2780), pulmão (LX-1, A-549), carcinoma cervical (HeLa) e glioblastoma (SF-295) (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; OBERLIES et al., 2002; SILVA et al., 2008c, 2009; WANG et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; FELIPE et al., 2014; BOU et al., 2015).

Com base no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial quimioterápico, a atividade *in vivo* da FC e Cas X foi primeiramente avaliada utilizando camundongos Swiss transplantados com células tumorais S-180, um modelo experimental de sarcoma extensivamente aplicado na busca por produtos com ação antitumoral (ITOKAWA et al., 1990; BEZERRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010; FERREIRA et al., 2011b; MILITÃO et al., 2012).

O Sarcoma 180 (S-180) foi inicialmente identificado no Croker Laboratory (Columbia University, New York) no ano de 1914. É caracterizado como sendo um tumor de natureza sólida e transplantável, o que torna viável seu uso em laboratórios de pesquisas e que inicialmente foi classificado como tumor espontâneo de linhagem epitelial, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Em 1919, após muitos transplantes subcutâneos, assumiu aspecto sarcomatóide. Somente em 1951, após inoculação intraperitoneal de fluido leitoso de S-180 sólido em camundongos, desenvolveu-se a forma ascítica do tumor nos animais (SCHABEL et al., 1977).

A regressão de tumores em animais, a redução do crescimento de tumores sensíveis e/ou aumento da expectativa de vida são fatores diretamente relacionados à atividade antineoplásica (SCHABEL, 1977; SILVA et al., 2009). Schabel (1977) mostrou que melhores resultados dependem do procedimento de tratamento, o qual deve ser iniciado dentro de 48 h após o transplante do tumor. Neste momento, as células tumorais já iniciaram a formação de nódulos tumorais. Com base nessas indicações, o tratamento foi realizado dentro de 24 h após a inoculação com S-180. Após 7 dias de administração, FC e Cas X foram capazes de causar, aproximadamente, até

90% de redução da massa tumoral. Em alguns animais, os tumores não foram macroscopicamente detectados.

Uma vez que os animais tratados com FC causaram potente redução nos tumores S-180, foram realizadas análises bioquímicas *ex vivo* por citometria de fluxo na tentativa de compreender esta ação biológica. Anteriormente, nosso grupo já demonstrou atividades citotóxicas promissoras da FC e Cas X em cultura primária de células S-180, cujos valores de CI_{50} são de 0,60 e 1,61 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FERREIRA et al., 2014).

A citotoxicidade da FC previamente descrita foi confirmada por estudos mais detalhados em citômetro de fluxo. A FC causou redução da integridade da membrana, indução de fragmentação do DNA e despolarização mitocondrial. De fato, relatos anteriores indicaram apoptose como a principal via pela qual os diterpenos clerodânicos ativam a morte celular e que Cas X causa fragmentação de DNA consideravelmente precoce, em aproximadamente 6 h após a exposição (HUANG et al., 2004; FERREIRA et al., 2010, 2014), explicando, em parte, os valores significativos de necrose após 24h de tratamento, o que pode representar apoptose tardia e/ou necroptose.

Apesar da atividade antitumoral oral da FC e Cas X, a ação via intraperitoneal foi notoriamente superior com ambas as substâncias testadas. Os parâmetros farmacocinéticos podem alterar a ação anticâncer *in vivo* quando a substância é administrada por via oral, pois a absorção é governada por vários fatores, como área de absorção, tempo de trânsito, fluxo sanguíneo e pH gástrico e intestinal (barreiras de absorção) e pelo metabolismo hepático, uma vez que substâncias exógenas orais estão susceptíveis à biotransformação (metabolismo de primeira passagem) (UNDEVIA et al., 2005). É possível que o ácido gástrico cause a hidrólise ácida e, posteriormente, induza a abertura do anel diacetálico constituído pelos carbonos 18 e 19 dos diterpenos clerodânicos, resultando em alterações estruturais. De fato, a hidrólise ácida e outras reações que abrem este anel levam à instabilidade molecular e à perda de efeitos antiproliferativos, como observado com a Casearina X dialdeído e o ácido (-)-hardvíquico (FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Assim, tais achados podem explicar, pelo menos em parte, a redução ou a perda da atividade antitumoral de FC e Cas X quando administrados por via oral em camundongos portadores de S-180.

Investigações anteriores com extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* Sw. na dose de 100 mg/kg/dia i.p. mostrou uma potente atividade antitumoral em camundongos transplantados com células S-180 e inibição do crescimento tumoral variando de 87% a 98% (ITOKAWA et al., 1990). Estudos bioguiados de Itokawa et al. (1990) resultaram na purificação de seis novos diterpenos clerodânicos (Casearina A, B, C, D, E e F) e mostraram a Casearina C como a molécula mais ativa. Nesse estudo, tal bioatividade foi similar, uma vez que ambas as substâncias analisadas (FC e Cas X), quando administradas via intraperitoneal também apresentaram taxas inibitórias de crescimento tumoral variando entre 86,2% e 90,0%. Almeida (2000) também demonstrou que o extrato alcoólico de folhas de *C. sylvestris* Sw. inibiu o crescimento do tumor de Ehrlich e apresentou atividade anti-inflamatória na dose de 300 mg/kg/dia. Felipe et al. (2014) mostraram que o tratamento com extrato etanólico aquoso bruto (CAE) e com a fração clorofórmica (f-CHCl₃) de folhas de *C. sylvestris* Sw. causou o decréscimo do crescimento tumoral em camundongos portadores de do tumor ascítico de Ehrlich (40% e 60%, respectivamente), Os efeitos antiproliferativos *in vivo* foram confirmados pelos métodos de absorção de ³H-timidina e exclusão do corante azul de tripan.

Da mesma forma, dois compostos derivados de ácido gálico isolados de folhas de *C. sylvestris* Sw. - isobutil galato-3,5-dimetil éter (IGDE) e metil galato-3,5-dimetil éter (MGDE) – que mostraram potencial quimioterápico significativo contra tumor de Ehrlich e células tumorais ascíticas de pulmão de Lewis aumentaram a sobrevivência dos animais (aproximadamente 90%), embora o IGDE possua uma atividade ligeiramente superior quando comparado com a MGDE variando de 86,2 a 90,0% (SILVA et al., 2009).

Análises da toxicidade em órgãos chave indicam o fígado e os rins como alvos principais para FC e Cas X, especialmente em grupos tratados via i.p. Resultados semelhantes foram descritos por Araújo et al. (2015) sobre alterações hepáticas, pois a congestão vascular e a degeneração hidrópica foram aparentes nos grupos FC (2,5; 5 e 25 mg/kg/dia) e foi detectada ligeira infiltração perivascular associada à necrose com FC 2,5 mg/kg/dia. O rim e fígado são propostos como principais órgãos alvo para contaminantes ambientais, medicamentos e outros xenobióticos, uma vez que essas substâncias geralmente têm baixa solubilidade em sistemas aquosos e

requerem biotransformação nos hepatócitos para metabólitos que são mais hidrofílicos e mais facilmente eliminados na urina. As reações de biotransformação geralmente seguem um processo de desintoxicação que torna os metabólitos inativos. No entanto, muitos compostos intermediários gerados durante o metabolismo de medicamentos são altamente reativos e tóxicos, causando hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (WILLIAMS et al., 2002; RAMAIAH, 2007). Felizmente, o fígado e os rins também possuem uma capacidade regenerativa pronunciada e ação compensatória e, mesmo quando há necrose com preservação da MEC, freqüentemente há restauração completa do tecido (KUMAR et al., 2004). Nesse contexto, todas as alterações morfológicas observadas nos animais tratados podem ser consideradas potencialmente reversíveis.

As alterações sanguíneas nos níveis de neutrófilos e linfócitos foram mais leves em comparação com os animais tratados com 5-FU, os quais demonstraram diminuição de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Infelizmente, os medicamentos antineoplásicos em uso clínico geralmente causam supressão hematológica e imunológica, como observado com o docetaxel (RINGEL, HORWITZ, 1991), metotrexato (KATZUNG et al., 2003) e 5-FU (BEZERRA et al., 2008). A maioria deles está disponível apenas para administração intravenosa, e esse tipo de tratamento é muito caro devido aos custos de hospitalização. Portanto, o desenvolvimento de agentes citotóxicos orais novos e eficazes tem grande interesse social e econômico (ISMAEL et al., 2008), mas uma substância com capacidade antitumoral oral, como FC ou Cas X, é incomum principalmente devido aos efeitos de primeira passagem (UNDEVIA et al., 2005).

5 CONCLUSÃO

A fração rica em casearinas e o isolado Casearina X extraídos das folhas de *C. sylvestris* Sw. revelaram ser promissores antitumorais por via intraperitoneal e oral, causando alterações morfológicas reversíveis no fígado, rins e baço. Os estudos *ex vivo* sugerem a necroptose como o principal modo pelo qual é desencadeada a morte celular. Juntos, esses achados corroboram o uso popular de *C. sylvestris* Sw. contra diferentes tipos de câncer e enfatizam

a reputação dos diterpenos clerodânicos como uma classe emergente de moléculas anticâncer.

REFERÊNCIAS

ABOIN, E.; ARQUERO, P.; BALBOA, V. Prostaglandina PGE, análogo sintético misoprostol no manuseio de lesões de mucosa gástrica induzidas por etanol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 277-283, 1987.

ARAÚJO, E. J. F.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 355-361, 2014.

ARAÚJO, É. J.; OLIVEIRA, G. A.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1791-1807, 2015.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-197, 1990.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BIERMANN, H.; PIETZ, B.; DREIER, R.; SCHMID, K. W.; SORG, C.; SUNDERKÖTTER, C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 2, p. 217-231, 1999.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

BOU, D. D.; SANTOS, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; FARIAS, C. F.; MATSUO, A. L.; KITAMURA, R. O. S.; GIMENES, L.; LAGOA, J. H. G.; SARTORELLI, P. Dinor Casearin X, a new cytotoxic clerodane diterpene from *Casearia sylvestris*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 8, p. 1725-1729, 2015.

BRANT, N. M. F.; GASPAROTTO, F. M.; ARAÚJO, V. O.; MARASCHIN, J. C.; RIBEIRO, R. C. L.; LOURENÇO, E. L. B.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 419-427, 2014.

CARVALHO, P. R.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; KINGSTON, D. G.; BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.

CLAUDINO, J. C.; SACRAMENTO, L. V.; KOCH, I.; SANTOS, H. A.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; SANTOS, A. G. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1253-1265, 2013.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPÉIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 721-732, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

EFFERTH, T. Cancer combination therapy of the sesquiterpenoid artesunate and the selective EGFR-tyrosine kinase inhibitor erlotinib. **Phytomedicine**, v. 37, p. 58-61, 2017.

ESTEVEZ, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 191-196, 2005.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; SILVA, F. O.; BÜCKER, N. F.; FARIAS, M. S.; CASTRO, L. S.; SOUZA GRINEVICIUS, V. M.; MOTTA, N. S.; CORREIA, J. F.; ROSSI, M. H.; PEDROSA, R. C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.3, p. 1492-1499, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W.; MARTINS, A. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011a.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. F. U. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011b.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C.; LIMA, D. J.; COSTA, N. D.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, n. 1, p. 112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, n. 1, p. 270-279, 2016.

HUANG, D. M.; SHEN, Y. C.; WU, C.; HUANG, Y. T.; KUNG, F. L.; TENG, C. M.; GUH, J. H. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 503, n. 1-3, p. 17-24, 2004.

ISMAEL, G. F.; ROSA, D. D.; MANO, M. S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs: old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 1, p. 81-91, 2008.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F,

for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

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

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

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MENEZES, P. R.; SCHWARZ, E. A.; SANTOS, C. A. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 398-400, 2004.

MILITÃO, G. C.; DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 479-487, 2012.

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

MOSADDICK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 461-466, 2004.

PINTO, D. C. G. A.; SILVA, A. M. S. Anticancer Natural Coumarins as Lead Compounds for the Discovery of New Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 29, p. 3190-3198, 2017.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551-1557, 2007.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 4, p. 288-291, 1991.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; GOMES TININIS, A.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of

cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 411-435, 1977.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; BEATRIZ, O.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINÁRIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1-2, p. 219-229, 1988.

SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA(2) activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 2008a.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; DAMICO, D. C. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008b.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008c.

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

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVEIRA, A. M.; SANTOS, A. G.; SANTOS, R. A.; CSIPAK, A. R.; OLIVATO, C.; SILVA, I. C.; FREITAS, M. B.; BASSI, C. L.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; TAKAHASHI, C. S.; SOARES, C. P. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, v. 24, n. 6, p. 501-506, 2009.

UNDEVIA, S. D.; GOMEZ-ABUIN, G.; RATAIN, M. J. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 6, p. 447-458, 2005.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y. H.; SMILLIE, T. A.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, n. 13, p. 436-441, 2009.

WAYNFORTH, B. H. **Injection techniques: Experimental and surgical techniques in the rat**. Academic Press, London, 1980.

WILLIAMS, D. P.; KITTERINGHAM, N. R.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; SMITH, D. A.; PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 351-366, 2002.



CAPÍTULO II

Ação antineoplásica da fração acetato de etila obtida de *Casearia sylvestris* em modelos xenográficos de tumores sólidos

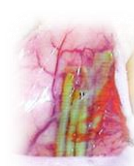
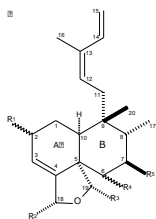
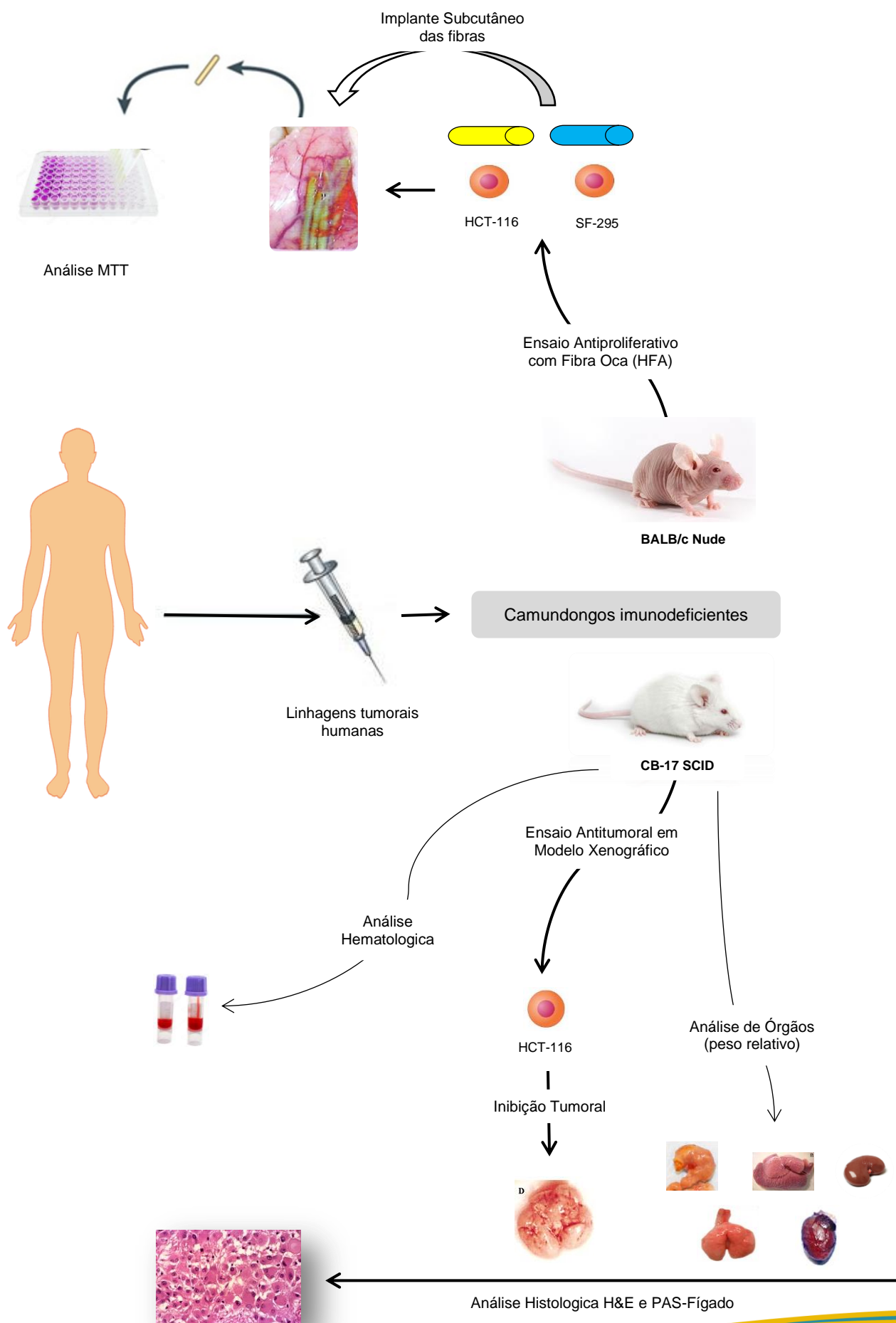


GRÁFICO RESUMO



RESUMO

Casearia sylvestris Swart pertence, tradicionalmente, à família Salicaceae e tem demonstrado interesse de pesquisadores devido à promissora atividade citotóxica inicialmente relatada em ensaios *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas em modelos *in vivo* induzida por uma fração rica em diterpenos clerodânicos (FC) extraída da espécie vegetal *C. sylvestris* Sw.. Foram utilizadas duas linhagens de camundongos imunodeficientes (CB-17 SCID e BALB/c Nude). Neste estudo, culturas de HCT-116 (carcinoma do cólon) e SF-295 (glioblastoma) foram utilizadas no teste de HFA e HCT-116 em modelo antiproliferativo xenográfico. No teste de HFA a FC reduziu a multiplicação de células neoplásicas em todas as doses testadas (2,5 e 5 mg/kg/dia i.p. e 25 e 50 mg/kg/dia oral), com taxas de inibição de crescimento celular de 66,7%, 64,3% , 44,9% e 56,9% para células SF-295 e 47,4%, 45,4%, 51,9% e 67,4% para células HCT-116, respectivamente ($p < 0,05$). No ensaio xenográfico houve uma redução significativa dos tumores dos animais tratados com a FC em ambas as vias de administração. Não foram observadas alterações significantes no peso relativo dos órgãos e nos parâmetros hematológicos. Fotomicrografias dos tumores de HCT-116 revelaram alterações relevantes além de morte celular por necrose observada apenas no grupo tratado com FC 10 mg/kg/dia i.p.. Após análises histológicas em tecido hepático corado com HE, foi constatado degeneração vacuolar, com destaque para os grupos tratados com FC 10 mg/kg/dia (i.p. e v.o.) que apresentaram essa alteração de forma mais intensa e depósito de glicogênio. Pontos hemorrágicos foram observadas nos rins dos animais de todos os grupos, seguida de congestão vascular nos grupos tratados com a FC 10 mg/kg/dia (i.p. e v.o.). Com base neste estudo, a fração rica em casearinas apresenta-se eficiente em estudos *in vivo* contra células de carcinoma de cólon humano (HCT-116) e glioblastoma humano (SF-295) inoculados em camundongos imunodeficientes e tratados por via intraperitoneal e oral, não causando alterações significativas nos parâmetros hematológicos e lesões morfológicas reversíveis no fígado e rim. Juntos, esses achados corroboram com a importância das pesquisas em desenvolvimento e o uso popular de *C. sylvestris* Sw. para fins terapêuticos como proposto pelo Sistema Único de Saúde (SUS), destacando os diterpenos do tipo clerodânicos como uma classe promissora de moléculas anticâncer.

Palavras-chave: xenográfico, fibra oca, antiproliferativo, anticâncer.



ABSTRACT

Casearia sylvestris Swart has traditionally belonged to the family Salicaceae and has shown interest from researchers due to the promising cytotoxic activity initially reported in *in vitro* assays. The objective of this work was to evaluate the antiproliferative activity in human tumor cell lines *in vivo* models induced by a fraction rich in clerodanic diterpenes (FC) extracted from the plant species *C. sylvestris* Sw .. Two lines of immunodeficient mice (CB- 17 SCID and BALB/c Nude). In this study, cultures of HCT-116 (colon carcinoma) and SF-295 (glioblastoma) were used in the HFA and HCT-116 in a xenograft antiproliferative model. In the HFA test, FC reduced the multiplication of neoplastic cells at all doses tested (2.5 and 5 mg/kg/day i.p. and 25 and 50 mg/kg/day orally), with inhibitory rates of cell growth of 66.7%, 64.3%, 44.9% and 56.9% for SF-295 cells and 47.4%, 45.4%, 51.9% and 67.4% for HCT-116 cells, respectively ($p < 0.05$). In the xenographic assay there was a significant reduction of the tumors of FC treated animals in both administration routes. No significant changes were observed in the relative weight of the organs and in hematological parameters. Photomicrographs of HCT-116 tumors revealed relevant changes in addition to necrotic cell death observed only in the FC 10 mg/kg/day i.p.. After histological analysis in hepatic tissue stained with HE, vacuolar degeneration was observed, with emphasis on the groups treated with FC 10 mg/kg/day (i.p. and o.v.) that presented this alteration in a more intense form and glycogen deposition. Hemorrhagic spots were observed in the kidneys of the animals of all groups, followed by vascular congestion in the groups treated with FC 10 mg/kg/day (i.p. and o.v.). Based on this study, the casearin-rich fraction is efficient in *in vivo* studies against human colon carcinoma (HCT-116) and human glioblastoma (SF-295) cells inoculated in immunodeficient mice and treated intraperitoneally and orally, causing no significant changes in hematological parameters and reversible morphological lesions in the liver and kidney. Together, these findings corroborate the importance of research in development and the popular use of *C. sylvestris* Sw. For therapeutic purposes as proposed by the Unified Health System (SUS), highlighting diterpenes of the clerodan type as a promising class of anticancer molecules.

Key words: xenographic, hollow fiber, antiproliferative, anticancer



1 INTRODUÇÃO

Divisões celulares sucessivas são susceptíveis a uma variedade de erros derivados de mutações, metilações, aberrações cromossômicas, da distribuição dos determinantes do destino celular entre as células-filhas e falhas na restauração das interações físicas com outros componentes do tecido. Alguns desses erros são espontâneos, outros são promovidos por danos endógenos ao DNA que ocorrem durante a quiescência, e outros são influenciados por fatores patológicos e ambientais. Porém, no final, todos favorecem pelo menos uma das etapas da carcinogênese (HANAHAN, WEINBERG, 2011; FERREIRA; PESSOA, 2017; LÓPEZ-LÁZARO, 2018).

Deve ser levada em consideração, ainda, a grande diversidade genética e a instabilidade genômica encontradas nas células tumorais que podem contribuir para a ampla heterogeneidade fenotípica, complicam o tratamento e facilitam a manifestação de resistência(s) e recaída(s) que podem surgir em qualquer estágio do desenvolvimento do câncer (HANAHAN, WEINBERG, 2011; McCUBREY et al., 2015). Nesse cenário, compostos naturais surgem como alternativa para superar a resistência tumoral de formas agressivas de tumores sólidos, uma vez que cerca de 60% das drogas atualmente utilizadas na quimioterapia antineoplásica têm origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de protótipos naturais, tais como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina, irinotecano e camptotecina. Então, apesar do desenvolvimento de técnicas de síntese química e da química combinatória, os compostos vegetais continuam essenciais para a descoberta de novos agentes antineoplásicos (CRAGG, NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA et al., 2005; BEZERRA et al., 2015; MONÇÃO et al., 2015; SIMÕES et al., 2015).

A descoberta pré-clínica e o desenvolvimento de fármacos anticâncer consistem em uma série de procedimentos de teste, revisão de dados e etapas de decisões (PLOWMAN et al., 1997). Com o avanço das pesquisas por novos agentes anticâncer, os ensaios, inicialmente em modelos *in vitro*, requerem uma demonstração pré-clínica posterior da eficácia *in vivo* em um ou mais modelos animais. A maioria destes modelos *in vivo* requer materiais consideráveis em termos de animais de laboratório, de amostras biológicas para os testes, bem como quantidades substanciais de tempo (e custo) para

determinar se um dado agente experimental ou uma série de agentes tem uma atividade antitumoral mínima (HOLLINGSHEAD et al., 1995).

Em pesquisas recentes, a planta *Casearia sylvestris* Swartz tem demonstrado interesse de pesquisadores devido à sua promissora atividade citotóxica inicialmente relatada em ensaios *in vitro* contra diversas linhagens tumorais (FELIPE et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2016). Considerando a necessidade de novas substâncias anticâncer que possam melhorar as terapias convencionais, bem como fornecer novos agentes citotóxicos para o tratamento antineoplásico, o presente estudo avaliou a atividade antitumoral *in vivo* de uma fração com diterpenos clerodânicos extraída das folhas de *C. sylvestris* Sw..

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra vegetal

As folhas de *C. sylvestris* Sw.. foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, SP) por pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os espécimes de comprovante (AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19) foram depositados no Herbário Maria Eneida P. Kaufmann, do Instituto de Botânica do estado de São Paulo, Brasil. O extrato etanólico das folhas e sua fração foram obtidos conforme descrito por Santos et al. (2010). Resumidamente, o extrato foi fracionado através de uma extração em fase sólida, usando carvão ativado/sílica gel 60–200 μm (1:1, m/m) como fase estacionária, e hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol como a fase móvel, fornecendo três frações, respectivamente. A segunda fração obtida é denominada fração acetato de etila enriquecida com Casearinas (FC). Os registros no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) foram protocolados (#A00892A e #A33EA7A) de acordo com legislação brasileira de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional (Lei 13.123/2015).

2.2 Animais

As linhagens de camundongos imunodeficientes CB-17 SCID (PRKDC^{SCID}) e BALB/c Nude (HFH11^{NU}) foram obtidas em diferentes instituições de pesquisa. Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c Nude (nu/nu) foram obtidos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP). Já os camundongos (fêmeas) da linhagem CB-17 SCID foram obtidos do Instituto Gonçalo Moniz (CEUA, IGM, FIOCRUZ, Bahia, Brasil). Ambos foram mantidos em gaiolas estéreis bem ventiladas (Tecniplast[®], Germain) de acordo com todos os padrões internacionais de produção e manutenção de animais e livres de patógenos específicos (SPF). Da mesma forma, eles foram mantidos em ciclos diurnos e noturnos e com acesso à ração comercial e água *ad libitum* estéril. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI n° 373/17 (CEUA/UFPI) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ-Bahia (n° 006/2015) e estão de acordo com as diretrizes brasileiras (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e internacionais sobre cuidados e uso de animais experimentais (Diretiva 2010/63/UE do Conselho do Parlamento Europeu).

2.3 Ensaio Antitumoral com Fibra Oca - *Hollow Fiber Assay* (HFA)

Neste estudo, culturas de HCT-116 (carcinoma do cólon) e SF-295 (glioblastoma) foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C com 5% de CO₂.

O HFA *in vivo* foi realizado de acordo com Hollingshead et al. (1995). Foram usadas fibras ocas de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) com um diâmetro interno de 1 mm e um ponto de corte de peso molecular de 500 kDa (Spectrum Laboratories, Estados Unidos). As fibras foram cortadas em pedaços de 12 a 15 cm de comprimento, lavadas 2x com água destilada estéril e mantidas em condições estéreis. Antes da utilização, sob condições estéreis, as fibras foram incubadas em RPMI completo com 20% de soro fetal de bovino durante a noite (tempo de embalagem). A viabilidade das células de HCT-116 e SF-295 foi avaliada por ensaio de exclusão de azul de tripan. Uma suspensão celular de 1×10^7 célula/mL (equivalente a 200.000 células/20µL/2cm de fibra)

foi depositada a 4°C na fibra, com as suas extremidades imediatamente seladas por calor. As fibras foram cortadas em 2 cm cada, transferidas para placas de petri e incubadas em meio RPMI completo durante 24 h antes da implantação em camundongos BALB/c Nude (*nu/nu*). Cada linhagem celular tumoral foi adicionada no interior de fibras de cores diferentes (HCT-116, fibras amarelas; SF-295, fibras azuis).

Posteriormente, os camundongos foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (4,5 mg/kg). Uma pequena incisão foi realizada no dorso para permitir a implantação subcutânea (s.c.) de duas fibras na região dorsal. Todos os cortes foram fechados com grampeador cirúrgico. Os tratamentos começaram no dia seguinte e duraram 4 dias consecutivos. Para isto, os animais foram divididos em seis grupos (n=6/grupo) como se segue: controle negativo (4% de DMSO i.p. e oral), controle positivo (5-FU, 20 mg/kg/dia i.p.), FC i.p. (2,5 e 5 mg/kg/dia) e FC oral por gavagem (25 e 50 mg/kg/dia). No 5º dia, as fibras foram removidas para medir a capacidade antiproliferativa.

A proliferação de células tumorais foi quantificada utilizando o ensaio MTT (MOSMANN, 1983). Para este propósito, fibras retiradas dos animais foram incubadas com 1 mg/mL de MTT em placas de 6 poços durante 4 horas, em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂. A solução de MTT foi aspirada, as fibras foram lavadas com solução salina contendo sulfato de protamina a 2,5% e incubadas em solução de protamina durante a noite a 4 °C. As fibras foram cortadas em 2 ou 3 pedaços menores, transferidas para placas de 24 poços e colocadas para secar. Os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO puro e transferidos para placas de 96 poços (150 µL/poço). A quantificação da proliferação celular foi determinada por espectrofotometria (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter®). O efeito antitumoral das substâncias foi quantificado como a porcentagem da absorbância em relação ao controle.

2.4 Avaliação Antiproliferativa em Modelo Xenográfico

A eficácia antitumoral *in vivo* foi avaliada em modelo xenográfico e heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes da linhagem CB-17 SCID fêmeas inoculados com células de carcinoma de colón humano, HCT-116 (1,0x10⁷ células/500µL/animal), implantadas subcutaneamente na axila esquerda dos camundongos. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e

diluídos em água destilada (obedecendo à proporção de 5% de DMSO), e o tratamento foi realizado por via intraperitoneal ou oral (gavagem), uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos. Os camundongos foram divididos em sete grupos como se segue: Grupo 1 (grupo controle negativo) - os animais tratados com o veículo DMSO a 5% (i.p., n=17); Grupo 2 (grupo controle positivo via i.p.) - os animais tratados com 5-FU (15 mg/Kg, i.p., n=12); Grupo 3 - os animais tratados com a fração casearina (5 mg/Kg, i.p., n=12); Grupo 4 - os animais tratados com a fração casearina (10 mg/Kg, i.p., n=10); Grupo 5 (grupo controle negativo via oral) - os animais tratados com o veículo DMSO a 5% (v.o., n=16); Grupo 6 - os animais tratados com a fração casearina (10 mg/Kg, v.o., n=10); Grupo 7 - os animais tratados com a fração casearina (25 mg/Kg, v.o., n=12). Os tratamentos foram iniciados um dia após a inoculação. Um dia após o término do tratamento, amostras de sangue periférico dos camundongos foram coletadas, sob anestesia, a partir da veia caudal para análises hematológicas, como descrito posteriormente.

No 16º dia, os animais tratados foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg)/xilazina (4,5 mg/kg) para coleta de sangue de cada animal através de plexo retroorbital (WAYNFORTH, 1980), utilizando tubos estéreis e pipetas heparinizadas para determinar o perfil de leucócitos periféricos e analisados com aumento de 400x em esfregaços de sangue marcados com May-Grünwald-Giemsa (dois por animal), para obter quantidade diferencial de glóbulos brancos (WBC). A contagem absoluta de leucócitos foi calculada como o produto individual de sua respectiva porcentagem diferencial e contagem total de leucócitos (BIERMANN et al., 1999).

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os tumores, fígado, pulmão, coração e rins dos camundongos foram excisados, pesados e observados para detectar quaisquer sinais de lesões graves ou alterações de cor e hemorragia. O percentual de inibição do crescimento tumoral (%) foi calculado conforme fórmula que segue:

$$\text{Percentual de inibição (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

Onde:

- A - peso médio do tumor no controle negativo;
- B - média para cada grupo tratado.

Para avaliação da toxicidade sistêmica, os camundongos foram pesados no início e no fim do experimento e observados quanto a sinais de alterações ao longo do estudo.

Tumores, fígado, coração, rins e pulmões foram fixados em formol tamponado a 10% e, posteriormente, tratados para os procedimentos histotécnicos de rotina, obtendo amostras seccionadas entre 4-7 μm , e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada sob microscopia de luz com aumento de 100 a 400 x.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados estão apresentados como médias \pm erro padrão da média. Possíveis diferenças entre os grupos foram comparadas por one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Ação antiproliferativa em células tumorais humanas em fibra oca (HFA)

Para verificar o potencial antitumoral *in vivo* da FC em células tumorais humanas, primeiramente realizou-se ensaios antiproliferativo em fibra oca - *Hollow Fiber Assay* (HFA). As fibras contendo células tumorais em proliferação foram implantadas subcutaneamente no dorso dos animais hospedeiros, os quais foram, em seguida, tratados com a FC em diferentes doses e vias de administração. No 5º dia, após recuperação das fibras, a proliferação celular foi quantificada em espectrofotômetro de placa pelo ensaio MTT. Como demonstrado na **tabela 1**, a FC reduziu a multiplicação de células neoplásicas em todas as doses testadas (2,5 e 5 mg/kg/dia i.p. e 25 e 50 mg/kg/dia oral), com taxas de inibição de crescimento celular de 66,7%, 64,3% , 44,9% e 56,9% contra células de glioblastoma (SF-295) e de 47,4%, 45,4%, 51,9% e 67,4% contra células de carcinoma de cólon (HCT-116), respectivamente ($p < 0,05$). Uma morte foi registrada em ambos os grupos i.p. e uma na dose de 50 mg/kg/dia por via oral.

Tabela 1 - Ação antitumoral da fração com casearinas (FC) extraída de folhas de *Casearia sylvestris* em células de glioblastoma humano (SF-295) e carcinoma de cólon (HCT-116) determinada pelo ensaio *in vivo* com fibra oca (HFA).

Via de administração	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Sobrevida	Proliferação (absorbância)		Taxa de inibição (%)	
				SF-295	HCT-116	SF-295	HCT-116
	Controle negativo	–	6/6	0,84 ± 0,10	1,02 ± 0,17	–	–
	5-FU	25	6/6	0,52 ± 0,08*	0,59 ± 0,10*	65,4	62,1
Intraperitoneal							
	FC	2,5	5/6	0,28 ± 0,08*	0,48 ± 0,12*	66,7	47,4
	FC	5	5/6	0,30 ± 0,10*	0,50 ± 0,09*	64,3	45,4
	Controle negativo	–	6/6	1,12 ± 0,14	1,01 ± 0,15	–	–
Oral							
	FC	25	6/6	0,62 ± 0,17*	0,49 ± 0,11*	44,9	51,9
	FC	50	5/6	0,48 ± 0,10*	0,30 ± 0,06*	56,9	67,4

Valores correspondem às médias ± E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir o fármaco (4% de DMSO). 5-Fluorouracil (5-FU) foi usado como controle positivo. *p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

3.2 Atividade antitumoral em modelo xenográfico de carcinoma de colón humano

Os camundongos da linhagem CB-17 SCID foram inoculados com células da linhagem HCT-116 e o tratamento foi iniciado um dia após a inoculação. A **tabela 2** apresenta o peso dos tumores e o percentual de inibição observado após o tratamento com a FC. A FC reduziu o crescimento tumoral em ambas às doses administradas via i.p. (5 e 10 mg/kg/dia: $0,69 \pm 0,03$ e $0,74 \pm 0,05$ g) e na dose via oral de 25 mg/kg/dia ($0,70 \pm 0,06$ g) quando comparadas ao grupo controle negativo ($1,08 \pm 0,07$ g) ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Efeito da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* sobre a massa tumoral em camundongos transplantados com carcinoma de colón (HCT-116) após 15 dias de tratamento.

Via de administração	Tratamento	Dose (mg/kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Intraperitoneal	Controle negativo	-	12/12	$1,08 \pm 0,07$	-
	5-FU	15	10/12	$0,69 \pm 0,03^*$	36,34
	FC	5	12/12	$0,74 \pm 0,05^*$	31,12
		10	12/12	$0,66 \pm 0,05^*$	39,27
Oral	Controle negativo	-	12/12	$1,06 \pm 0,04$	-
	FC	10	12/12	$0,99 \pm 0,04$	6,045
		25	12/12	$0,70 \pm 0,06^*$	34,12

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. $*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

3.2.1 Avaliação de parâmetros fisiológicos sistêmicos

O efeito sistêmico da FC nos camundongos também foi avaliado após 15 dias de tratamento. A **tabela 3** apresenta os resultados encontrados em relação à massa corpórea e peso relativo dos órgãos dos animais tratados. Em relação ao peso relativo dos órgãos (fígado, rins, pulmão e coração), nenhuma alteração significativa foi observada ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Efeito da fração com casearinas (FC) obtidas das folhas de *Casearia sylvestris* no peso relativo úmido de órgãos-chave e no peso de camundongos CB-17 SCID transplantados com carcinoma de cólon (HCT-116) após 15 dias de tratamento.

Via de administração	Substância	Dose (mg/kg/dia)	g		g/100g de massa corpórea				
			Peso inicial	Peso final	Fígado	Rim	Pulmão	Coração	Estômago
Intraperitoneal	DMSO 5%	–	22,39 ± 0,82	18,52 ± 0,52	4,91 ± 0,18	1,52 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,62 ± 0,02	-
	5-FU	15	24,13 ± 0,40	19,43 ± 0,44	5,16 ± 0,51	1,66 ± 0,08	0,97 ± 0,07	0,68 ± 0,02	-
	FC	5	23,38 ± 0,51	18,85 ± 0,47	4,71 ± 0,24	1,73 ± 0,04	0,97 ± 0,03	0,67 ± 0,04	-
		10	20,80 ± 1,09	17,13 ± 0,37	5,41 ± 0,29	1,52 ± 0,07	0,81 ± 0,04	0,61 ± 0,03	-
Oral	DMSO 5%	–	22,61 ± 0,79	19,04 ± 0,61	4,81 ± 0,22	1,51 ± 0,06	0,90 ± 0,04	0,60 ± 0,02	1,36 ± 0,13
	FC	10	21,81 ± 1,17	18,25 ± 0,47	4,80 ± 0,19	1,52 ± 0,05	0,86 ± 0,04	0,59 ± 0,02	1,13 ± 0,08
		25	23,38 ± 0,62	19,23 ± 0,41	4,42 ± 0,16	1,60 ± 0,06	0,99 ± 0,05	0,66 ± 0,05	1,35 ± 0,08

Os valores correspondem à média ± E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar a substância teste.

A **tabela 4** apresenta os resultados encontrados em relação aos parâmetros hematológicos. Novamente, não foram observadas alterações significantes ($p > 0,05$).

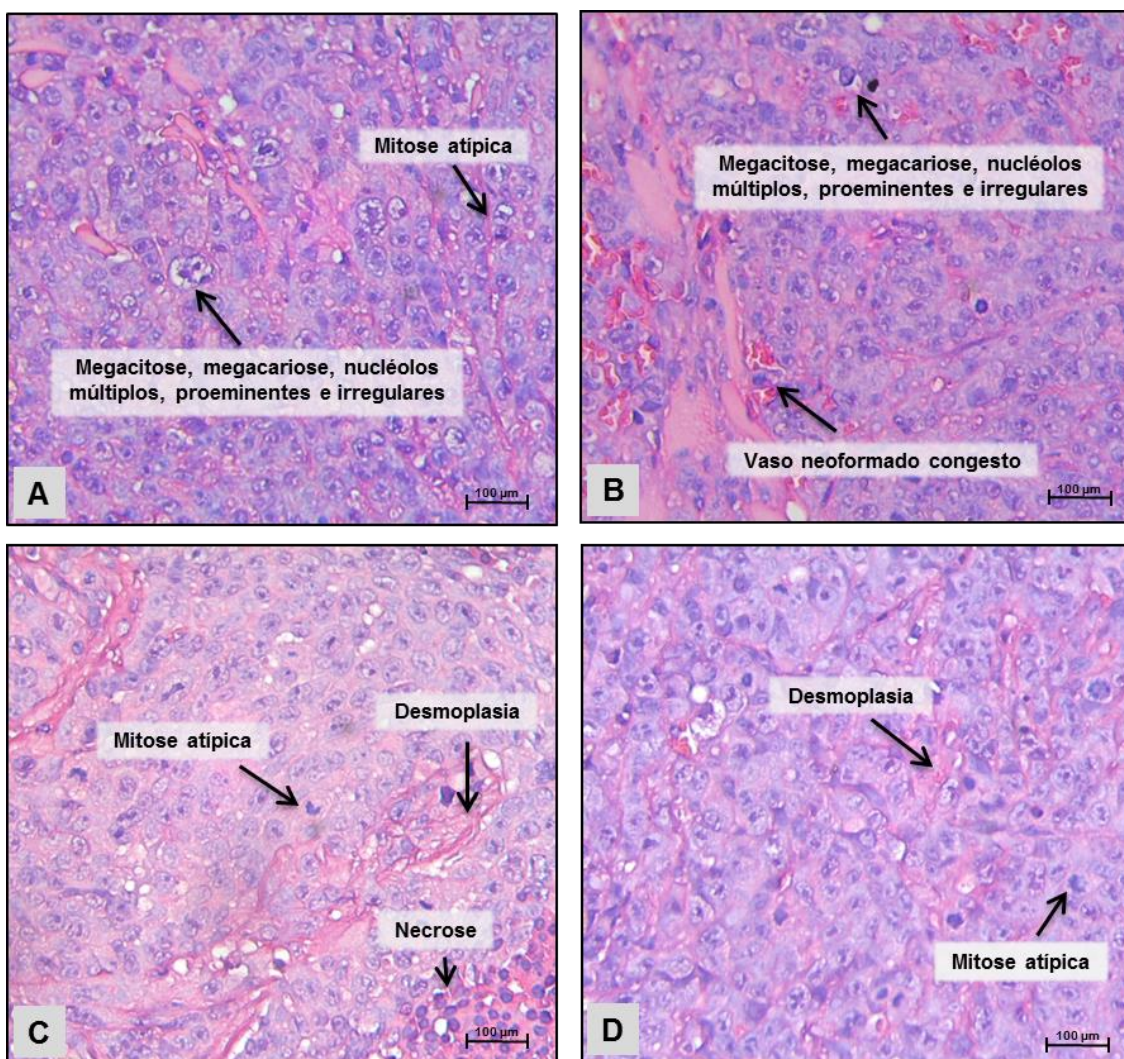
Tabela 4 - Efeito da fração casearina sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos CB-17 SCID após 15 dias de tratamento.

Via de administração	Substância	Dose (mg/kg/dia)	Eritrócitos (10^6 cél/ μ L)	Leucócitos totais (10^3 cél/ μ L)	Contagem diferencial de leucócitos (%)				
					Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
Intraperitoneal	DMSO 5%	–	8,23 \pm 0,30	3,86 \pm 0,34	0	1	73,75	24,25	1
	5-FU	15	7,06 \pm 0,91	2,23 \pm 0,20	0	1	48,00	50,00	1
	FC	5	7,16 \pm 0,90	3,71 \pm 0,72	0	1	47,60	50,40	1
		10	7,23 \pm 0,20	4,40 \pm 0,99	0	1	61,00	37,00	1
Oral	DMSO 5%	–	9,58 \pm 0,60	5,06 \pm 0,80	0	1	78,89	19,11	1
	FC	10	7,75 \pm 0,55	5,05 \pm 0,90	0	1	64,00	32,25	1
		25	7,66 \pm 0,72	3,14 \pm 0,49	0	1	33,80	64,20	1

Os valores correspondem à média \pm E.P.M de cinco animais por grupo (n= 5). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir a substância teste.

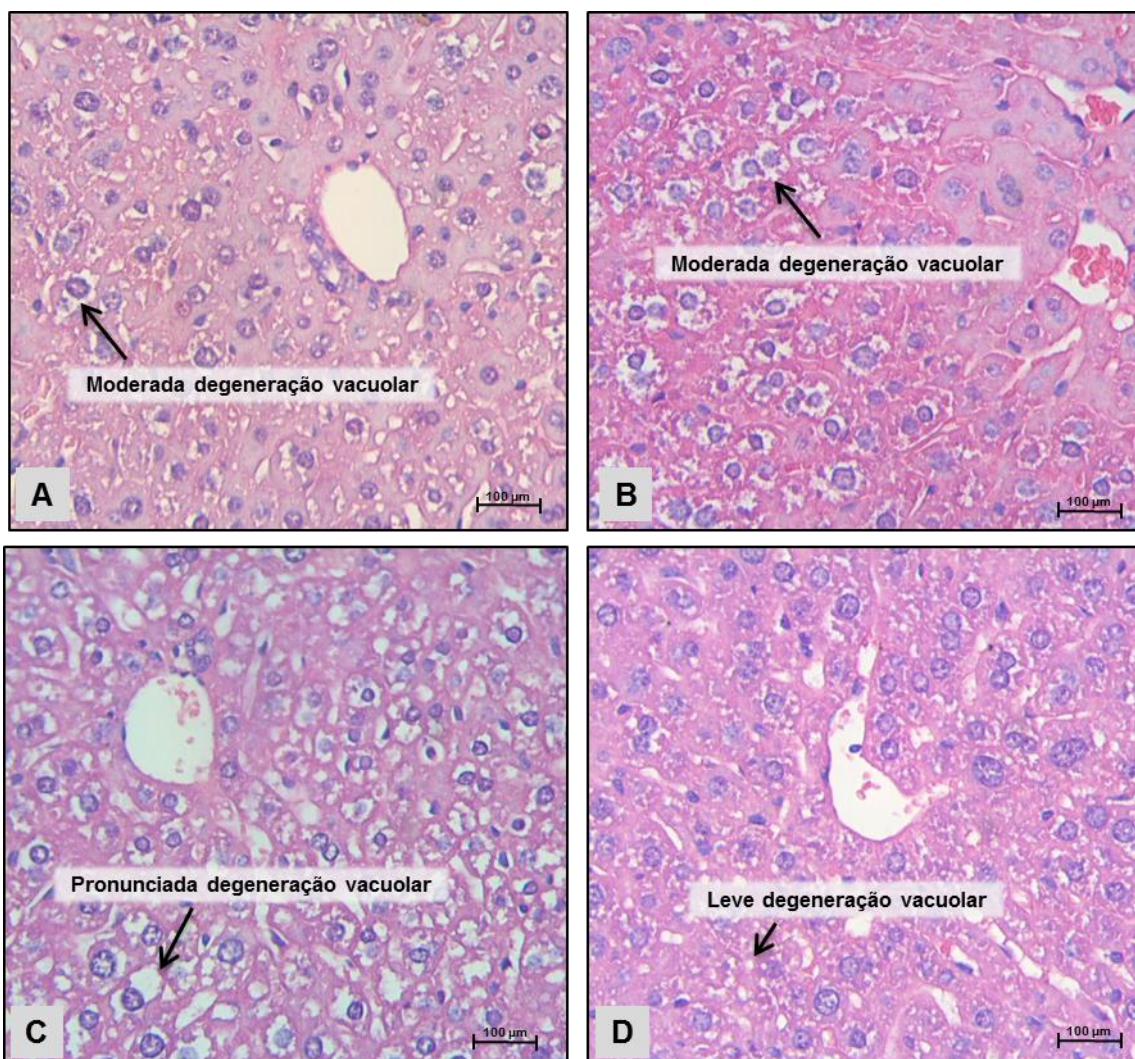
As análises histológicas feita em tumores de carcinoma de colón humano (HCT-116) constataram células com alto grau de anaplasia, megacitose e megacariose, nucléolos múltiplos, proeminentes e irregulares, tecido fibroso (desmoplasia) e mitoses atípicas em ambos os grupos tratados com FC, vaso neoformado congestionado no grupo controle negativo tratado via oral e morte celular por necrose observada apenas no grupo tratado com FC na dose de 10 mg/kg i.p. (**Figura 1**).

Figura 1 – Fotomicrografia evidenciando células de carcinoma de colón humano (HCT-116) inoculadas em camundongos CB-17 SCID após 15 dias de tratamento com uma fração com casearinas. Animais tratados por injeção intraperitoneal (i.p.) e gavagem (v.o.) com doses de 10 mg/kg/dia. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a substância (5% de DMSO i.p. e oral; A e B respectivamente). C - FC 10 mg/kg i.p.; D - FC 10 mg/kg v.o. Coloração com hematoxilina-eosina. Escala de magnitude = 100 µm.



As análises histológicas do fígado revelaram a presença de degeneração vacuolar em todos os grupos analisados, com destaque para o grupo tratado com FC 10 mg/kg/dia i.p. que apresentou essa alteração de forma mais intensa (**Figura 2**).

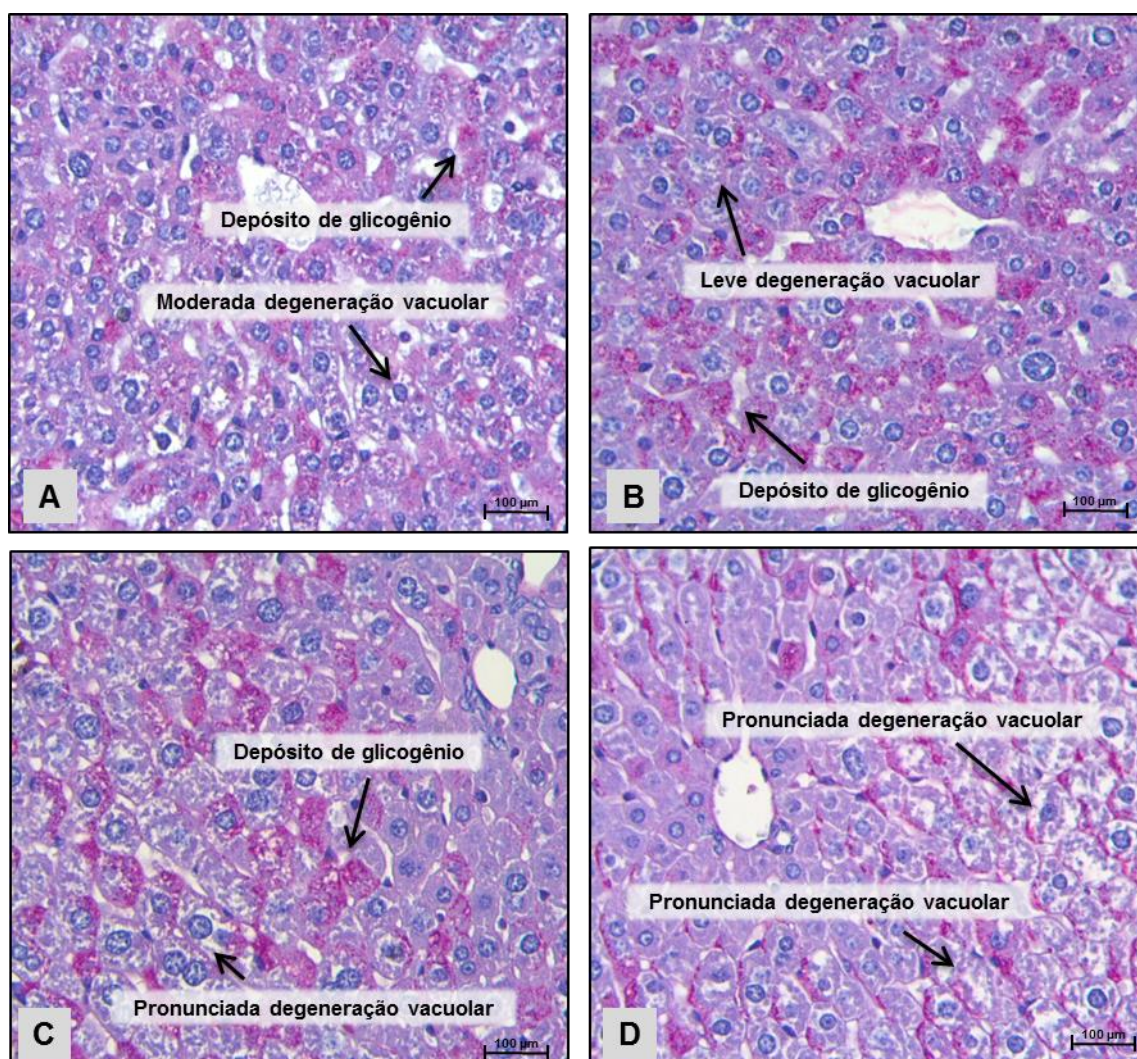
Figura 2 - Fotomicrografia de tecido hepático de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com caseínas. Animais tratados por injeção (i.p.) e gavagem (v.o.) com doses de 10 mg/kg/dia durante 15 dias consecutivos. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a substância (5% de DMSO i.p. e oral; A e B respectivamente). C - FC 10 mg/kg i.p.; D - FC 10 mg/kg v.o. Coloração com hematoxilina-eosina. Escala de magnitude = 100 μ m.



Lâminas de fígado também foram coradas com ácido periódico-Schiff (PAS). Em todos os grupos foi observado depósito de glicogênio e uma intensa degeneração vacuolar apenas nos grupos tratados com a FC 10 mg/kg/dia (i.p.

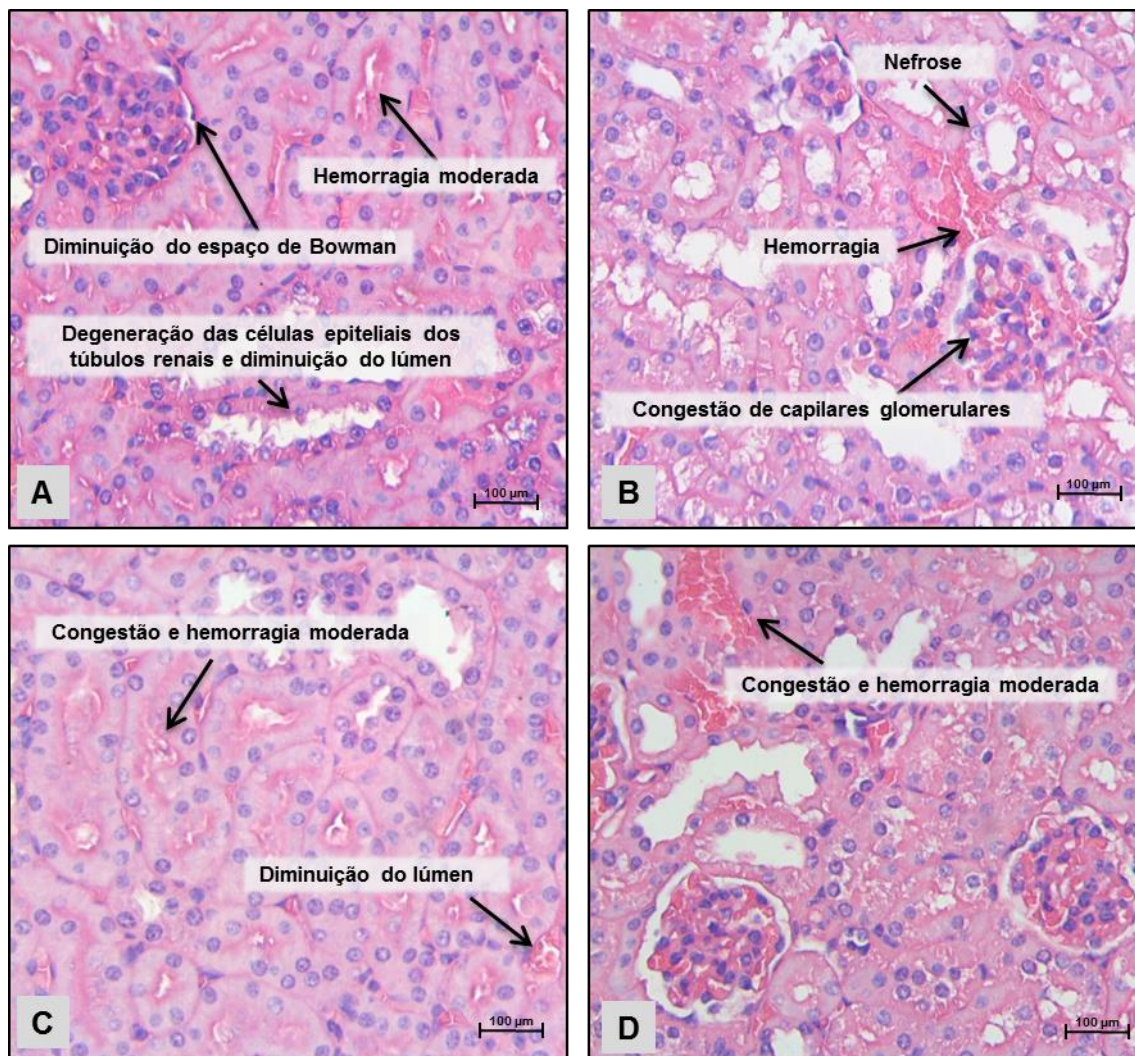
e v.o.). Assim como observado nas lâminas coradas com HE, o grupo controle DMSO 5% i.p. apresentou essa alteração de forma moderada (**Figura 3**).

Figura 3 - Fotomicrografia de tecido hepático de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com caseínas, coradas com PAS. Animais tratados por injeção (i.p.) e gavagem (v.o.) com doses de 10 mg/kg/dia durante 15 dias consecutivos. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a substância (5% de DMSO i.p. e oral; A e B respectivamente). C - FC 10 mg/kg i.p.; D - FC 10 mg/kg v.o. Coloração com ácido periódico-schiff (PAS). Escala de magnitude = 100 μ m.



Alterações histológicas como, hemorragia foram observadas nos rins dos animais de todos os grupos. Congestão celular mais evidente apenas nos grupos tratados com a FC 10 mg/kg/dia (i.p. e v.o.) e diminuição do lúmen dos túbulos renais apenas no grupo tratado com FC (i.p.).

Figura 4 - Fotomicrografia de tecido renal de camundongo da linhagem CB-17 SCID tratados com uma fração com casearinas. Animais tratados por injeção (i.p.) e gavagem (v.o.) com doses de 10 mg/kg/dia durante 15 dias consecutivos. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a substância (5% de DMSO i.p. e oral; A e B respectivamente). C - FC 10 mg/kg i.p.; D - FC 10 mg/kg v.o. Coloração com hematoxilina-eosina. Escala de magnitude = 100 μ m.



4 DISCUSSÃO

A identificação de compostos farmacologicamente ativos presentes nas plantas e a determinação do mecanismo de ação responsável por essas atividades constituem o principal desafio para química farmacêutica e a farmacologia (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; FEITOSA, 2017).

Os estudos farmacológicos pré-clínicos de agentes anticâncer são marcados pelo uso de considerável quantidade de animais durante a fase pré-clínica. Por isso, a filosofia dos 3Rs – *Replacement* (substituição), *Refinement* (refinamento), *Reduction* (redução) – tem influenciado as novas legislações

para o uso de animais nas pesquisas biomédicas (SCHECHTMAN, 2002; CLARK, 2018). Pensando nisso e tentando diminuir os gastos exorbitantes, o tempo e a quantidade dos compostos requeridos para teste, utilizou-se o modelo chamado *Hollow Fiber Assay (HFA)* desenvolvido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute – NCI*). Ele é o único modelo *in vivo* que permite a avaliação simultânea da eficácia antiproliferativa de um composto contra até seis diferentes linhagens celulares em 2 compartimentos fisiológicos distintos do animal (intraperitoneal - i.p. e subcutâneo - s.c.). Dessa maneira, pode-se enfatizar que o maior valor prático do HFA é servir como ponto de partida para identificar aqueles compostos que merecem ser estudados mais detalhadamente através de outros modelos *in vivo* (HOLLINGSHEAD et al., 1995; HALL et al., 2000; DECKER et al., 2004; TEMMINK et al., 2007; MI et al., 2009; AMARAL et al., 2014; BEZERRA et al., 2015).

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a fração acetato de etila das folhas de *C. sylvestris* Sw. é rica em diterpenos do tipo clerodânicos, que os compostos Casearina X e Caseagrevina F são os compostos majoritários e que todos (fração, Casearina X e Caseagrevina F) possuem considerável ação citotóxica *in vitro* contra diferentes tipos histológicos de tumor, inclusive em células de glioblastoma e câncer de cólon (FERREIRA et al., 2010, 2014). Essa ação *in vitro* foi confirmada no presente estudo por dois métodos pré-clínicos diferentes.

Nos estudos com fibra oca, doses intraperitoneais mais baixas (2,5 e 5 mg/kg/dia) foram escolhidas porque estudos prévios do nosso grupo com doses superiores (10 e 25 mg/kg/dia i.p.) foram tóxicas para animais BALB/c Nude (*nu/nu*), já que alguns animais morreram durante tratamento com a FC, principalmente com doses de 25 mg/kg/dia. Isso explica porque as doses i.p. foram menos ativas em comparação com o tratamento oral no HFA, contradizendo estudos prévios que mostraram o tratamento i.p. como mais promissor quanto à inibição do crescimento tumoral. Porém, estes resultados mostraram apenas uma atividade antitumoral aparente (mas não comparativa), uma vez que diferentes doses foram administradas como forma de driblar a toxicidade advinda do tratamento.

Ensaio como HFA devem ser usado inicialmente para triar a possibilidade de resultado de positivos em posteriores estudos em modelos xenográficos. Nesse contexto, a substância é considerada ativa em um tipo particular de fibra se ele reduzir 50% ou mais o crescimento/multiplicação celular (HOLLINGSHEAD et al., 1995; HALL et al., 2000; JOHNSON et al., 2001). Sabendo que a FC atende a tal exigência e que os ensaios de HFA não substituem o modelo em que a massa tumoral é introduzida diretamente nos animais, pois as células tumorais não interagem diretamente com os tecidos do hospedeiro nem provocam metástases, para confirmação da ação biológica realizou-se, em seguida, a análise antiproliferativa *in vivo* em linhagem de células tumorais de origem humana em modelos xenográficos de carcinoma de cólon. E mais uma vez a FC apresentou potencialidade anticâncer, com redução da massa tumoral variando entre 31,3 e 39,3%.

Alguns trabalhos têm demonstrado uma correlação direta entre atividade no HFA e nos modelos xenográficos testados, aumentando a probabilidade de atividade nos testes clínicos, pelo menos para drogas citotóxicas (JOHNSON et al., 2001). Assim, fármacos que revelarem atividade em mais de um terço dos modelos xenográficos revelarão maior probabilidade em demonstrar atividade anticâncer em pelo menos em um dos testes clínicos de Fase II, quando comparados àqueles que não alcançaram o nível de eficácia exigido nos xenográficos (DECKER et al., 2004; SUGGITT et al., 2006).

Modelos xenográficos possuem sistemas imunológicos incompletos. Esses são animais homocigotos deficientes de linfócitos T e B, e por isso, não rejeitam transplantes (SCHMIDT-WOLF et al., 1991; SANTOS, 2002; CADAMURO et al., 2018). Dessa forma, com o implante tumoral facilitado por esses animais imunodeficientes, foi possível verificar se a FC seria capaz de inibir a proliferação de células tumorais de origem humana.

As análises histológicas dos tumores de HCT-116 apresentaram células anaplásicas, com núcleos hipercromáticos e nucléolos múltiplos, proeminentes e irregulares, crescimento celular desordenado e invasivo, características comuns para a maioria das neoplasias malignas (PY; JACQUES, 2003; REDDY et al., 2003; ACS, 2013). Nos tumores dos animais do grupo tratado com a FC 10 mg/kg i.p. foram constatadas áreas necróticas. Morte celulares podem ser caracterizadas como um processo que podem ser

normal e patológico e pode ser classificado em duas categorias distintas: morte celular acidental e morte celular regulada. A necrose é definida como um tipo de morte celular que não apresenta as características de apoptose e autofagia, e é geralmente considerada descontrolada (GOLSTEIN, KROEMER, 2007; RONCO et al., 2019).

Sinais de toxicidade sistêmica também não se refletiram sistematicamente, uma vez que alterações no ganho de peso, peso relativo dos órgãos, nos dados hematológicos ou histológicos não revelaram danos significativos. Em relação aos aspectos metabólicos da espécie em estudo, observou-se, pelo método histoquímico de PAS no fígado que todos os exemplares apresentaram depósitos de glicogênio caracterizados por vacúolos corados em púrpura. Essas vacuolizações citoplasmáticas indicam a provável existência de acúmulo de lipídios e glicogênio, ou a combinação de agentes tóxicos com lipídeos. Por outro lado, a não diminuição do glicogênio hepático é um bom sinal, visto que tal decréscimo pode prejudicar atividades metabólicas desempenhadas pelo fígado, como glicemia, produção de fatores de coagulação e metabolização da amônia endógena e de xenobióticos. As lesões hepáticas, como a degeneração de hepatócitos e as vacuolizações citoplasmáticas, são consideradas alterações não específicas que podem ocorrer dentre vários motivos, devido os efeitos de quimio e/ou da radioterapia (GOMES et al., 2013; FYFE et al., 2018).

Estudos anteriores com o extrato hidroalcólico das folhas de *C. sylvestris* Sw., administrado via oral por gavagem, em ratos nas doses de 50, 60, 120, 240 e 250 mg/kg/dia, durante 90 dias, também não revelaram alterações relevantes nos parâmetros fisiológicos (hematológicos, bioquímicos, comportamentais, histológicos e peso) ou danos cromossômicos (AMENI et al., 2015; TIRLONI et al., 2017). Porém, previamente, nosso grupo verificou que camundongos Swiss tratados com FC (2,5; 5; 10 e 25 mg/kg/dia) durante 7 dias exibiram, dependendo da dose, alterações histológicas sugestivas de neurotoxicidade, como desorganização de axônios, vacuolização nuclear, desorganização da cromatina e hiper Cromasia do material nuclear, achados sugestivos de apoptose e microesteatose hepática (ARAÚJO et al., 2015). Tais resultados foram confirmados pela FC e seu isolado Casearina X, quando da indução de alterações morfológicas reversíveis no fígado, rins e baços de

camundongos Swiss nas maiores doses testadas (FC 25 e 50 mg/kg/dia i.p. e oral, respectivamente), além da leucopenia (com linfocitopenia e monocitopenia) e neutrofilia (FERREIRA et al., 2016).

É importante enfatizar que, extratos vegetais possuem inúmeros constituintes em quantidades variáveis, os quais podem apresentar efeitos sinérgicos, contribuindo com a mesma atividade, ou ainda, apresentando efeitos antagônicos. Por isso, é importante trabalhar com frações, as quais permitam e facilitem o isolamento e o conhecimento de seus constituintes, além do fato que frações costumam possuir maior atividade que o extrato bruto (MACIEL et al., 2002; HOUGHTON et al., 2007; FERREIRA et al., 2014).

Apesar dos relatos anteriores de toxicidade, no presente estudo tais achados foram irrelevantes e assim, os usos etnofarmacológicos têm incentivado o uso de diferentes partes de *C. sylvestris* Sw., uma vez que dados populares e estudos toxicológicos indicam evidências na segurança para uso em humanos (SILVA et al., 1988; BASILE et al., 1990; FERREIRA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014, 2015).

5 CONCLUSÃO

A fração com casearinas mostrou eficiente ação antitumoral *in vivo* por via intraperitoneal e oral contra células tumorais humanas de cólon e de glioblastoma, não causou alterações fisiológicas significativas e apenas lesões consideradas reversíveis foram encontradas nos rins e fígado. Juntos, esses achados corroboram com a importância das pesquisas em desenvolvimento e o uso popular de *C. sylvestris* Sw. para fins terapêuticos como proposto pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

REFERÊNCIAS

ACS - American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013. 64 p.

AMARAL, D. N.; CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; CASTRO, R. P.; SABINO, J. R.; MACHADO, C. M.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C. M.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Docking, synthesis and antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e85380/1-16, 2014.

AMENI, A. Z.; LATORRE, O. A.; TORRES, L. M.; GÓRNIK, S. L. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 9-13, 2015.

ARÁUJO, E. J. F.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 355-361, 2014.

ARAÚJO, É. J. F.; OLIVEIRA, G. A.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1791-1807, 2015.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-197, 1990.

BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; MACHADO, C. M.; AQUINO, N. C.; SILVEIRA, E. R.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C. Antitumour efficacy of *Piper tuberculatum* and piplartine based on the hollow fiber assay. **Planta Medica**, v. 81, n. 1, p. 15-19, 2015.

BIERMANN, H.; PIETZ, B.; DREIER, R.; SCHMID, K. W.; SORG, C.; SUNDERKÖTTER, C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 2, p. 217-231, 1999.

CADAMURO M, BRIVIO S, STECCA T, KAFFE E, MARIOTTI V, MILANI C, FIOROTTO R, SPIRLI C, STRAZZABOSCO M, FABRIS L. Animal models of cholangiocarcinoma: What they teach us about the human disease. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 42, n. 5, p. 403-415, 2018.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CLARK, J. M. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **The British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p. S1-S7, 2018.

RONCO, C.; BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RICCI, Z. Critical care nephrology (Third Edition). In: KIM, N.; CAMPBELL HERNANDO GOMEZ, C. H.; BAYIR, H. **Chapter 20 - Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis**. Italy: Elsevier, 2019, p. 113-121.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

DECKER, S.; HOLLINGSHEAD, M.; BONOMI, C. A.; CARTER, J. P.; SAUSVILLE, E. A. The hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. **European Journal of Câncer**, v. 40, n. 6, p. 821-826, 2004.

FEITOSA, C. H. **Antioxidantes – Aspectos Químicos, Farmacológicos e Terapêuticos**. Campinas: Editora Átomo, 2017.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; SILVA, F. O.; BÜCKER, N. F.; FARIAS, M. S.; CASTRO, L. S.; GRINEVICIUS, V. M. S.; MOTTA, N. S.; CORREIA, J. F.; ROSSI, M. H.; PEDROSA, R. C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1492-1499, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W.; MARTINS, A. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FERREIRA, P. M. P.; MILITÃO, G. C. G.; LIMA, D. J.; COSTA, N. D.; MACHADO, K. C.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PESSOA, C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. Molecular biology of human epidermal receptors, signaling pathways and targeted therapy against cancers: new evidences and old challenges. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 2, p. 1-17, 2017.

FYFE, B.; ZALDANA, F.; LIU, C. The Pathology of Acute Liver Failure. **Clinics in Liver Disease**, v. 22, n. 2, p. 257-268, 2018.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, n. 37-43, 2007.

GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHAO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

HALL, L. A.; KRAUTHAUSER, C. M.; WEXLER, R. S.; HOLLINGSHEAD, M. G.; SLEE, A. M.; KERR, J. S. The hollow fiber assay: continued characterization with novel approaches. **Anticancer Research**, v. 20, n. 2A, p. 903-911, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HOLLINGSHEAD, M. G.; ALLEY, M. C.; CAMALIER, R. F.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; MALSPEIS, L.; GREVER, M. R. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. **Life Sciences**, v. 57, n. 2, p. 131-141, 1995.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.

JOHNSON, J. I.; DECKER, S.; ZAHAREVITZ, D.; RUBINSTEIN, L. V.; VENDITTI, J. M.; SCHEPARTZ, S.; KALYANDRUG, S.; CHRISTIAN, M.; ARBUCK, S.; HOLLINGSHEAD, M.; SAUSVILLE, E. A. Relationships between drug activity in NCI preclinical *in vitro* and *in vivo* models and early clinical trials. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 10, p. 1424-1431, 2001.

LÓPEZ-LÁZARO, M. The stem cell division theory of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 123, n. 1, p. 95-113, 2018.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, JR.; VALDIR, F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MCCUBREY, J. A.; ABRAMS, S. L.; FITZGERALD, T. L.; COCCO, L.; MARTELLI, A. M.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M.; SCALISI, A.; CANDIDO, S.; LIBRA, M.; STEELMAN, L. S. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, n. 1, p. 75-101, 2015.

MI, Q.; PEZZUTO, J. M.; FARNSWORTH, N. R.; WANI, M. C.; KINGHORN, A. D.; SWANSON, S. M. Use of the *in vivo* Hollow Fiber Assay in Natural Products Anticancer Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 573-580, 2009.

MONÇÃO, N. B.; ARAÚJO, B. Q.; SILVA, J. N.; LIMA, D. J.; FERREIRA, P. M. P.; AIROLDI, F. P.; PESSOA, C.; CITÓ, A. M. Assessing chemical constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of *M. caesalpiniiifolia* on human tumour cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4204-4024, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PLOWMAN, J.; DYKES, D. J.; HOLLINGSHEAD, M.; SIMPSON-HERREN, L.; ALLEY, M. C. Human Tumor Xenograft Models in NCI Drug Development. In: **Anticancer Drug Development Guide. Cancer Drug Discovery and Development**. Humana Press, Totowa, NJ, 1997, p. 101-125.

PY, L. A.; JACQUES, H. **A linguagem da saúde**. 2. ed. São Paulo: Editora Campus, 2003. 296p.

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

SANTOS, B. F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; GOMES, TININIS, A.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, p. S85-S94, 2002.

SCHMIDT-WOLF, I. G.; NEGRIN, R. S.; KIEM, H. P.; BLUME, K. G.; WEISSMAN, I. L. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 1, p. 139-149, 1991.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; BEATRIZ, O.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINÁRIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1-2, p. 219-229, 1988.

SILVA, R. M.; VERJEE, S.; GAITANI, C. M.; OLIVEIRA, A. R. M.; BUENO, P. C. P.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of the Intestinal Absorption Mechanism of Casearin X in Caco-2 Cells with Modified Carboxylesterase Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 1084-1090, 2016.

SIMÕES, E. R.; SANTOS, E. A.; ABREU, M. C.; SILVA, J. N.; NUNES, N. M.; COSTA, M. P.; PESSOA, O. D.; PESSOA, C.; FERREIRA, P. M. P. Biomedical

properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 256-263, 2015.

SUGGITT, M.; COOPER, P. A.; SHNYDER, S. D.; BIBBY, M. C. The hollow fibre model: facilitating anti-cancer pre-clinical pharmacodynamics and improving animal welfare. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 6, p. 1493-1499, 2006.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. M.; KHANUJA, S. P. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892-5908, 2005.

TEMMINK, O. H.; PRINS, H. J.; VAN GELDEROP, E.; PETERS, G. J. The hollow fibre assay as a model for *in vivo* pharmacodynamics of fluoropyrimidines in colon cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 1, p. 61-66, 2007.

TIRLONI, C. A. S.; TRAESEL, G. K.; LÍVERO, F. A. R.; NETO, S. D. V.; FARIA JUNIOR, R.; PAIM, T. C.; SANTOS, J. A.; OESTERREICH, S. A.; SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. C.; CARDOZO JUNIOR, E. L.; GASPAROTTO JUNIOR, A. Short-term carcinogenesis evaluation of *Casearia sylvestris*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 603-610, 2017.

WAYNFORTH, B. H. **Injection techniques: experimental and surgical techniques in the rat**. London: Academic Press, 1980, 284p.



CAPÍTULO III

Ação antinociceptiva de uma fração rica em diterpenos clerodânicos

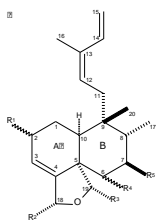
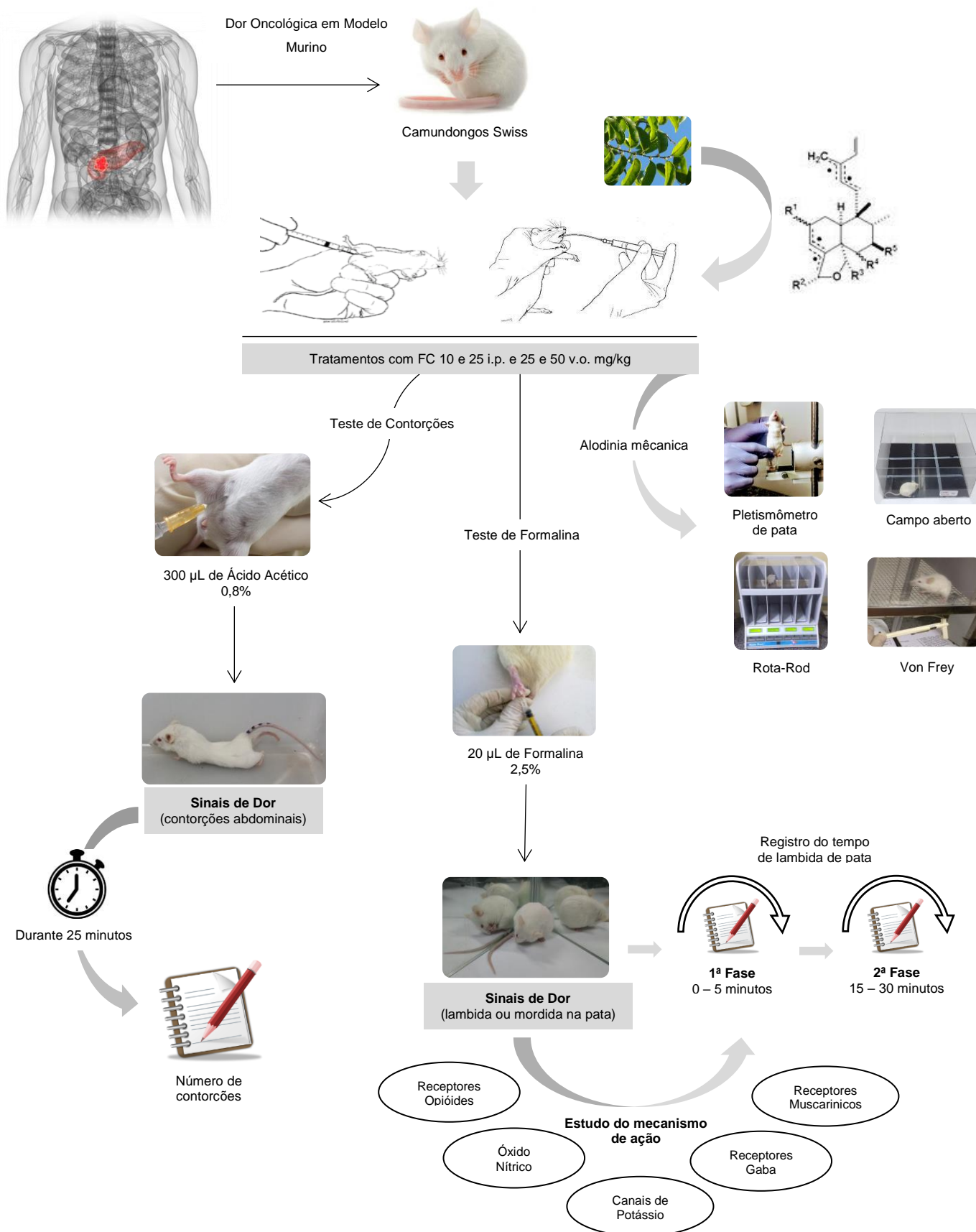


GRÁFICO RESUMO



RESUMO

A dor crônica relacionada ao câncer e/ou seu tratamento geralmente apresenta-se como um transtorno misto e ainda é considerada um dos maiores desafios da medicina moderna. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo da fração casearina (FC) e elucidar seu mecanismo de ação em camundongos saudáveis e portadores do tumor murino S-180. Os ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de formalina foram utilizados para avaliar a ação antinociceptiva e o teste com filamentos de Von Frey utilizado para determinar a alodinia mecânica. A FC apresentou efeito antinociceptivo significativo em camundongos saudáveis e acometidos pelo tumor S-180 em testes iniciais de contorções induzidas por ácido acético, com destaque para as maiores doses por ambas as vias testadas (25 e 50 mg/kg i.p. e v.o. respectivamente) assim como o quimioterápico 5-FU (25 mg/kg i.p.) e morfina (5 mg/kg i.p.). Na fase neurogênica do teste de formalina, todas as amostras reduziram de forma significativa o tempo de lambertura da pata. Na fase inflamatória apenas as amostras da FC administradas por via oral tiveram efeitos promissores reduzindo de forma significativa o tempo de lambida da pata, com uma média de $139,0 \pm 14,71$ e $123,0 \pm 20,49$ segundos nas doses de 25 e 50 mg/kg v.o. respectivamente ($p < 0,05$). Na avaliação do envolvimento dos sistemas de dor mediados por vias específicas, os antagonistas naloxona (2 mg/kg i.p.) e L-NAME (20 mg/kg i.p.) revertem o efeito antinociceptivo demonstrado pela FC (50 mg/kg v.o.) na primeira fase do teste de formalina ($p < 0,05$). Na segunda fase, além da reversão citada, foram também capazes de reverter o efeito antinociceptivo da FC os antagonistas Flumazenil (2 mg/kg i.p.) e Atropina (1 mg/kg i.p.) ($p < 0,05$). A ação antinociceptiva aguda (periférica/neurogênica) da FC (50 mg/kg v.o.) na primeira fase do teste de formalina parece ter participação, pelo menos parcialmente, dos sistemas opioidérgico e nitrérgico, já na fase inflamatória, sugerem a participação das vias opioidérgica, nitrérgica, GABAérgica e colinérgica. Também demonstrou inibição de alodinia mecânica em camundongos portadores do tumor S-180 em até 4 horas com ausência de alterações em parâmetros comportamentais e motores. A ação antinociceptiva demonstrada pela FC quando administrada por via oral pode ser considerada de grande importância, uma vez que tal propriedade poderá facilitar o desenvolvimento de um novo analgésico à base de moléculas naturais extraídas da espécie vegetal *C. sylvestris* Sw..

Palavras-chave: nociceção, analgesia, alodinia mecânica, dor do câncer.



ABSTRACT

Chronic pain related to cancer and/or its treatment usually presents itself as a mixed disorder and is still considered one of the greatest challenges of modern medicine. This work had as objective to evaluate the antinociceptive effect of the casearine fraction (FC) and elucidate its mechanism of action in healthy mice and patients with the S-180 murine tumor. The tests of abdominal writhings induced by acetic acid and formalin were used to evaluate the antinociceptive action and the Von Frey filaments test used to determine mechanical allodynia. The FC showed a significant antinociceptive effect in healthy mice and affected by the S-180 tumor in initial tests of induced contortions by acetic acid, emphasizing the higher doses by both the tested traces (25 and 50 mg/kg i.p. and o.v. respectively) as well such as 5-FU chemotherapy (25 mg/kg i.p.) and morphine (5 mg/kg i.p.). In the neurogenic phase of the formalin test, all samples significantly reduced the paw licking time. In the inflammatory phase only the orally administered FC samples had promising effects significantly reducing the time of paw licking, with a mean of 139.0 ± 14.71 and 123.0 ± 20.49 seconds at the doses of 25 and 50 mg/kg o.v. respectively ($p < 0.05$). In the evaluation of the involvement of specific mediated pain systems, the antagonists naloxone (2 mg/kg i.p.) and L-NAME (20 mg/kg i.p.) reversed the antinociceptive effect demonstrated by FC (50 mg/kg o.v.) in the first phase of the formalin test ($p < 0.05$). In the second phase, in addition to the aforementioned reversal, the antagonists Flumazenil (2 mg/kg i.p.) and Atropine (1 mg/kg i.p.) were also able to revert the antinociceptive effect of FC ($p < 0.05$). The antinociceptive action (peripheral/neurogenic) of the FC (50 mg/kg o.v.) in the first phase of the formalin test seems to have at least partially participation of the opioidergic and nitrenergic systems, already in the inflammatory phase, suggest the participation of opioidergic, nitrenergic, GABAergic and cholinergic pathways. It also demonstrated inhibition of mechanical allodynia in mice bearing the S-180 tumor within 4 hours with no changes in behavioral and motor parameters. The antinociceptive action demonstrated by the FC when administered orally can be considered of great importance, since such property may facilitate the development of a new analgesic based on natural molecules extracted from the plant species *C. sylvestris* Sw..

Key words: nociception, analgesia, mechanical allodynia, cancer pain.



1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença culturalmente estigmatizada e com várias representações simbólicas negativas devido à sua gravidade, muitas vezes devido ao estresse, a ansiedade e a dor de alta intensidade que acomete a grande maioria dos pacientes. O seu tratamento varia de acordo com o tipo e a gravidade da doença, podendo ser tratada com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas (LESTER, GAYNOR, 2000; SOUZA, 2004; CRUK, 2006; BARBOSA, FRANCISCO, 2007; ACS, 2013; HASSANPOUR, DEHGHANI, 2017).

A dor causada pelo câncer durante e após o tratamento tem sido correlacionada com o aumento da morbidade, aumento da ansiedade e da depressão com uma redução na qualidade de vida desses pacientes. Devido à heterogeneidade tumoral, as síndromes de dor crônica induzidas por cânceres podem estar relacionadas também ao tratamento, apresentando transtornos considerados multidimensionais ou mistos. A dor neuropática periférica induzida por quimioterapia, por exemplo, ocorre em 90% dos pacientes (FALLON, 2013; GAMBETA et al., 2016; LU; ROSENTHAL, 2018; SANTOS et al., 2018). Para tratar e aliviar tais dores, plantas medicinais têm sido utilizadas no mundo todo, como o ópio da papoula (*Papaver soniferum*) e a casca do salgueiro (*Salix* spp.) (MCCURDY; SCULLY, 2005; YARDEN, CALDES, 2014).

Na medicina popular e em relatos científicos, extratos, chás e frações de diferentes partes da planta *Casearia sylvestris* Swartz tem apresentado atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumoral e efeito cardioprotetor (LITTLE; WADSWORTH, 1964; TORRES; YAMAMOTO, 1986; ESPINOSA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; CAVENAGO et al., 2017; PEREIRA et al., 2017). O extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *C. sylvestris* Sw. foi capaz de reduzir a dor crônica pós-isquêmica e a hiperalgesia mecânica em modelos animais (PIOVEZAN et al., 2017).

Assim, diante do potencial etnofarmacológico dessa planta e da necessidade da descoberta de novas ferramentas farmacológicas com ação analgésica, inclusive para tratar dor oncológica, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) em protocolos experimentais de dor, usando bloqueadores farmacológicos para elucidação do mecanismo de ação. Em um segundo momento, animais

transplantados com tumor Sarcoma 180 (S-180) foram submetidos à hiperalgesia mecânica para análise da ação da FC em modelo murino de dor oncológica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra vegetal

As folhas de *C. sylvestris* Sw. foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, SP) por pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os espécimes de comprovante (AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 e AGS19) foram depositados no Herbário Maria Eneida P. Kaufmann, do Instituto de Botânica do estado de São Paulo, Brasil. O extrato etanólico das folhas e sua fração foram obtidos conforme descrito em Santos et al. (2010). Resumidamente, o extrato foi fracionado através de uma extração em fase sólida usando carvão ativado/sílica gel 60-200 μm (1:1, m/m) como fase estacionária e hexano/acetato de etila (95:5, v/v), acetato de etila e metanol como a fase móvel, fornecendo três frações, respectivamente. A segunda fração obtida é denominada fração enriquecida com Casearinas (FC). Os registros no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) foram protocolados (#A00892A e #A33EA7A) de acordo com legislação brasileira de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional (Lei 13.123/2015).

2.2 Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil. Foram mantidos em gaiolas sob condições de luz padrão (ciclo claro/escuro de 12:12 h) e temperatura (22 ± 1 °C) e alojados com livre acesso à dieta comercial de roedores e água, *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI sob o nº 373/17 (CEUA/UFPI) e estão de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3 Atividade antinociceptiva

2.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Ácido acético na concentração de 0,8%, quando administrado na cavidade intraperitoneal (i.p.) (**Figura 1A**) é capaz de produzir contração da musculatura abdominal (**Figura 1B**) (COLLIER et al., 1968; BENTLEY et al, 1981).

Figura 1 - Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



A – Injeção de ácido acético 0,8% via intraperitoneal



B – Contorções abdominais induzidas pelo acético 0,8%

Os animais (n=7/grupo) foram pré-tratados com a FC nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia i.p. ou 25 e 50 mg/kg/dia oral em dose única (tratamento agudo) e por 7 dias consecutivos (tratamento subagudo). Como controle positivo relacionado ao tratamento antitumoral foi utilizado o quimioterápico Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg/dia i.p). Como controle positivo antinociceptivo foi utilizado o analgésico morfina 5 mg/kg i.p. Após 30 minutos de tratamento i.p. e 60 minutos do tratamento oral foram administrados intraperitonealmente 300 μ L por animal de ácido acético 0,8%. Os grupos controles receberam por via intraperitoneal o mesmo volume de veículo contendo 5% do diluente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para diluir a FC. Após a injeção do ácido acético, os animais foram observados quantificando-se, cumulativamente, o número de contorções abdominais durante um período de 25 minutos (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1956).

2.3.2 Teste de lambedura de pata induzida por formalina

Para o teste de lambedura de pata induzida por formalina, seguiu-se o modelo descrito por Hunskaar et al. (1987), no qual camundongos receberam 20 μ L de formalina 2,5% na porção intraplantar na pata direita traseira. O tempo em que cada animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata (**Figura 2**) foi registrado em segundos (s), considerando-se dois períodos e/ou fases distintas: 0-5 min (1ª fase - neurogênica) e de 15-30 min (2ª fase - inflamatória) após a administração da formalina 2,5% (TJØLSEN et al., 1992; HUNSKAAR et al., 1985; SILVA et al., 2013).

Figura 2 - Animal lambendo e/ou mordendo a pata durante o teste formalina.



Os animais foram observados em gaiola de observação espelhada (**Figura 3**) para facilitar a observação dos animais em qualquer posição dentro da gaiola e cronometrado o tempo de lambida da pata na qual foi injetada formalina.

Figura 3 - Gaiola de observação espelhada utilizada para monitorar os animais durante o teste de formalina.



Os animais separados em distintos grupos ($n=7/\text{grupo}$) foram pré-tratados de forma aguda com a FC 10 e 25 mg/kg/dia i.p. ou 25 e 50 mg/kg/dia oral. Após 30 minutos de tratamento i.p. e 60 minutos de tratamento oral foram administrados $20\mu\text{L}/\text{animal}$ de formalina 2,5% na região intraplantar (pata esquerda traseira). Como controle positivo antinociceptivo foi utilizado o analgésico morfina 5 mg/kg por via i.p. Os grupos controles receberam o mesmo volume de veículo contendo 5% do diluente dimetilsulfóxido usado para diluir a FC.

De forma a avaliar possíveis mecanismo(s) de ação, envolvidos na resposta antinociceptiva, foram utilizados antagonistas das vias opióide (Naloxona, 5 mg/kg i.p.), nitrérgica [L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-éster), 20 mg/kg i.p.], canais de potássio (Glibenclamida, 10 mg/kg i.p.), gabaérgica (Flumazenil, 2 mg/kg i.p.) e muscarínica (Atropina, 1 mg/kg i.p.), administrados 15 minutos antes do tratamento com a FC.

Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2,0$ °C) e com o mínimo de fatores ambientais estressantes (barulho e luminosidade) que poderiam afetar os animais, devido à sensibilidade da resposta na fase inflamatória ou tardia. Mordidas e/ou

lambidas da pata que recebeu a solução de formalina 2,5% foi considerada como indicativo de dor sentida pelo animal (WANG et al., 2015)

2.4 Desenvolvimento de protocolo de dor oncológica induzida por Sarcoma 180 e avaliações comportamentais associadas

Células de S-180 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos na forma ascítica. Após dez dias, as células foram recuperadas da cavidade peritoneal, contadas em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio invertido e a concentração corrigida para 10^6 células/mL usando Ringer-lactato. Com auxílio de um contensor de pata, 25 μ L com 10^6 células foram implantadas na porção intraplantar (pata esquerda traseira) de camundongos Swiss (**Figura 4**) (SCHABEL et al., 1977; GUIMARÃES et al., 2014, GUIMARÃES et al., 2015).

Figura 4 - Indução intraplantar do tumor S-180 em camundongos saudáveis.

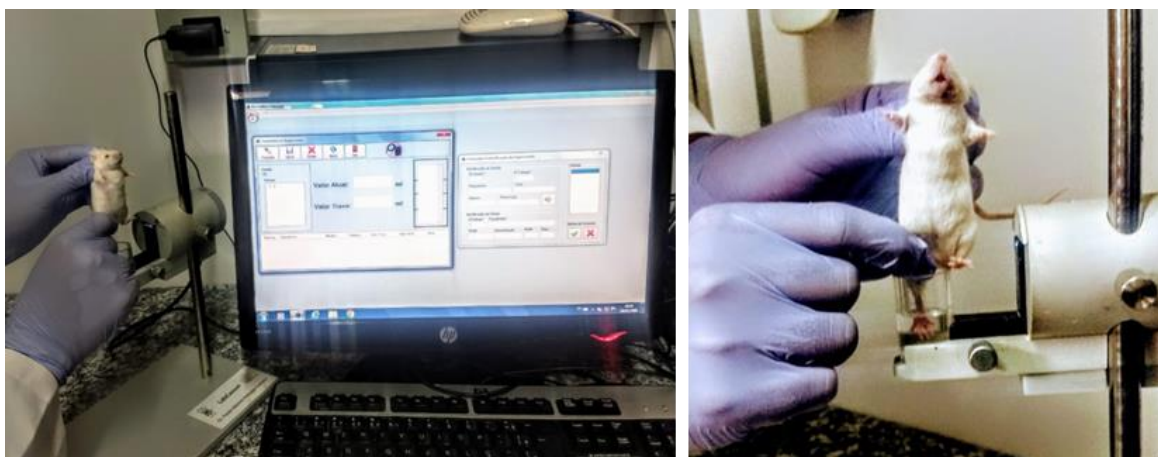


Posteriormente, os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n= 7). No 14^o dia após a inoculação do tumor os animais receberam a fração casearina (FC) por via i.p. ou oral nas doses de 25 e 50 mg/kg, respectivamente. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo acrescido do diluente 5% de DMSO e o grupo controle positivo analgésico recebeu Morfina (5 mg/kg, i.p.). Em seguida todos os grupos foram avaliados conforme protocolos experimentais seguintes.

2.4.1 Volume tumoral na pata

A formação do tumor dos animais foi confirmada pela mudança no volume da pata após 14 dias da indução do tumor. Todos os grupos foram submetidos à avaliação prévia (basal) e novamente reavaliados no 14º dia, pela imersão da pata em água destilada em um pletismômetro (Insight®, Brasil). O deslocamento do líquido contido no aparelho permitiu a comparação do volume tumoral na pata usando a variação de valores entre o volume da pata antes da indução do tumor e no 14º dia imediatamente posterior (Δ , em mL) (**Figura 5**) (FERREIRA, 1979).

Figura 5 - Determinação do volume da pata em pletismômetro digital.



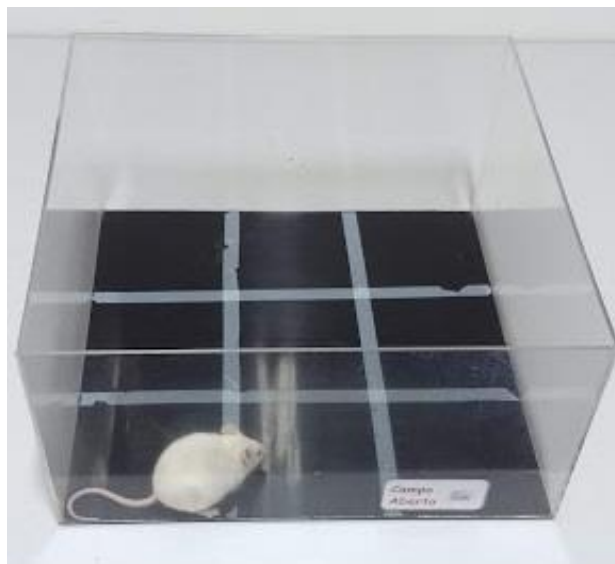
2.4.2 Atividade exploratória

A atividade exploratória dos animais foi verificada por meio de um campo aberto em acrílico (paredes transparentes e piso preto, com dimensões 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por Archer (1973) (**Figura 6**).

Após aclimação de 10 min, a nocicepção espontânea foi avaliada durante 5 minutos. Os animais foram colocados um por vez no centro do campo aberto no qual o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), assim como o número de comportamentos de autolimpeza (*groomings*) e levantamentos sem encostar-se nas paredes (*rearings*) foram contabilizados. Após a realização do teste com cada animal, foi efetuada a limpeza do campo com toalha de papel umedecida em álcool 70% para remoção de excretas deixadas pelo animal anterior de

forma a evitar alterações comportamentais influenciadas pelo ambiente (BROADHURST, 1957; ARCHER, 1973).

Figura 6 – Teste do campo aberto com camundongos.



2.4.3 Coordenação motora

O teste com *Rota-Rod* permite detectar a ocorrência de incoordenação motora relacionada a um possível efeito relaxante muscular de substâncias, favorecendo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção (CARLINI, BURGOS, 1979; LAPA et al., 2003). Após pelo menos um treino dos animais no aparelho *Rota-Rod*, esse teste também pode ser usado como modelo para avaliação da nocicepção induzida pelo movimento. Os camundongos foram colocados, com as quatro patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, com rotação de 17 rpm, por um período de 60 segundos cada animal (**Figura 7**). O tempo de permanência na barra giratória, em segundos, foi contabilizado, permitindo a avaliação da atividade motora de cada animal.

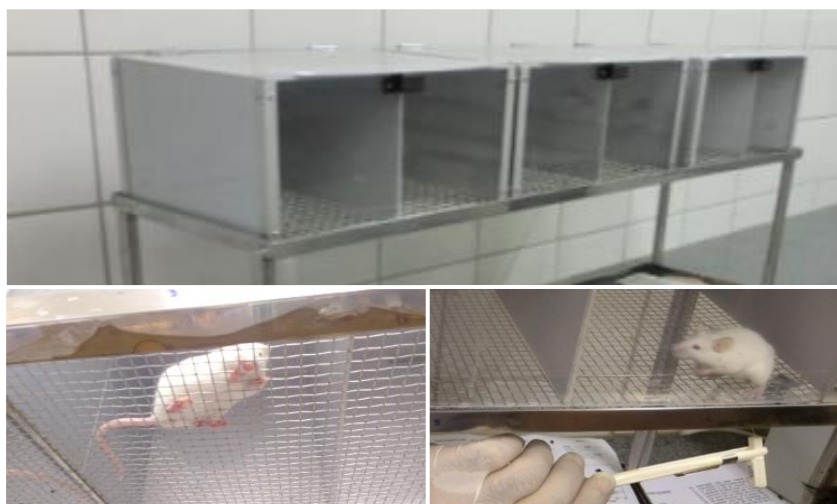
Figura 7 – Aparelho de *Rota-Rod* para camundongos.



2.4.4 Avaliação nociceptiva mecânica (Von Frey)

Para avaliar a alodinia mecânica no aparelho de Von Frey, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparentes (9 x 7 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras (**Figura 8**).

Figura 8 - Plataforma de avaliação no teste de Von Frey.



Os animais foram aclimatizados por, pelo menos, 15 min antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada foi obtida através

de 3 aplicações dos filamentos de Von Frey com duração de 1s cada e com diferentes forças de filamento, partindo das menores para as maiores (0,07 a 10 g) (Insight[®], Brasil). Todos os animais foram submetidos à avaliação prévia basal e, novamente, reavaliados em diferentes tempos após a indução (CHAPLAN et al., 1994).

2.5 Análises estatísticas

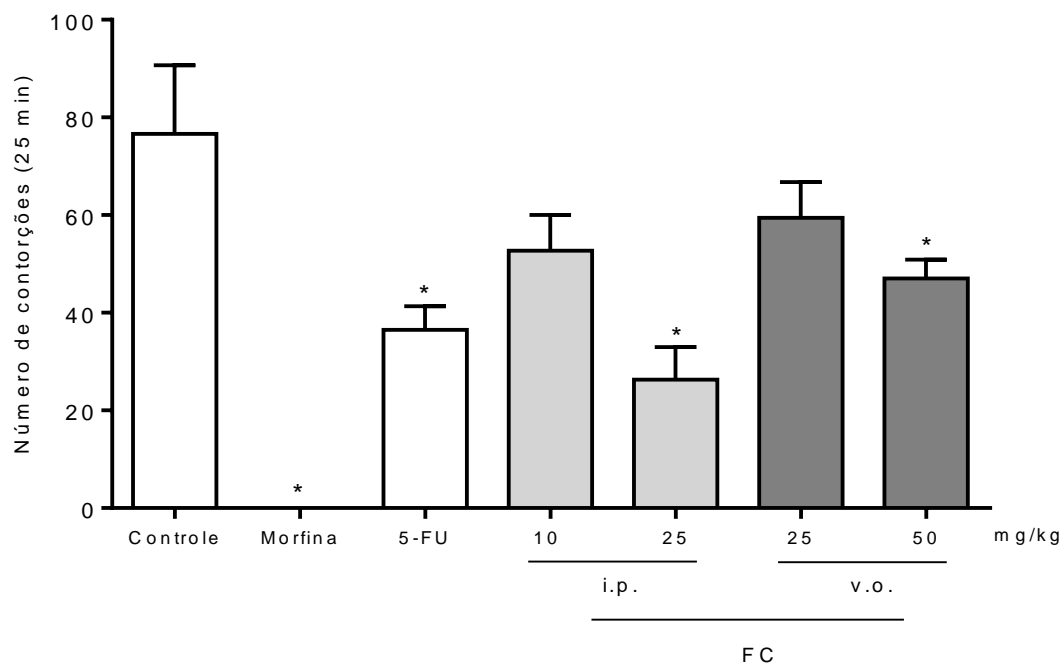
Os dados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre grupos experimentais foram comparadas usando análise de variância de uma via (ANOVA one-way) seguidas pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®] (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA). No teste de avaliação nociceptiva mecânica foi empregada a análise de variância (ANOVA duas vias) seguida pelo teste de Bonferroni. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$ para todos os estudos.

3 RESULTADOS

3.1 Redução da nocicepção induzida por ácido acético

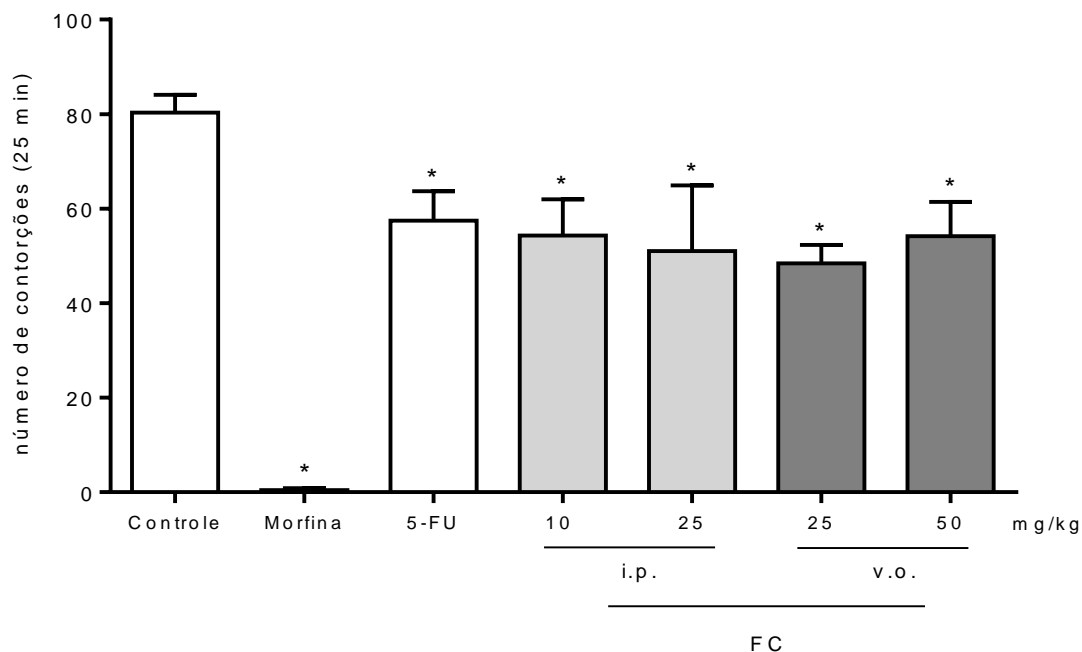
Na avaliação do efeito antinociceptivo em camundongos tratados com dose única da FC, somente as maiores doses (25 mg/kg i.p. e 50 mg/kg oral) reduziram as contorções abdominais induzidas por ácido acético ($26,3 \pm 6,6$ e $47,0 \pm 3,9$), respectivamente, $p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo ($76,7 \pm 14,0$). Tal redução também foi observada após a administração do quimioterápico 5-FU ($36,5 \pm 4,9$) e da morfina (não apresentaram contorção) (**Figura 9**).

Figura 9 – Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético após administração em dose única. Os controles positivos Morfina e 5-FU foram usados da dose de 5 e 25 mg/kg (i.p.) respectivamente. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



O mesmo protocolo foi idealizado com a FC após 7 dias consecutivos de tratamento e todas as doses testadas da FC foram capazes de reduzir o número de contorções abdominais ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle negativo ($80,3 \pm 3,8$), inclusive em níveis semelhantes ao tratamento de dose única (**Figura 10**).

Figura 10 – Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético após 7 dias de tratamento. Os controles positivos Morfina e 5-FU foram usados da dose de 5 e 25 mg/kg (i.p.) respectivamente. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

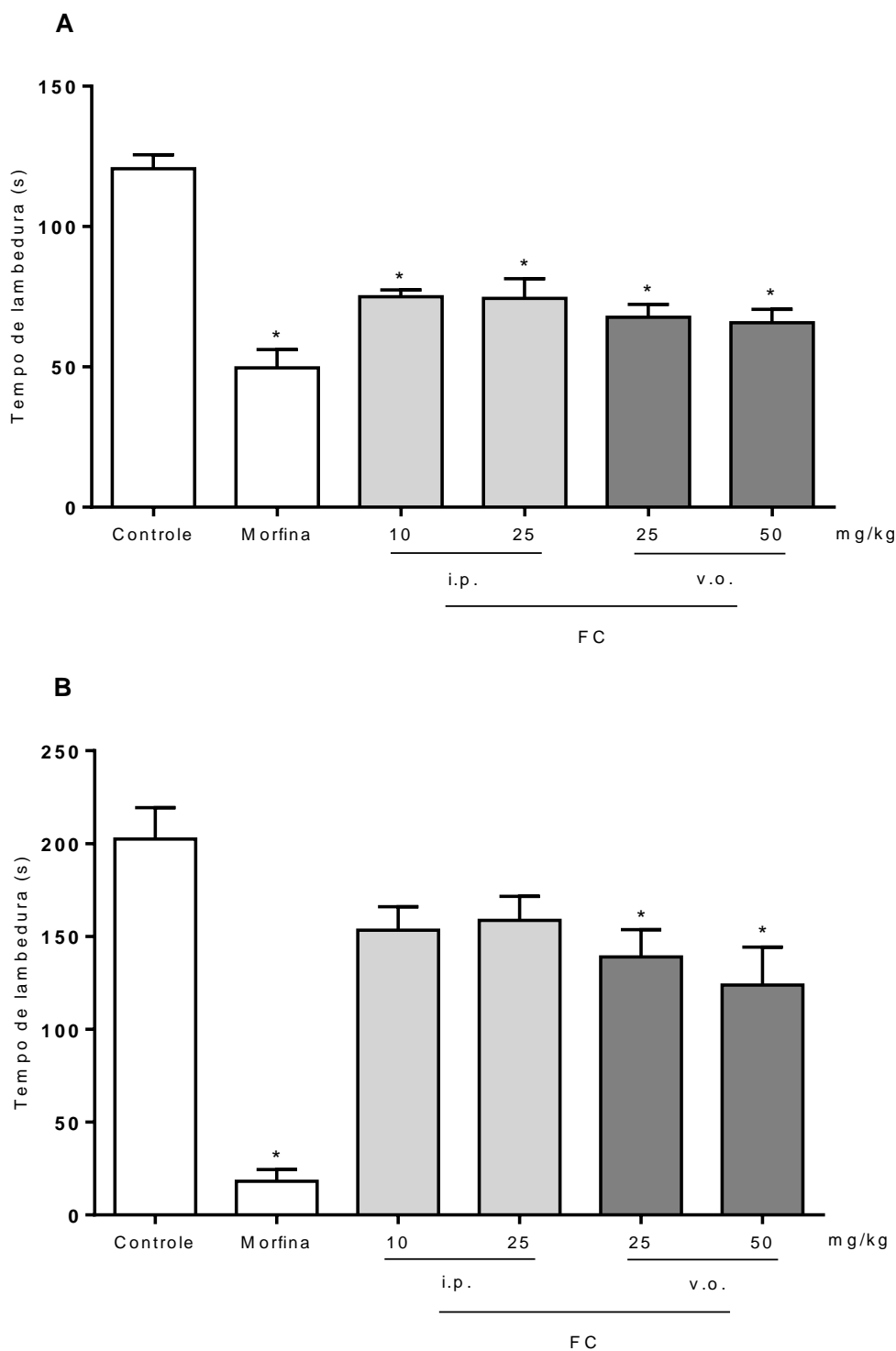


3.2 Redução da nocicepção induzida por formalina

Na primeira fase do protocolo (0-5 min, fase neurogênica), todas as doses da FC (10 e 25 mg/kg i.p. e 25 e 50 mg/kg oral) reduziram o tempo de lambertura da pata ($75,0 \pm 2,5$ s; $74,4 \pm 7,0$ s; $67,7 \pm 4,6$ s e $65,7 \pm 4,8$ s, respectivamente) quando comparadas ao controle negativo ($120,6 \pm 4,9$ s) assim como o grupo que recebeu morfina ($49,7 \pm 6,6$ s) ($p < 0,05$) (**Figura 11**).

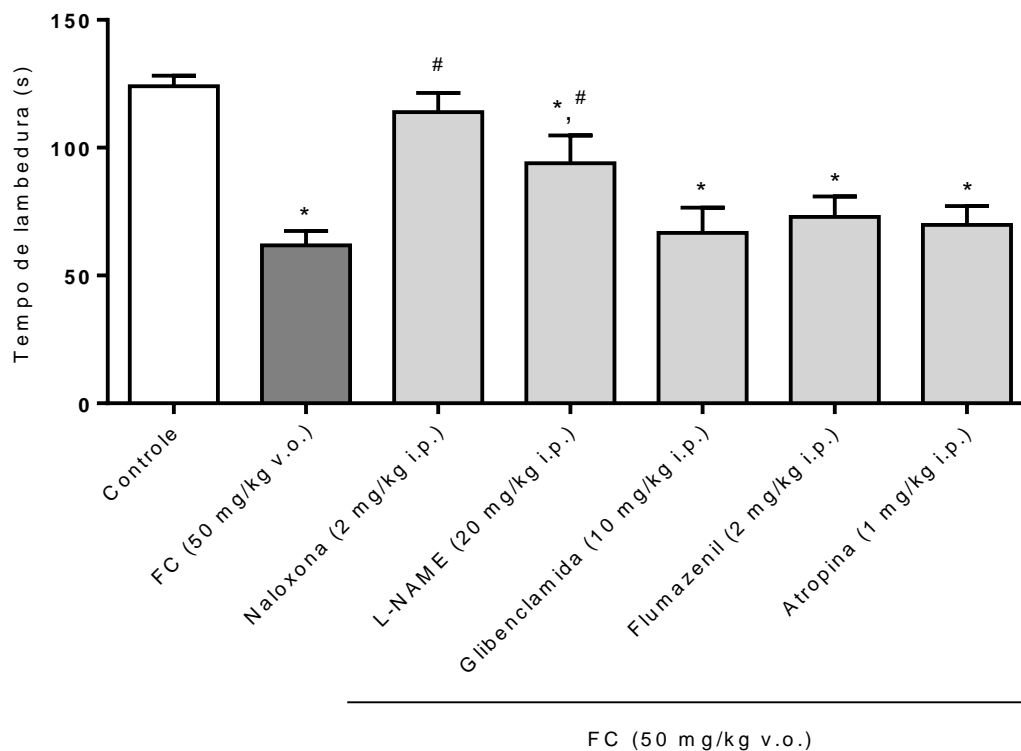
Na segunda fase do teste (15-30 min, fase inflamatória), apenas as doses da FC administradas por via oral (25 e 50 mg/kg) revelaram eficácia antinociceptiva ($139,0 \pm 14,7$ e $123 \pm 20,5$ s) quando comparada com o grupo controle negativo ($202,5 \pm 16,86$ s) ($p < 0,05$).

Figura 11 – Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz no modelo de dor induzida por formalina após administração em dose única. O controle positivo recebeu Morfina 5 mg/kg (i.p.). A - 1ª fase (neurogênica); B - 2ª fase (inflamatória). Os valores correspondem à média ± E.P.M. do tempo de lambidas (em segundos). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



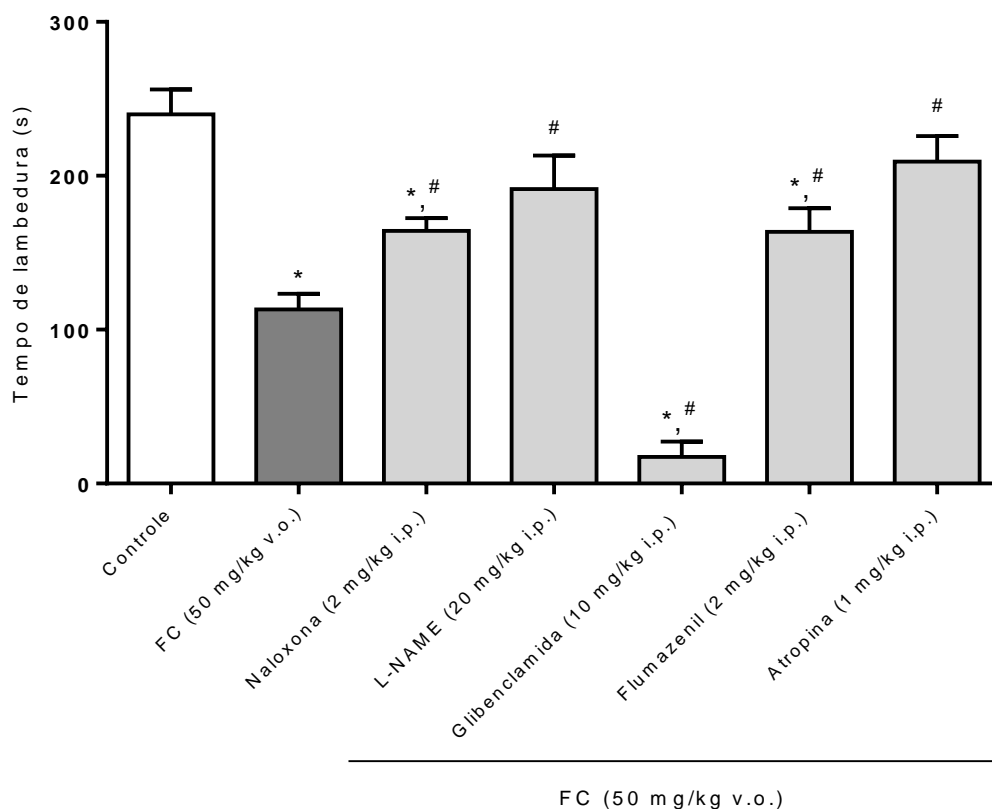
Na avaliação do envolvimento de vias específicas na geração da dor, o tratamento com antagonista de receptores opióides naloxona e o análogo da L-arginina inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) L-NAME, quando administrados previamente à FC 50 mg/kg oral, reverteram o efeito antinociceptivo demonstrado pela FC para $113,9 \pm 7,5$ s e $93,9 \pm 10,9$ s durante a primeira fase do teste de formalina quando comparados ao grupo que recebeu somente a FC ($61,8 \pm 5,7$ s) ($p < 0,05$). Já o controle negativo apresentou $124,0 \pm 4,2$ s de lambertura da pata (**Figura 12**). Por outro lado nem a glibenclamida, flumazenil ou atropina reverteram à redução do tempo de lambertura induzida pela FC.

Figura 12 – Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz no modelo de dor induzida por formalina durante a 1ª fase (neurogênica) na dose de 50 mg/kg via oral por gavagem. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. do tempo de lambidas (em segundos). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo FC 50 mg/kg por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



Na fase inflamatória, o antagonista opióide naloxona ($164,1 \pm 8,3$ s de lambida da pata), o nitrérgico L-NAME ($191,3 \pm 21,9$ s), o antimuscarínico atropina ($209,3 \pm 16,59$ s) e o antagonista benzodiazepínico flumazenil ($163,5 \pm 15,4$ s) reverteram o efeito antinociceptivo da FC 50 mg/kg via oral. Por outro lado, a associação do bloqueador de canais de potássio glibenclamida a FC 50 mg/kg via oral potencializou o efeito desta e reduziu o tempo de lambidas para $17,3 \pm 9,9$ s em relação ao grupo que recebeu somente à FC ($p < 0,05$). Assim como observado na primeira fase, a FC 50 mg/kg quando analisada separadamente sem a participação de antagonistas causou redução no tempo de lambida ($113,1 \pm 10,3$ s) em relação ao controle negativo ($240,0 \pm 16,2$ s) ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

Figura 13 - Avaliação do efeito antinociceptivo da fração com casearinas (FC) obtida das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz no modelo de dor induzida por formalina durante a 2ª fase (inflamatória) na dose de 50 mg/kg via oral por gavagem. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. do tempo de lambidas (em segundos). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo FC 50 mg/kg por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



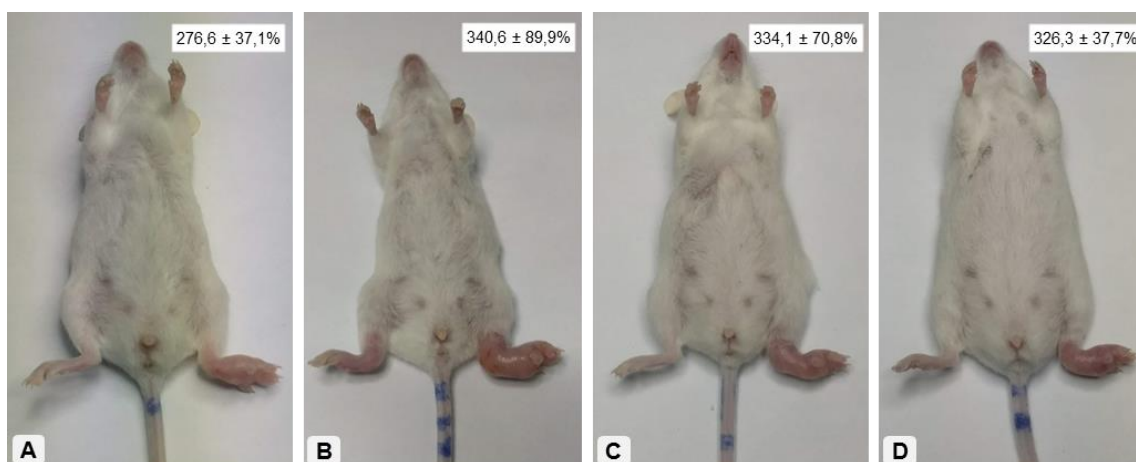
3.3 Efeito antinociceptivo pós-implantação de células do tumor S-180 na região intraplantar

3.3.1 Volume tumoral na pata

Os resultados apresentados na **figura 14** confirmam a proliferação significativa das células de sarcoma 180 e a formação do tumor na pata traseira dos animais no 14º dia após a indução, quando todos os grupos apresentaram um aumento expressivo do membro. A mensuração do volume tumoral se deu por pletismografia de pata e os grupos apresentaram os seguintes percentuais de aumento do mesmo membro quando comparado ao tempo zero (pata antes da indução do tumor): 276,6 \pm 37,1; 340,6 \pm 89,9; 334,1 \pm 70,8 e 326 \pm 37,7% para os grupos controle, morfina, FC 25 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Esses resultados corroboram a confiabilidade do

protocolo experimental, uma vez que, além do desenvolvimento significativo dos tumores, os tamanhos das patas em todos os grupos se mantiveram em uma determinada média, sem variância significativa ($p < 0,05$).

Figura 14 – Camundongos transplantados com tumor Sarcoma 180 na região intraplantar após 14 dias da indução e tratados nesse mesmo dia com a fração com casearinas extraída das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz. **A** - Controle, **B** - Morfina 5 mg/kg (i.p.), **C** - FC 25 mg/kg i.p., **D** - FC 50 mg/kg oral. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. do percentuação de crescimento da pata ($n = 7$ /grupo) em relação ao estado basal.

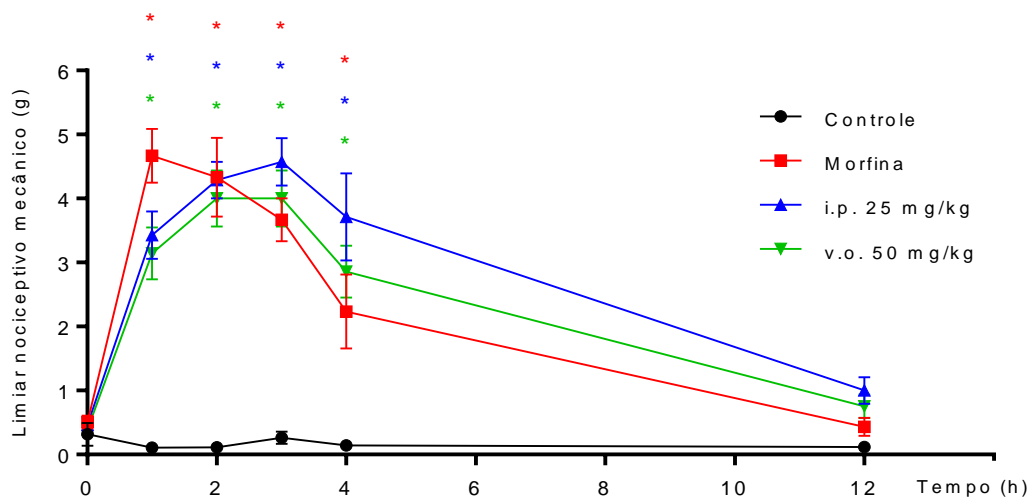


3.3.2 Efeito antialodínico demonstrado com filamentos de Von Frey

A FC 25 mg/kg i.p e 50 mg/kg oral aumentaram significativamente o limiar de retirada da pata no teste do Von Frey em diferentes tempos entre a 1^a a 4^a h após o tratamento quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

O grupo tratado com a FC por via intraperitoneal na dose de 25 mg/kg teve um pico de ação tardio de ação ($4,6 \pm 0,4$ g) em torno da 3^a h após o tratamento, se comparado com o grupo que recebeu morfina, o qual apresentou um efeito máximo na 1^a h ($4,7 \pm 0,4$ g). Na 12^o h após o tratamento, nenhum dos grupos testados mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$) (**Figura 15**).

Figura 15 – Limiar nociceptivo mecânico em animais transplantados com o tumor S-180 na pata, avaliado pelo aparelho Von Frey após tratamento agudo com uma dose da fração com casearinas. Animais tratados com a FC nas doses de 25 e 50 mg/kg via i.p. e v.o. respectivamente, controle (veículo) e morfina (5 mg/kg i.p.). Os valores correspondem à média \pm E.P.M., n=7. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

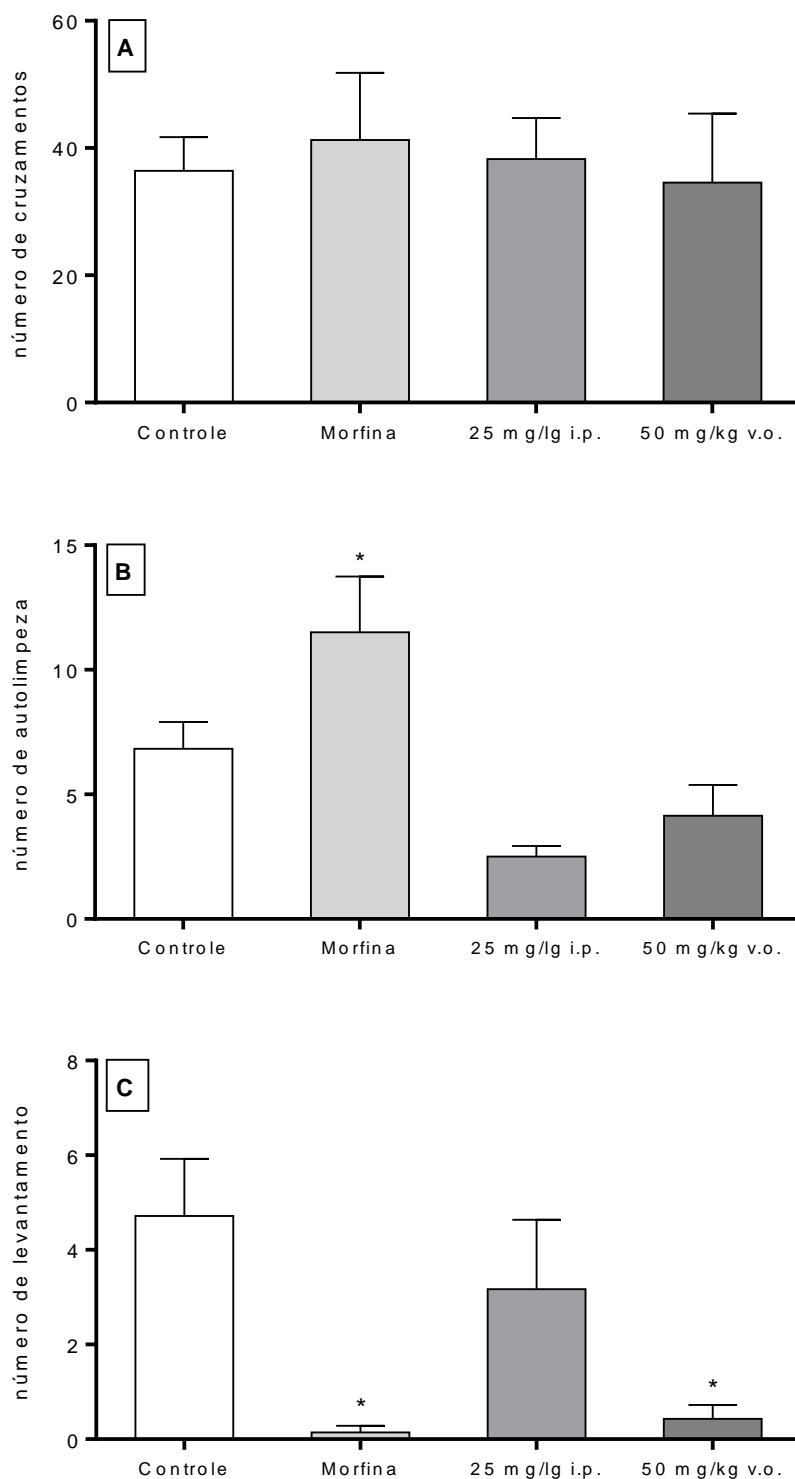


3.3.3 Alterações comportamentais e motoras

3.3.3.1 Teste campo aberto

A **figura 16A** mostra os resultados da atividade motora no teste de campo aberto, onde todos os grupos tratados não apresentaram diferença significativa em relação ao número de cruzamentos nos quadrantes comparados ao grupo controle não tratado ($p > 0,05$). Os animais do grupo controle positivo analgésico (morfina 5 mg/kg i.p.) apresentaram alterações significativas nos parâmetros autolimpeza onde foi observado um aumento ($*11,5 \pm 2,3$) e levantamento em que foi verificada uma diminuição ($*0,1 \pm 0,1$) assim como no grupo FC 50 mg/kg oral ($*0,4 \pm 0,2$) ($p < 0,05$) (**Figura 16B e 16C**).

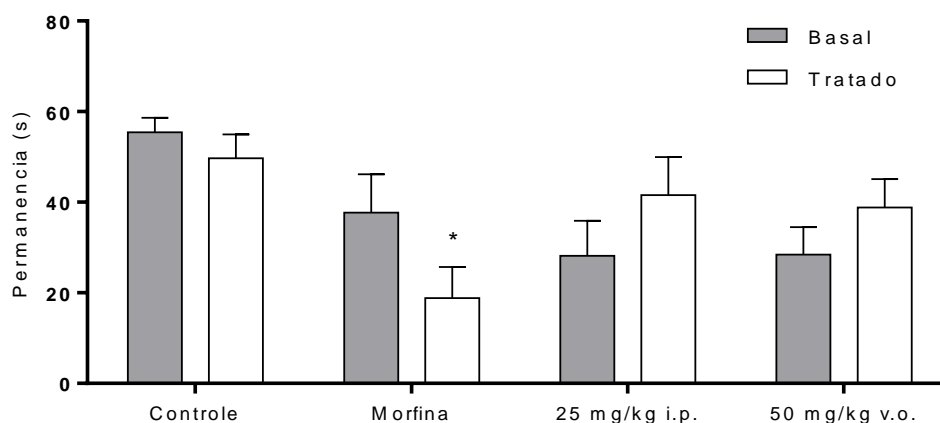
Figura 16 – Efeito do tratamento com a fração com caseínas em diferentes parâmetros avaliados pelo teste do campo aberto. Foram quantificados os números de cruzamentos, autolimpeza e levantamentos em camundongos transplantados com o tumor S-180 na região intraplantar. Animais tratados com a FC nas doses de 25 e 50 mg/kg via i.p. e v.o. respectivamente, controle (veículo) e morfina (5 mg/kg i.p.). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. $n=7$ /grupo. $*p<0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.



3.3.3.2 Teste de *Rota-Rod*

A **figura 17** mostra os resultados da ação da FC sobre a atividade motora forçada em camundongos transplantados com o tumor S-180 na região intraplantar. Verificou-se apenas uma redução significativa de permanência na barra giratória ($*18,8 \pm 6,8$ s) dos animais que receberam morfina em relação ao grupo controle tratado apenas com o veículo ($49,7 \pm 5,2$ s) ($p < 0,05$).

Figura 17 – Efeito da fração rica em casearinas sobre a atividade locomotora no teste do *Rota-Rod* em camundongos com o tumor S-180 na pata. Avaliação pré-tratamento (basal) e pós-tratamento (tratado). Animais tratados com a FC nas doses de 25 e 50 mg/kg via i.p. e v.o. respectivamente, controle (veículo) e morfina (5 mg/kg i.p.). Média \pm E.P.M do tempo de permanência na barra giratória (s) ($*p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Student Newman-Keuls).



4 DISCUSSÃO

Os avanços no diagnóstico e no tratamento do câncer têm favorecido a sobrevivência de cerca de dois terços dos indivíduos por mais de cinco anos após o diagnóstico. Esse maior número de sobreviventes representa um desafio clínico crescente, resultando em uma grande proporção de pacientes com dor crônica oncológica ou associada a outros tipos de dores, sendo considerada uma das sequelas mais recorrentes causadas pela doença e/ou seu tratamento. Geralmente, o controle dessas dores requer o uso de analgésicos, o que tem favorecido o surgimento de efeitos colaterais recorrentes (JONGEN et al., 2013; THOMSON et al., 2016; BROWN; FARQUHAR-SMITH, 2017; SHARMA et al., 2017; MANCHIKANTI et al., 2018).

Historicamente, as raízes de *C. sylvestris* Sw. são preparadas por decocção para consumo oral com o intuito de aliviar dores de diferentes origens (HIRSCHMANN, ARIAS, 1990). Porém, há escassez de estudos com essa planta e lacunas sobre o(s) mecanismo(s) de ação. Por isso, inicialmente, usou-se um modelo simples de dor visceral, pouco específico, mas muito sensível, o teste das contorções abdominais (BENTLEY et al., 1981; SOWEMIMO et al., 2013), como uma ferramenta de rastreio que permitiu avaliar a atividade antinociceptiva da FC. Embora pouco seletivo, já que a dor induzida por ácido acético envolve tanto vias centrais quanto periféricas, devido à hiperalgesia resultante da sensibilização de fibras aferentes na periferia e na medula espinhal, esse modelo é classicamente utilizado para avaliar a dor aguda *in vivo* envolvendo respostas hiperalgésicas por liberação de prostaglandinas, citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), bradicinina e mediadores simpáticos (DUARTE, NAKAMURA, FERREIRA, 1988; HEGEN et al., 2008). Aqui, foi possível detectar que a FC reduziu de forma significativa as contorções abdominais por ambas as vias de administração utilizadas e que não houve diferença da ação antinociceptiva nas maiores doses (25 mg/kg i.p. e 50 mg/kg oral) após dose única ou múltiplas (sete dias tratamento). Estudos de Ruppelt et al. (1991), Esteves et al. (2005) e Mattos et al. (2007), trabalhando com o extrato aquoso na forma de chá das folhas frescas e secas, com o óleo essencial e com extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. sylvestris* Sw., nas doses de 1000 mg/kg, 125 mg/kg e de 30 a 300 mg/kg, respectivamente, também mostraram redução de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Islam et al. (2016) sugerem que diterpenos como os presentes na FC podem ser candidatos proeminentes em pesquisa de drogas neurobiológicas, como as usadas para tratar a dor neuropática e inflamatória. Pensando nisso, em seguida realizou-se o teste de lambertura da pata induzida por injeção intraplantar de formalina, considerado um modelo válido e confiável de avaliação da nocicepção e sensível a várias classes de fármacos analgésicos (DUBUISSON, DENNIS, 1977; HUNSKAAR, HOLE, 1987; HUNSKAAR et al., 1987). Este modelo é mais bem específico quando comparado ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, já que ele desencadeia dois períodos distintos com diferentes mecanismos nociceptivos. A resposta na

primeira fase, dita periférica ou de origem neurogênica, é observada nos primeiros minutos após a administração intraplantar da formalina, como consequência da liberação imediata dos aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, e intenso aumento na atividade das fibras aferentes primárias. Por outro lado, as reações tardias da segunda fase, caracterizadas pela liberação de mediadores inflamatórios, são observadas de 15 a 30 min após o início do estímulo e resultam da ativação de neurônios aferentes primários e neuropeptídeos sensoriais como a substância P na região dorsal da medula espinhal (ROSLAND et al., 1990a,b; TJØLSEN et al., 1992; SHIN et al., 2011). Nesse ensaio, a FC reduziu o número de lambeduras em todas as doses e vias testadas durante a fase neurogênica. Na fase inflamatória, apenas as doses orais (25 e 50 mg/kg) revelaram eficácia antinociceptiva.

O uso de bloqueadores de receptores serve para avaliar de maneira mais específica a participação de vias responsáveis pelo efeito antinociceptivo da FC e entender seu(s) mecanismo(s) de ação. Tanto na primeira como na segunda fase do teste de indução da nocicepção por formalina, a naloxona e o inibidor de óxido nítrico L-NAME reduziram o efeito antinociceptivo da FC 50 mg/kg oral, sugerindo que a resposta antinociceptiva esteja ligada à fase neurogênica e inflamatória da dor. Estes resultados indicam, previamente, que o efeito antinociceptivo induzido pela FC seja mediado pelo sistema opioidérgico periférico via receptores μ (mi), δ (delta) e/ou κ (kappa), de forma semelhante ao mecanismo de ação da morfina e de outros terpenos já relatados na literatura (AKÇA et al., 2002; PASSOS et al., 2015; CALÁS et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante na dor aguda e crônica em ambos os níveis central e periférico. Nesse contexto, ele é produzido por um sistema de sintases de NO (NOS) usando L-arginina como substrato. Dentre as isoformas de NOS, a endotelial (NOS1) e a neuronal (NOS3) são constitutivas (cNOS) e estão diretamente envolvidas com a homeostase, já a NOS2 é chamada de NOS indutível (iNOS) e está ligada a fenômenos fisiopatológicos. Constitutivamente, NO é produzido em quantidades pico-nanomolares por curtos períodos e por vias dependentes de cálcio. Enquanto isso, a iNOS produz NO por períodos mais longos (horas a dias), devido à ativação e participação celulares de estímulos pró-inflamatórios,

como citocinas e vasodilatores locais (VIARO, NOBRE, EVORA, 2000; ROCHA et al., 2003; MEHANNA et al., 2018).

Quando formado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase que aumenta os níveis intracelulares de GMPc, e modula a atividade de muitos alvos celulares, incluindo a proteína quinase dependente de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), além de canais iônicos, como canais de K⁺ sensíveis a ATP. Isso sugere que agentes que facilitem ou induzam a síntese de NO tenham efeito antinociceptivo (MEHANNA et al., 2018).

É bem provável que o envolvimento de vias nitrérgicas no controle da dor demonstrado pela FC tenha efeitos mediados também por opióides, já que estudos mostram que a morfina, atuando em receptores opióides periféricos, também ativa a via NO-GMPc, induzindo efeito analgésico periférico, enquanto outras pesquisas indicam que a inibição da NOS potencializa a antinocicepção espinhal mediada por receptores opióides μ , δ e, menos extensivamente, κ , na dor aguda e prolongada e também atenua a tolerância para a ação da antinocicepção de morfina (MOORE et al., 1993; BHARGAVA et al., 1996).

Na segunda fase, mais duradoura, todas as ferramentas farmacológicas utilizadas foram capazes de reduzir o efeito da FC, achado que indica que a FC esteja atuando como agente antinociceptivo por vias distintas, porém interligadas, confirmando estudos prévios que indicam que as duas fases do teste da formalina podem ter diferentes mecanismos nociceptivos devido à sensibilização inflamatória local e/ou espinhal (HUNSKAAR, HOLE, 1987; LI et al., 2010; FISCHER et al., 2014). A exceção foi a glibenclamida, a qual modulou o efeito da FC quando administrada em associação.

No contexto da inibição da dor, o antagonista flumazenil reverteu à ação da FC, indicando a possibilidade da participação de vias gabaérgicas no efeito antinociceptivo. Afinal, a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, como a principal responsável pelo sistema do controle de comporta, ativa neurônios inibitórios na lâmina II (substância gelatinosa) do corno dorsal da substância cinzenta da medula espinhal via liberação de opióides endógenos (encefalinas, dinorfinas e/ou β -endorfina), 5-hidroxitriptamina (serotonina) e/ou por ativação do *locus coeruleus* que libera noradrenalina. Essa ativação de neurônios inibitórios ocorre graças à liberação de GABA, favorecendo o bloqueio da neurotransmissão de 1ª ordem por

aumentar o limiar de ativação dos neurônios de 2ª ordem com a hiperpolarização pós-sináptica, devido ao aumento da gK^+ e/ou inibição pré-sináptica da liberação de glutamato e substância P (AIRES, 2018; FERRARI et al., 2019).

Algumas das vias de controle da nocicepção como a serotoninérgica e adrenérgica são em parte moduladas pelo sistema colinérgico. Tanto que a administração de agonistas nicotínicos (nicotina) e muscarínicos (pilocarpina) causam efeitos antinociceptivos no modelo do ácido acético e aumentam a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA e a glicina (JONES et al., 2007), demonstrando que o sistema colinérgico tem importância fundamental no controle endógeno da dor e está envolvido na ação antinociceptiva da FC.

A própria liberação da acetilcolina é aumentada nos neurônios do sistema nervoso central a partir da ativação de receptores opióides pré-sinápticos pela morfina, causando a potencialização do efeito analgésico (ABELSON, KOMMALAGE, MHÖGLUND, 2004), o que ajuda a entender porque o bloqueio de receptores opióides com naloxona reduziu a ação antinociceptiva da FC, provavelmente, também por redução da liberação descendente de acetilcolina, já que a administração sistêmica de morfina pode ser antagonizada pela administração intratecal de antagonistas muscarínicos, reforçando a ideia do sinergismo dos sistemas opióide e colinérgico (TAGUCHI et al., 1999).

A acetilcolina atua como neurotransmissor e neuromodulador após a liberação de grupos-chave de neurônios de projeção colinérgica e interneurônios distribuídos pelo Sistema Nervoso Central, sendo responsável por mediar muitas funções cerebrais, inclusive a transmissão e percepção da dor (NASER, KUNER, 2017). Assim, a ação antinociceptiva de uma substância por via muscarínica é promissora, pois esses receptores têm emergido como um importante alvo terapêutico para várias doenças (TAMADDONFARD et al., 2017).

Previamente, estudos de Mattos et al. (2007) usando diferentes modelos, como placa quente, sensibilização induzida por ovoalbumina e de contorções abdominais, avaliaram a capacidade antinociceptiva de um extrato hidroalcolólico das folhas de *C. sylvestris* Sw.. Tais resultados mostraram que

somente doses agudas muito mais altas, como 100 ou 300 mg/kg oral do extrato, que aquelas testadas aqui com a FC, foram capazes de aumentar a latência para resposta ao calor e à ovoalbumina sensibilizante. Por outro lado, uma única dose de 30 mg/kg desse extrato, dose essa semelhante às que foram usadas para a FC, já foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais e tal ação farmacológica foi revertida por naloxona, achados que sugerem que os receptores opióides estão, certamente, diretamente envolvidos na ação biológica da FC.

É importante enfatizar que a administração do antagonista glibenclamida, previamente à FC, aumentou o efeito antinociceptivo desta. Como esse fármaco hipoglicemiante da classe das sulfoniureias é inibidor de canais de potássio ATP-dependente, e como a morfina, atuando em receptores opióides periféricos, também ativa a via NO-GMPc, é provável que sua ação antinociceptiva quando associada à FC favoreça estímulos excitatórios descendentes, ativando interneurônios inibitórios da substância gelatinosa, induzindo efeito analgésico periférico por dessensibilização de neurônios aferentes secundários e/ou por inibição pré-sináptica da liberação de glutamato e substância P (MELZACK, WALL, 1965).

Como a dor verificada na fase inicial do teste de formalina é causada predominantemente pela ativação de fibras C amielínicas em decorrência de estímulos periféricos (TJØLSEN et al., 1992), e como os estudos anteriores sugerem ação central significativa somente com altas doses de extratos das folhas de *C. sylvestris* Sw. (evidenciada no teste de placa quente), acredita-se que a FC tenha ação, principalmente periférica, mas associada à inibição tardia da liberação ou da ação de mediadores neuroquímicos ao nível central na medula espinhal.

Pesquisas anteriores também apontam para a ação anti-inflamatória de diferentes partes da planta *C. sylvestris* Sw., principalmente de extratos alcoólicos, aquosos ou óleos essenciais das folhas, os quais têm demonstrado ação antiedematogênica, inibição da migração leucocitária, redução de processos inflamatórios em úlceras gástricas induzidas por ácido acético, da atividade de mieloperoxidase e de compostos derivados de radicais livres do nitrogênio no líquido broncoalveolar; prevenção do bloqueio neuromuscular e de danos teciduais locais causados por toxinas de cobras devido à inibição da

enzima fosfolipase A_2 e de proteases, favorecendo a cicatrização, neovascularização, proliferação de fibroblastos e da formação epitelial (RUPPELT et al., 1991; BORGES et al., 2000, 2001; SILVA et al., 2004; ESTEVES et al., 2005; ALBANO et al., 2013; CAMPOS et al., 2015; PIERRI et al., 2017).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a FC tem ação anti-inflamatória ainda mais potente que extratos ou óleos essenciais (*dados não publicados*). Como mediadores inflamatórios, como a IL- 1β , ativam nociceptores polimodais associados à fibra C e desempenham um papel importante na hiperalgesia cutânea desencadeada por estímulos mecânicos e/ou térmicos (REN, TORRES, 2009), a inibição da produção e/ou da ação de tais mediadores, pode ser um mecanismo de antinociceptiva da FC.

É possível que a ação anti-inflamatória das folhas esteja relacionada à capacidade antioxidante e à presença de compostos quimiopreventivos (WANG et al., 2009; SANTOS et al., 2010; ALBANO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015), os quais podem bloquear ou atrasar a evolução do processo patológico das respostas inflamatórias, diminuindo a dor associada à inflamação aguda ou prolongada. No que se refere à sinalização, a modulação da produção de espécies reativas de oxigênio é um alvo importante de controle das sensações desagradáveis decorrentes do estímulo algico, uma vez que compostos inibidores de radicais livres têm mostrado ação supressora da alodinia mecânica em um modelo de rato de dor óssea induzida por câncer (ZHOU et al., 2018).

Sabe-se que a dor neuropática ou crônica, semelhante àquela resultante do crescimento tumoral, e mimetizada por constrição do nervo ciático e de terminações nervosas em geral, sofre, por exemplo, redução do efeito analgésico da dipirona, se houver administração prévia de glibenclamida ou L-NAME, tanto que a administração intravenosa de nitroglicerina pode aliviar a dor espontânea e a causalgia em humanos (REIS, ROCHA, 2006; MENHANNA et al., 2018).

Células cancerígenas, como as da linhagem S-180, e o processo inflamatório decorrente da invasão tecidual por células tumorais, geram altos níveis de radicais livres que supostamente aumentam as concentrações de glutamato no meio extracelular, ativando e sensibilizando neurônios aferentes

primários, o que se traduz em maior frequência de estímulos nociceptivos (LOZANO-ONDOUA, SYMONS-LIGUORI, VANDERAH, 2013).

Em nossos achados, a FC foi capaz de aumentar significativamente o limiar nociceptivo no ensaio com filamentos de Von Frey, sugerindo um efeito antialodínico em camundongos transplantados com o tumor S-180. Sabe-se que em animais, a estimulação da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo inibe reflexos provocados por estímulos dolorosos, como a retirada da cauda ou da pata (SILVA et al., 2013). Então, é possível que a ação antinociceptiva da FC esteja associada, como descrito anteriormente, a vias descendentes que inibem os chamados receptores silenciosos tipo mecanossensitivos, os quais respondem somente quando sensibilizados por lesão tecidual induzida (no caso, pelo tumor S-180) e também podem participar em respostas hiperalgésicas (SAUERSTEIN et al., 2018).

Nos testes comportamentais do campo aberto e do *Rota-Rod*, os grupos dos animais tratados com a FC não apresentaram alterações significativas quanto à capacidade exploratória e a atividade locomotora, confirmando resultados de Mattos et al. (2007), os quais mostraram que o extrato hidroalcolólico das folhas não tem ação sedativa ou relaxante muscular. A não interferência da FC na capacidade exploratória e na atividade locomotora dos animais transplantados com S-180, demonstra resultados promissores do ponto de vista farmacológico, evidenciados pelo efeito antinociceptivo, sem alterações motoras.

5 CONCLUSÃO

A fração com casearinas mostrou efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química induzida por ácido acético e por formalina (em ambas as fases neurogênica e inflamatória). Tal efeito foi revertido e, portanto, é dependente, pelo menos, parcialmente dos sistemas opióide, colinérgico, gabaérgico e nitrérgico, e quando associada à inibidores de canais de K^+ , a ação antinociceptiva da fração foi intensificada. A fração com casearinas também demonstrou inibição da alodinia mecânica em camundongos portadores do tumor S-180 na região intraplantar sem alterações em parâmetros comportamentais e motores, indicando que a fração tenha ação,

principalmente, periférica, mas associada à inibição tardia da liberação ou da ação de mediadores neuroquímicos ou inflamatórios a nível central na medula espinhal.

REFERÊNCIAS

ABELSON, K. S.; KOMMALAGE, M.; HÖGLUND, A. U. Spinal cholinergic involvement after treatment with aspirin and paracetamol in rats. **Neuroscience Letters**, v. 368, n. 1, p. 116-20, 2004.

ACS - American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2013**. Atlanta: American Cancer Society, 2013. 64p.

AIRES, M. M. **Physiology**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

AKÇA, O.; DOUFAS, A. G.; SESSLER, D. I. Use of selective opiate receptor inhibitors to prevent postoperative ileus. **Minerva Anestesiologica**, v. 68, n. 4, p. 162-165, 2002.

ALBANO, M. N.; SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A. P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.

ARAÚJO, E. J.; OLIVEIRA, G. A.; SOUSA, L. Q.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; TOME, A. R.; PERON, A. P.; SANTOS, A. G.; CITÓ, A. M. L.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.3, p.791-1803, 2015.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-35, 1973.

BARBOSA, L. N. F.; FRANCISCO, A. L. A subjetividade do câncer na cultura: implicações na clínica contemporânea. **Revista da SBPH**, v. 10, n. 1, p. 9-24, 2007.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British Journal of Pharmacology**, v.73, n. 2, p.325-332, 1981.

BHARGAVA, H. N.; ZHAO, G. M. Effect of nitric oxide synthase inhibition on tolerance to the analgesic action of D-Pen2, D-Pen5 enkephalin and morphine in the mouse. **Neuropeptides**, v. 30, n. 3, p. 219-223, 1996.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract

of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n.1, p. 21-31, 2000.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSHECHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **British journal of psychology**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1957.

BROWN, M.; FARQUHAR-SMITH, P. Pain in cancer survivors; filling in the gaps. **British Journal of Anaesthesia**, v. 119, n. 4, p. 723-736, 2017.

CALÁS, T.; WILKIN, M.; OLIPHANT, C. M. Naloxone: An opportunity for another chance. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 12, n. 3, p. 154-160, 2016.

CAMPOS, E. P.; TROMBINI, L. N.; RODRIGUES, R.; PORTELLA, D. L.; WERNER, A. C.; FERRAZ, M. C.; OLIVEIRA, R. V.; COGO, J. C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; ARANHA, N.; GERENUTTI, M. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 269, p. 1-8, 2015.

CARLINI, E.A., BURGOS, V. *Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam*. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.

CAVENAGO, B. C.; DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; ESTRELA, C.; GARLET, G. P.; TANOMARU-FILHO, M.; WECKWERTH, P. H.; ANDRADE, F. B.; DUARTE, M. A. H. Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontia**, v. 43, n. 5, p. 779-786, 2017.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

COLLIER, H. O. J., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.

DUARTE, J. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1988.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. Formalin Test - Quantitative Study of Analgesic Effects of Morphine, Meperidine, and Brain-Stem Stimulation in Rats and Cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p.161-174, 1977.

ESPINOSA, J.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A.; GÜNTZEL, A. R. C.; RÜCKER, B.; CASALI, E. A.; ETHUR, E. M.; WINK, M. R.; TORRES, I. L. S. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* SW exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, 2015.

ESTEVEES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 191-196, 2005.

FALLON, M. T. Neuropathic pain in cancer. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 105-111, 2013.

FERRARI, L. F.; ARALDI, D.; BOGEN, O.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Systemic morphine produces dose-dependent nociceptor-mediated biphasic changes in nociceptive threshold and neuroplasticity. **Neuroscience**, v. 398, n. 1, p. 64-75, 2019.

FERREIRA, S.H. A new method for measuring variations of rat paw volume. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 31, n. 9, p. 648, 1979.

FERREIRA, P. M. P.; BEZERRA, D. P.; SILVA, J. N.; COSTA, M. P.; FERREIRA, J. R. O.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; CAVALHEIRO, A. J.; MACHADO, C. M. L.; CHAMMAS, R.; ALVES, A. P. N. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 511-521, 2014.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neuroscience Letters**, v. 21, pp. 100-105, 2016.

GOUVEIA, D. N.; COSTA, J. S.; OLIVEIRA, M. A.; RABELO, T. K.; SILVA, A. M. O. E.; CARVALHO, A. A.; SANTOS, R. M.; SANTOS, S. L.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; SANTOS, M. R. V. D.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; GUIMARÃES, A. G. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS.

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 105, n. 1, p. 652-661, 2018.

GUIMARÃES, A. G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; MELO, N. S. R.; ALVES, R. S.; DE LUCCA JUNIOR, W.; BEZERRA, D. P.; GELAIN, D. P.; QUINTANS JUNIOR, L. J. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 8-15, 2014.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; ALVES, R. D. S.; MENEZES, P. D. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; BEZERRA, D. P.; QUINTANS, L. J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, n. 1, p. 69-76, 2015.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular, **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.

HEGEN, M.; KEITH, J. C. J. R.; COLLINS, M.; NICKERSON-NUTTER, C. L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 11, p. 1505-1515, 2008.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais. Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 159-172, 1990.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O. G.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1987a.

HUNSKAAR S.; HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

ISLAM, M. T.; SILVA, C. B.; ALENCAR, M. V.; PAZ, M. F.; ALMEIDA, F. R.; MELO-CAVALCANTE, A. A. Diterpenes: Advances in Neurobiological Drug Research. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 915-928, 2016.

JONGEN, J. L.; HUIJSMAN, M. L.; JESSURUN, J.; OGENIO, K.; SCHIPPER, D.; VERKOUTEREN, D. R.; MOORMAN, P. W.; VAN DER RIJT, C. C.;

- VISSERS, K. C. The evidence for pharmacologic treatment of neuropathic cancer pain: beneficial and adverse effects. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 46, n. 4, p. 581-590, 2013.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Florianópolis: Lagoa, 2003. 119p.
- LESTER, P.; GAYNOR, J. S. Management of cancer pain. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 951-966, 2000.
- LITTLE, E. L, WADSWORTH, F. L. **Common trees of Puerto Rico and Virgin Islands**. Washington: Department of Agriculture, 1964, 548 p.
- LOZANO-ONDOUA, A. N.; SYMONS-LIGUORI, A. M.; VANDERAH, T. W. Cancer-induced bone pain: Mechanisms and models. **Neuroscience Letters**, v. 557, n. A, p. 52-59, 2013.
- LU, W.; ROSENTHAL, D.S. Oncology Acupuncture for Chronic Pain in Cancer Survivors: A Reflection on the American Society of Clinical Oncology Chronic Pain Guideline. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 519-533, 2018.
- MANCHIKANTI, L.; MANCHIKANTI, K. N.; KAYE, A. D.; KAYE, A. M.; HIRSCH, J. A. Challenges and concerns of persistent opioid use in cancer patients. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 14, p. 1-14, 2018.
- MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J.; COLLE, T. D.; PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n.1-6, p. 1-6, 2007.
- MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 476-484, 2005.
- MEHANNA, M. M.; DOMIATI, S.; NAKKASH, CHMAISSE, H.; EL MALLAH, A. Antinociceptive effect of tadalafil in various pain models: Involvement of opioid receptors and nitric oxide cyclic GMP pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 352, n. 1, p. 170-175, 2018.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-979, 1965.
- MOORE, P. K.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.; HART, S. L.; BABBEDGE, R. C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 219-224, 1993.

NASER, P. V.; KUNER, R. Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain. **Neuroscience**, v. 17, p. 1-14, 2017.

PASSOS, F. F.; LOPES, E. M.; ARAÚJO, J. M.; SOUSA, D. P.; VERAS, L. M.; LEITE, J. R.; ALMEIDA, F. R. Involvement of cholinergic and opioid system in γ -terpinene-mediated antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

PEREIRA, F. G.; MARQUETE, R.; DOMINGOS, L. T.; ROCHA, M. E. N.; FERREIRA-PEREIRA, A.; MANSUR, E.; MOREIRA, D. L. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2817-2824, 2017.

LI, K.; LIN, T.; CAO, Y.; LIGHT, A. R.; FU, K. Y. Peripheral formalin injury induces 2 stages of microglial activation in the spinal cord. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 11, p. 1056-1065, 2010.

PIOVEZAN, A. P.; BATISTI, A. P.; BENEVIDES, M. L. A. C. S.; TURNES, B. L.; MARTINS, D. F.; KANIS, L.; DUARTE, E. C. W.; CAVALHEIRO, A. J.; BUENO, P. C. P.; SEED, M. P.; NORLING, L. V.; COOPER, D.; HEADLAND, S.; SOUZA, P. R. P. S.; PERRETTI, M. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 179-188, 2017.

REIS, F. J.; ROCHA, N. P. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 514-522, 2006.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 57-64, 2009.

ROCHA, F. A. C.; ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-217, 2003.

ROSLAND, J. H.; TJØLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-242, 1990a.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 66, n. 5, p. 382-386, 1990b.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmaceutical screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom –I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 203–205, 1991.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; GOMES TININIS, A.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SANTOS, P. L.; BRITO, R. G.; MATOS, J. P. S. C. F.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Fos protein as a marker of neuronal activity: a useful tool in the study of the mechanism of action of natural products with analgesic activity. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 4560-4579, 2018.

SANTOS, W. B. R.; MELO, M. A. O.; ALVES, R. S.; BRITO, R. G.; RABELO, T. K.; PRADO, L. S.; SILVA, V. K. S.; BEZERRA, D. P.; MENEZES-FILHO, J. E. R.; SOUZA, D. S.; VASCONCELOS, C. M. L.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; LUCCA JÚNIOR, W.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUIMARÃES, A. G. p-Cymene attenuates cancer pain via inhibitory pathways and modulation of calcium currents. **Phytomedicine**, In Press, n. 152836, p. 1-33, 2019.

SAUERSTEIN, K.; LIEBELT, J.; NAMER, B.; SCHMIDT, R.; RUKWIED, R.; SCHMELZ, M. Low-frequency stimulation of silent nociceptors induces secondary mechanical hyperalgesia in human skin. **Neuroscience**, v. 387, n. 1, p. 4-12, 2018.

SCHABEL, F.; GRISWOLD JR, D. P.; LASTER, W. R.; CORBETT, T. H.; LLOYD, H. H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 1, n. 4, p. 411 - 435, 1977.

SHARMA, A.; MAGOTRA, A.; DOGRA, A.; RATH, S. K.; RAYEES, S.; WAZIR, P.; SHARMA, S.; SANGWAN, P. L.; SINGH, S.; SINGH, G.; NANDI, U. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety profiling of IS01957, a preclinical candidate possessing dual activity against inflammation and nociception. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 91, p. 216-225, 2017.

SHIN, D. J.; JEONG, C. W.; LEE, S. H.; YOON, M. H. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test of rats. **Neuroscience Letters**, v. 494, n. 3, p. 207-210, 2011.

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

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.

SOWEMIMO, A.; ONAKOY, M.; FAGEYINBO, M. S.; FADOJU, T. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Blepharis maderaspatensis* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 830-835, 2013.

TAMADDONFARD, E.; ERFANPARAST, A.; FARSHID, A. A.; DELKHOSH-KASMAIE, F. Role of ventrolateral orbital cortex muscarinic and nicotinic receptors in modulation of capsaicin-induced orofacial pain-related behaviors in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, p. 399-404, 2017.

TAGUCHI, K.; KATO, M.; KIKUTA, J.; ABE, K.; CHIKUMA, T.; UTSUNOMIYA, I.; MIYATAKE, T. The Effects of Morphine-Induced Increases in Extracellular Acetylcholine Levels in the Rostral Ventrolateral Medulla of Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 3, p. 1539-1544, 1999.

THOMSON, L.; RAIT, K.; MILLER, L. Opioids in the management of persistent non-cancer pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 11, p. 552-554, 2016.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TORRES, R. B., YAMAMOTO, K. 1986. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p.239-258, 1986.

VANDER WEND, C.; MARGOLIN, S. **Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats**. Federation Proceedings, v.15, 1956, 494p.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expression of Nitric Oxide Synthases in the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, n. 4, p. 380-393, 2000.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y. H.; SMILLIE, T. A.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, n. 13, p. 436-441, 2009.

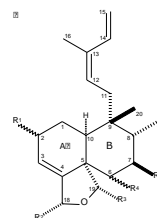
WANG, T. C.; WANG, J.; XU, X.; MA, J. L.; WANG, X. F. Tonic modulation of nociceptive behavior and allodynia by cannabinoid receptors in formalin test in rats. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 58, n. 1, p. 72-78, 2015.

YARDEN, Y.; CALDES, C. Basic cancer research: why it is essential for the future of cancer therapy. **Bulletin du Cancer**, v. 101, n. 9, p. E25-E26, 2014.

ZHOU, Y. Q.; LIU, D. Q.; CHEN, S. P.; SUN, J.; ZHOU, X. R.; RITTNER, H.; MEI, W.; TIAN, Y. K.; ZHANG, H. X.; CHEN, F.; YE, D. W. Reactive oxygen species scavengers ameliorate mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain. **Redox Biology**, v. 14, n. 1, p. 391-397, 2018.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A Fração com Casearinas (FC) e o seu constituinte majoritário isolado Casearina X (Cas X) se mostraram eficientes contra a linhagem tumoral murina Sarcoma 180 (S-180), quando administrados por via intraperitoneal e oral, e observações bioquímicas por citometria de fluxo sugerem que a fração cause morte celular por necroptose;

- Ressalta-se também a significativa ação antiproliferativa da FC frente às linhagens tumorais de origem humana - carcinoma do colón e glioblastoma - no ensaio *Hollow Fiber Assay* e pronunciada redução de tumores em modelo xenográfico de tumor intestinal sem alterações significativas em órgãos-chave e em parâmetros hematológicos;

- A FC reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo de lambadura de pata no teste de formalina em ambas as fases neurogênica e inflamatória;

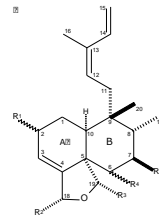
- A ação antinociceptiva da FC foi revertida e, portanto, é dependente, pelo menos, parcialmente dos sistemas opióide, colinérgico, gabaérgico e nitrérgico, e quando associada à inibidores de canais de K^+ , a ação antinociceptiva da fração foi intensificada;

- A fração também demonstrou inibição da alodinia mecânica em camundongos portadores do tumor S-180 na região intraplantar sem alterações em parâmetros comportamentais e motores, indicando que a fração tenha ação, principalmente, periférica, mas associada à inibição tardia da liberação ou da ação de mediadores neuroquímicos ou inflamatórios ao nível central na medula espinhal.

Todos esses achados enfatizam a importância farmacológica de compostos diterpênicos e reafirmam o papel etnofarmacológico e as grandes possibilidades terapêuticas que a planta *Casearia sylvestris* Swartz possui para o desenvolvimento de medicamentos com atividade anticâncer e analgésica.



ANEXOS



ANEXO A - Comprovante de registro para coleta da *Casearia sylvestris* no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 33429-1	Data da Emissão: 28/03/2012 23:00
Dados do titular	
Nome: Paula Carolina Pires Bueno	CPF: 218.589.928-77

Ressalvas

- 1 As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
- 2 A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
- 3 O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
- 4 É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
- 5 Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
- 6 A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
- 7 Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
- 8 Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
ESPECIE	Casearia spp.

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42212383



Página 1/1

ANEXO B - Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



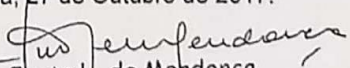
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Análises não clínicas da atividade farmacotológica e ecotoxicológica de uma fração rica em casearinas em diferentes modelos in vitro, ex vivo e in vivo*", registrada nº 373/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. PAULO MICHEL PINHEIRO FERREIRA do Departamento Núcleo de Tecnologia Farmacêutica/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/10/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	20/11/2017 à 20/11/2019
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ <i>swiss</i> 2. Peixe/ <i>P. reticulata</i> 3. Rato heterogênico/ <i>novergicus</i>
Nº de Animais	1. 200 2. 120 3. 25
Peso/ Idade	1. 20-30 g/ 2 meses 2. 60 dias 3. 120-130g/ 3 meses
Sexo	1. Fêmeas 2. 60 Machos e 60 Fêmeas 3. Fêmeas
Origem	Camundongos e ratos-Biotério Central da UFPI Peixe- Lojas agrícolas e/ou de aquários.

Teresina, 27 de Outubro de 2017.


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO C – Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
 Cadastro nº A33EA7A

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A33EA7A**
 Usuário: **Universidade Federal do Piauí**
 CPF/CNPJ: **06.517.387/0001-34**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica Bioprospecção Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Casearia sylvestris

Título da Atividade: **Análises não clínicas da atividade farmacotoxicológica de uma fração rica em casearinas em diferentes modelos experimentais**

Equipe

Paulo Michel Pinheiro Ferreira	Universidade Federal do Piauí
Jurandy do Nascimento Silva	Universidade Federal do Piauí
Denise Barbosa Santos	Universidade Federal do Piauí
Amanda Freitas Goudinho	Universidade Federal do Piauí
Cláudia do Ó Pessoa	Universidade Federal do Ceará
Paula Carolina Pires Bueno	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Alberto José Cavalheiro	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Vanderlan da Silva Bolzani	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Manoel Odorico de Moraes Filho	Universidade Federal do Ceará

Parceiras Nacionais

48.031.918/0006-39 / UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Anais da Academia Brasileira de Ciências, Jour**

Data do Cadastro: **03/02/2018 09:32:30**

Situação do Cadastro: **Concluído**



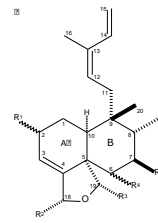
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 9:09 de 25/07/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



APÊNDICES



APÊNDICE A - Artigo publicado no *Journal of Ethnopharmacology*.

“Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations”. Autores: Paulo Michel Pinheiro Ferreira; Daniel Pereira Bezerra; Jurandy do Nascimento Silva; Marcília Pinheiro da Costa; José Roberto de Oliveira Ferreira; Nylane Maria Nunes Alencar; Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo; Alberto José Cavalheiro; Camila Maria Longo Machado; Roger Chammas; Ana Paula Negreiros Nunes Alves; Manoel Odorico de Moraes; Claudia Pessoa.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jepPreclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations

Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,b,c,*}, Daniel Pereira Bezerra^d,
Jurandy do Nascimento Silva^c, Marcília Pinheiro da Costa^{b,e},
José Roberto de Oliveira Ferreira^b, Nylane Maria Nunes Alencar^f,
Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo^f, Alberto José Cavalheiro^g,
Camila Maria Longo Machado^h, Roger Chammasⁱ, Ana Paula Negreiros Nunes Alves^j,
Manoel Odorico de Moraes^{f,k}, Claudia Pessoa^{f,k}

^a Laboratory in Experimental Cancerology, Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^c Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^d Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil

^e Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^f Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^g Chemistry Institute, State University of São Paulo, Araraquara, Brazil

^h Radioisotopes Research Laboratory, Center for Medical Nuclear, State University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ⁱ Department of Radiology, Faculty of Medicine, State University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^j Department of Clinical Odontology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^k Oswaldo Cruz Foundation, Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2016

Received in revised form

7 April 2016

Accepted 7 April 2016

Available online 8 April 2016

Keywords:

Casearin X

Hollow fiber assay

Sarcoma 180

Antineoplastic

Leukogram

Toxicity

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Casearia sylvestris* (Salicaceae) is found in South America and presents antiulcerogenic, cytotoxic, antimicrobial, anti-inflammatory and antihypertensive activities.

Aim of the study: To assess the *in vivo* and *ex vivo* antitumor action of a fraction with casearins (FC) and its main component - Casearin X-isolated from *C. sylvestris* leaves.

Materials and methods: Firstly, Sarcoma 180 bearing Swiss mice were treated with FC and Cas X for 7 days. Secondly, BALB/c nude animals received hollow fibers with colon carcinoma (HCT-116) or glioblastoma (SF-295) cells and were treated with FC for 4 days. On 5th day, proliferation was determined by MTT assay.

Results: FC 10 and 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral and Cas X 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral revealed tumor growth inhibition rates of 35.8, 86.2, 53.7, 90.0 and 65.5% and such tumors demonstrated rare mitoses and coagulation necrosis areas. Similarly, FC reduced multiplying of HCT-116 and SF-295 cells when evaluated by the Hollow Fiber Assay (2.5 and 5 mg/kg/day i.p. and 25 and 50 mg/kg/day oral), with cell growth inhibition rates ranging from 33.3 to 67.4% ($p < 0.05$). Flow cytometry experiments revealed that FC reduced membrane integrity and induced DNA fragmentation and mitochondrial depolarization ($p < 0.05$).

Conclusions: FC and Cas X were efficient antitumor substances against murine and human cancer cells and caused reversible morphological changes in liver, kidneys and spleens, emphasizing clerodane diterpenes as an emerging class of anticancer molecules.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratory in Experimental Cancerology, Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil.

E-mail address: pmpf@ufpi.edu.br (P.M.P. Ferreira).

1. Introduction

Casearia sylvestris Swartz (Salicaceae) is a plant widely distributed in Brazil and known as “guaçatonga”, “café silvestre” and

“cafezinho do mato”. Ethanol extracts of the leaves and their essential oils have antiulcerogenic activity and reduce gastric volume without altering the stomach pH, which corroborates their use in gastrointestinal disorders (Aboin et al., 1987; Basile et al., 1990; Esteves et al., 2005) and water extracts show phospholipase A₂ inhibitory activity that prevents damage effects on the muscular tissue after toxin inoculation (Borges et al., 2000, 2001; Cavalcante et al., 2007; Da Silva et al., 2008a).

Casearia sylvestris presents antimicrobial action against pathogens as fungi and bacteria, which explains its traditional use to treat wounds, skin ulcerations, diarrhea, flu and chest colds by the Brazilian Karajá Indian tribe and natives from the Shipibo-Conibo tribe (Peru) (Carvalho et al., 1998; Oberlies et al., 2002; Mosaddick et al., 2004; Da Silva et al., 2008b). Moreover, the antioxidant potential of distinct *Casearia* species was also shown by radical scavenging *in vitro* and *in vivo* assays. Among all bioactive compounds found in the ethanolic extract, the therapeutic effects of essential oils have been attributed to the bicyclogermacrene, a sesquiterpene with anti-inflammatory activity (Menezes et al., 2004; Mosaddick et al., 2004; Araújo et al., 2015). Methanolic extracts obtained from *C. sylvestris* leaves reduced serum lipids and oxidative stress when orally administered in Swiss mice, prevented arterial thickening induced by high fat diet and diminished *in vitro* platelet aggregation (Brant et al., 2014).

Pharmacological properties of *C. sylvestris* are mainly attributed to the clerodane diterpenes, secondary metabolites derived from isoprene units especially found in the leaves (Itokawa et al., 1990; Santos et al., 2010; Ferreira et al., 2011a, 2014). Based on these extensive ethnopharmacological uses, this article analyzed the *in vivo* and *ex vivo* antitumor action of an ethanolic fraction with casearins (FC) and its main component - Casearin X-isolated from *C. sylvestris* leaves in murine and human tumor models.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, isolation of the compound and structure identification

Leaves of *C. sylvestris* were collected at Parque Estadual Carlos Botelho (São Miguel Arcanjo, São Paulo State) by researchers of the Chemistry Institute of the São Paulo State University. Voucher specimens (AGS04, AGS05, AGS06, AGS13 and AGS19) were deposited at the Herbarium Maria Eneida P. Kaufmann of the Botanical Institute of São Paulo, Brazil. The ethanolic extract from the leaves and its fraction were obtained as described in Santos et al. (2010). Briefly, the extract was fractionated through a solid phase extraction using activated charcoal/silica gel 60–200 μm (1:1, m/m) as stationary phase and hexane/ethyl acetate (95:5, v/v), ethyl acetate and methanol as the mobile phase, providing three fractions, respectively. The second fraction obtained is named fraction with casearins (FC).

Clerodane diterpenes were identified at Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE, Institute of Chemistry, UNESP (Araraquara, São Paulo, Brazil) using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) as described in Claudino et al. (2013) and nuclear magnetic resonance considering literature data (Itokawa et al., 1990; Santos et al., 2010). These analysis displayed that FC presents 56.5% (mg/g) of the fraction, with Caseargrewiin F (Cas F) and Casearin X (Cas X, Fig. 1) being the majority molecules (9.9% and 14.2%, respectively) (Ferreira et al., 2014).

Fetal calf serum was purchased from Cultilab® (Campinas, SP), RPMI 1640 medium, trypsin-EDTA, penicillin and streptomycin were purchased from GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5-fluorouracil (5FU), propidium iodide (PI), ethidium bromide and

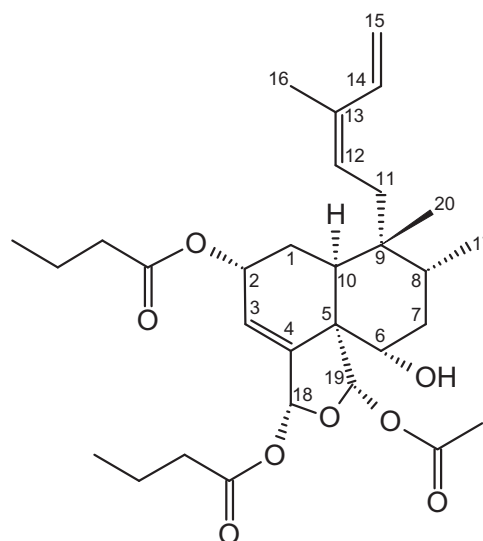


Fig. 1. Structure of Casearin X isolated from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae).

rhodamine 123 was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and triton X-100 was purchased from Vetec Química (Rio de Janeiro, Brazil).

2.2. Animals

Adult female Swiss mice (*Mus musculus*) were obtained from Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. They were kept in well-ventilated cages (Alesco®) under standard conditions of light (12:12 h light/dark cycle) and temperature (22 ± 1 °C) and were housed with free access to commercial rodent stock diet (Nutrilabor, Campinas, Brazil) and water. BALB/c nude (*nu/nu*) female mice were obtained from State University of São Paulo (USP), Faculty of Medicine, São Paulo, Brazil. They were kept in well-ventilated sterile cages (Tecniplast®, Germain) according to all international standards for production and maintaining of germ free animals. Similarly, they were housed under day and night cycles and with access to commercial sterile rodent stock diet and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Committee on Animal Research at UFC (#102/2007) and they are in accordance with Brazilian (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) and international guidelines on the care and use of experimental animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council).

2.3. *In vivo* antitumor assays

2.3.1. Murine model - Sarcoma 180 tumor

Sarcoma 180 cells were maintained in the peritoneal cavity of mice. Ten-day-old sarcoma 180 (S180) ascite tumor cells were removed from the peritoneal cavity, counted and subcutaneously implanted into the right hind axillary of healthy Swiss animals (4 × 10⁶ cells/mL). On the next day, they were randomly divided into six groups (n=10 each) and the substances (FC and Cas X) dissolved in 4% DMSO were intraperitoneally administered by injection or orally by gavage for 7 days at the doses of 10, 25 or 50 mg/kg/day. Negative and positive controls received 4% DMSO (i. p. and oral) and 5FU (25 mg/kg/day, i. p.). On the 8th day, only FC-treated animals were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg)-xylazine (4.5 mg/kg) for blood collection from each animal via retroorbital plexus (Waynforth, 1980) using sterile tubes and heparinized pipettes to determine the profile of circulating peripheral leukocytes and analyzed at 400x magnification in May-Grünwald-

Giemsa-stained blood smears (two per animal) to obtain differential amount of white blood cells (WBC). The absolute count of a leukocyte subtype was calculated as the product of its respective differential percentage and total leukocyte count (Biermann et al., 1999).

Afterwards, all mice were sacrificed by cervical dislocation and tumors, livers, spleens, kidneys and stomachs were dissected out, weighed and fixed in 10% formaldehyde for examination of size, color changes and hemorrhages. The inhibition ratio of tumor growth (%) was calculated as follows: inhibition ratio (%) = $[(A - B) / A] \times 100$, where A is the average tumor weight in the negative control, and B is the average for each treated group.

Tumors (from both FC and Cas X-treated groups) and livers, spleens, kidneys and stomachs (from Cas X-treated groups) were, subsequently, cut into small pieces to prepare histological Section (4–7 μm) and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological analysis was performed under light microscopy.

2.3.2. Human model - Hollow Fiber Assay (HFA)

In this study, cultures of HCT-116 (colon carcinoma) and SF-295 (glioblastoma) were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, at 37 °C with 5% CO_2 .

The *in vivo* HFA was carried out according to Hollingshead et al. (1995). Polyvinylidene fluoride (PVDF) HF with a 1-mm internal diameter and a molecular weight cutoff point of 500 kDa were used (Spectrum Laboratories). The fibers were cut into pieces 12–15 cm long, washed 2x with sterile distilled water and kept in sterile conditions. Before use, under sterile conditions, the fibers were incubated in complete RPMI with 20% fetal bovine serum (FBS) overnight (packaging time). Viability of HCT-116 and SF-295 cells was assessed by trypan blue exclusion assay. A cell suspension of 1×10^7 cell/mL (equivalent to 200,000 cells/20 μL /2 cm of fiber) at 4 °C was injected into the fiber, with the ends thereof immediately heat-sealed. The fibers were cut into 2 cm each, transferred to petri plates and incubated in complete RPMI medium during 24 h prior to implantation in mice. Each line was injected into a fiber of different colors (HCT-116, yellow fibers; SF-295, blue fibers).

Afterwards, mice were anaesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (4.5 mg/kg). A small incision was performed in the neck to permit subcutaneous (s.c.) implantation of two fibers in the dorsal region. All cuts were closed with surgical stapler. The treatments started in the following day and lasted four consecutive days. For this, mice were divided into six groups ($n=7$ /group) as follows: negative control (4% DMSO i.p. and oral), positive control (5-FU, 20 mg/kg/day), FC i.p. (2.5 and 5 mg/kg/day) and FC oral by gavage (25 and 50 mg/kg/day). On 5th day, fibers were removed to measure the antiproliferative capacity.

Tumor cell proliferation was quantified using the MTT assay (Mosmann, 1983). For this purpose, fibers removed from animals and incubated with 1 mg/mL MTT in 6-well plates during 4 h at 37 °C and 5% CO_2 . The MTT solution was aspirated, fibers were washed with saline solution containing protamine 2.5% sulphate and incubated in protamine solution overnight at 4 °C. Fibers were cut into 2 or 3 smaller pieces, transferred to 24 well plates, and put to dry. The formazan was dissolved in DMSO, aliquots (150 μL) were transferred to 96 well plates and quantification of cell proliferation was spectrophotometrically determined using a multi-plate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter). The antitumoral effect of the substances was quantified as the percentage of the control absorbance.

2.4. Analysis by flow cytometry in Sarcoma 180 cells

Once cytotoxicity of the FC and its compounds on S180 and other murine and cancer human cells was previously shown

(Santos et al., 2010; Ferreira et al., 2011, 2014), we decided to perform biochemical assessments in a primary culture of S180 cells by flow cytometry. Ascite-bearing mice between 7 and 9 days postinoculation were sacrificed by cervical dislocation and a suspension of S180 cells was harvested from the intraperitoneal cavity under aseptic conditions. The suspension was centrifuged at $500 \times g$ for 5 min to obtain a cell pellet and washed three times with RPMI medium. Cell concentration was adjusted to 0.5×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with bovine fetal serum and phytohemagglutinin (2%), plated in a 24-well plate and incubated with increasing concentrations of the FC (0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h (Ferreira et al., 2011b). Doxorubicin was used as positive control (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Subsequently, examinations were performed in a Guava EasyCyte Mine™ cytometry (Guava Express Plus CytoSoft 4.1 software, Guava Technologies Inc. Industrial Blvd. Hayward, CA, USA). Five thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted.

2.4.1. Membrane integrity

Cell membrane integrity was evaluated by the exclusion of PI after 24 h exposure. Briefly, 100 μL of treated and untreated cells were incubated with PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 min at 37 °C and membrane integrity was determined (Darzynkiewicz et al., 1992).

2.4.2. DNA fragmentation

Briefly, 24 h-treated and untreated cells were incubated at 37 °C for 30 min in the dark in a lysis solution containing 0.1% citrate, 0.1% triton X-100 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI and fluorescence was subsequently measured (Ferreira et al., 2014).

2.4.3. Mitochondrial transmembrane potential

It was determined by rhodamine 123, a cell-permeable, cationic, fluorescent dye readily sequestered by mitochondria without inducing cytotoxic effects. After 24 h of treatment, cells were washed with PBS and incubated with rhodamine 123 at 37 °C for 15 min in the dark. Cells were incubated again in PBS at 37 °C for additional 30 min in the dark, and fluorescence was measured (Cury-Boaventura et al., 2003).

2.5. DNA relaxation assay

The inhibitory effects of FC on human DNA topoisomerases (I and II) were examined using Topo I and Topo II Drug Screening Kits (TopoGEN, Inc.). Supercoiled plasmid DNA (250 ng) was incubated with human Topo I or II (4 UI) at 37 °C for 30 min in relaxation buffer (10 mM Tris buffer pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1% BSA, 0.1 mM spermidine and 5% glycerol) in the presence or absence of FC (0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Camptothecin (1 μM) and etoposide (100 μM) were used as positive controls. The reaction was terminated by the addition of 10% SDS (2 μL) and proteinase K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37 °C for 30 min. The DNA samples were added to the loading dyes (2 μL) and subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel for 90 min at room temperature and stained with ethidium bromide.

2.6. Statistical analysis

In order to determine differences between groups, data (mean \pm S.E.M.) were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keuls test ($p < 0.05$) using GraphPad Prism® software.

3. Results

3.1. In vivo activity on Sarcoma 180 tumor

After the administration of the FC or Cas X [intraperitoneally (10 and 25 mg/kg/day) or orally by gavage (25 and 50 mg/kg/day)] for 7 consecutive days, mice were sacrificed on the 8th day by cervical dislocation and dissected out to remove tumor, liver, spleen, kidneys and stomach. Both substances – FC 10 and 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral and Cas X 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral – reduced tumor growth (1.3 ± 0.2 , 0.3 ± 0.1 , 1.1 ± 0.3 , 0.2 ± 0.7 and 0.7 ± 0.1 g, respectively) in a significant way ($p < 0.05$) when compared to the negative control receiving DMSO 4% (FC: 1.9 ± 0.2 and 2.4 ± 0.3 g; Cas X: 2.3 ± 0.2 and 2.2 ± 0.3 g, for i.p. and oral administration, respectively) (Table 1). Then, FC 10 and 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral and Cas X 25 mg/kg/day i.p. and 50 mg/kg/day oral revealed tumor growth inhibition rates of 35.8 ± 8.9 , 86.2 ± 7.2 , 53.7 ± 10.9 , 90.0 ± 2.9 and $65.5 \pm 6.6\%$. Similarly, the positive control 5-FU also showed tumor reduction ranging from 52.7 ± 5.7 to $83.9 \pm 2.3\%$ ($p < 0.05$).

3.1.1. Macroscopic and microscopy examinations

There was a reduction in the weight of animals treated with FC (24.6 ± 0.8 g) and Cas X (22.5 ± 0.8 g) at 25 mg/kg/day i.p. (Table 1). Alterations in wet relative weight of organs were also seen in intraperitoneally FC- and Cas X-treated animals. There was a decreasing of the livers (4.52 ± 0.20 g) and spleens (0.26 ± 0.06 g) of animals treated with FC 25 mg/kg/day and similar findings were seen with spleens (0.44 ± 0.03 g) of Cas-X treated mice in comparison with their respective negative controls (0.51 ± 0.03 and 0.65 ± 0.05 g) ($p < 0.05$). 5-FU also strongly reduced spleen relative weights in both experimental protocols (0.22 ± 0.01 and 0.38 ± 0.03 g). On the other hand, oral doses of 50 mg/kg/day in

both FC- and Cas X-treated groups caused increasing of stomachs (1.02 ± 0.11 and 0.93 ± 0.06 g) and FC 50 mg/kg/day also induced spleen decreasing (0.38 ± 0.04 g) ($p < 0.05$). No deaths were noticed during treatment of Swiss mice with FC or Cas X, though FC- and Cas X-treated animals at 25 mg/kg/day i.p. showed diarrhea from the second dose.

Tumors from negative control groups [i.p. and oral 4% DMSO (Fig. 2A and B, respectively)] and groups treated with FC and Cas X 10 mg/kg/day i.p. and FC and Cas X 25 mg/kg/day oral (Fig. 2D and F) showed characteristics of malignancy, consisting in round and polyhedral cells with anisokaryosis, binucleation, common mitoses, different degrees of cellular and nuclear pleomorphism, and large areas of muscle invasion and points of coagulation necrosis. Analysis of the groups that received 5-FU (Fig. 2C), FC and Cas X 25 mg/kg/day i.p. (Fig. 2E) and 50 mg/kg/day oral (Fig. 2G) showed, as described above, typical morphology of neoplastic cells, but they demonstrated rare mitoses and coagulation necrosis areas were more found.

Organs of the animals from the negative control group did not show signs of severe liver toxicity, though some points of hydropic degeneration (Fig. 3A) and kidneys with light glomerular and tubular hemorrhage have been found (Fig. 4A). Spleens with visible follicles and many megakaryocytes were also observed. The stomachs showed no hemorrhage streaks, the cardia region had keratinized squamous covering without changes in the corium and parietal and zymogen cells and normal mucosa and submucosa were visualized. On the other hand, investigations showed that only Cas X 25 mg/kg/day i.p. was able to induce significant histopathological changes in livers, since toxicity was diagnosed by some points of inflammatory focus, portal and centrilobular vein congestion and evident strands of hepatocytes (Fig. 3D). Moreover, a more visible hydropic degeneration was found in Cas X-treated animals with 50 mg/kg/day oral (Fig. 3F).

Table 1

Effect of a Fraction with Casearins (FC) and of Casearin X (Cas X) extracted from *Casearia sylvestris* leaves on relative weight of key organs and on tumor growth in Swiss mice bearing Sarcoma 180 after 7 days of intraperitoneal or oral treatment.

Substance	Dose (mg/kg/day)	Mice weight (g)	g/100g				Tumor (g)	Tumor inhibition (%)	
			Liver	Kidney	Spleen	Stomach			
Intraperitoneal	Control	–	38.0 ± 1.2	5.31 ± 0.13	1.40 ± 0.04	0.51 ± 0.03	0.67 ± 0.07	1.9 ± 0.2	–
	5-FU	25	21.5 ± 1.0*	4.86 ± 0.27	1.28 ± 0.03	0.22 ± 0.01*	0.60 ± 0.04	0.3 ± 0.1*	83.9 ± 2.3*
	FC	10	36.3 ± 0.8	4.98 ± 0.15	1.37 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.59 ± 0.09	1.3 ± 0.2*	35.8 ± 8.9*
		25	24.6 ± 0.8*	4.52 ± 0.20*	1.43 ± 0.08	0.26 ± 0.06*	0.61 ± 0.05	0.3 ± 0.1*	86.2 ± 7.2*
Oral	Control	–	36.2 ± 1.2	5.28 ± 0.18	1.35 ± 0.07	0.53 ± 0.02	0.69 ± 0.04	2.4 ± 0.3	–
	FC	25	35.0 ± 1.1	5.22 ± 0.16	1.34 ± 0.05	0.45 ± 0.03	0.83 ± 0.04	1.8 ± 0.3	24.9 ± 10.6
		50	31.3 ± 1.5	4.88 ± 0.22	1.44 ± 0.05	0.42 ± 0.03	1.02 ± 0.11*	1.1 ± 0.3*	53.7 ± 10.9*
	Intraperitoneal	Control	–	30.0 ± 0.8	5.62 ± 0.16	1.47 ± 0.07	0.65 ± 0.05	0.59 ± 0.09	2.3 ± 0.2
5-FU		25	22.2 ± 1.0*	5.06 ± 0.15	1.51 ± 0.05	0.38 ± 0.03*	0.50 ± 0.08	1.0 ± 0.1*	52.7 ± 5.7*
Cas X		10	30.9 ± 1.0	5.58 ± 0.27	1.58 ± 0.04	0.71 ± 0.03	0.63 ± 0.05	2.7 ± 0.3	-15.2 ± 13.7
		25	22.5 ± 0.8*	4.87 ± 0.31	1.61 ± 0.08	0.44 ± 0.03*	0.62 ± 0.06	0.2 ± 0.7*	90.0 ± 2.9*
Oral	Control	–	28.0 ± 0.7	4.86 ± 0.07	1.04 ± 0.02	0.55 ± 0.04	0.66 ± 0.02	2.2 ± 0.3	–
	Cas X	25	29.5 ± 1.2	4.97 ± 0.18	1.18 ± 0.03	0.57 ± 0.05	0.64 ± 0.02	2.1 ± 0.3	0.5 ± 12.1
		50	27.4 ± 1.5	4.53 ± 0.17	1.20 ± 0.08	0.38 ± 0.04*	0.93 ± 0.06*	0.7 ± 0.1	65.5 ± 6.6*

Values are means ± S.E.M., n=10 animals/group. Negative control was treated with the vehicle used to dilute the drug (4% DMSO). 5-Fluorouracil (5-FU) was used as positive control.

* $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

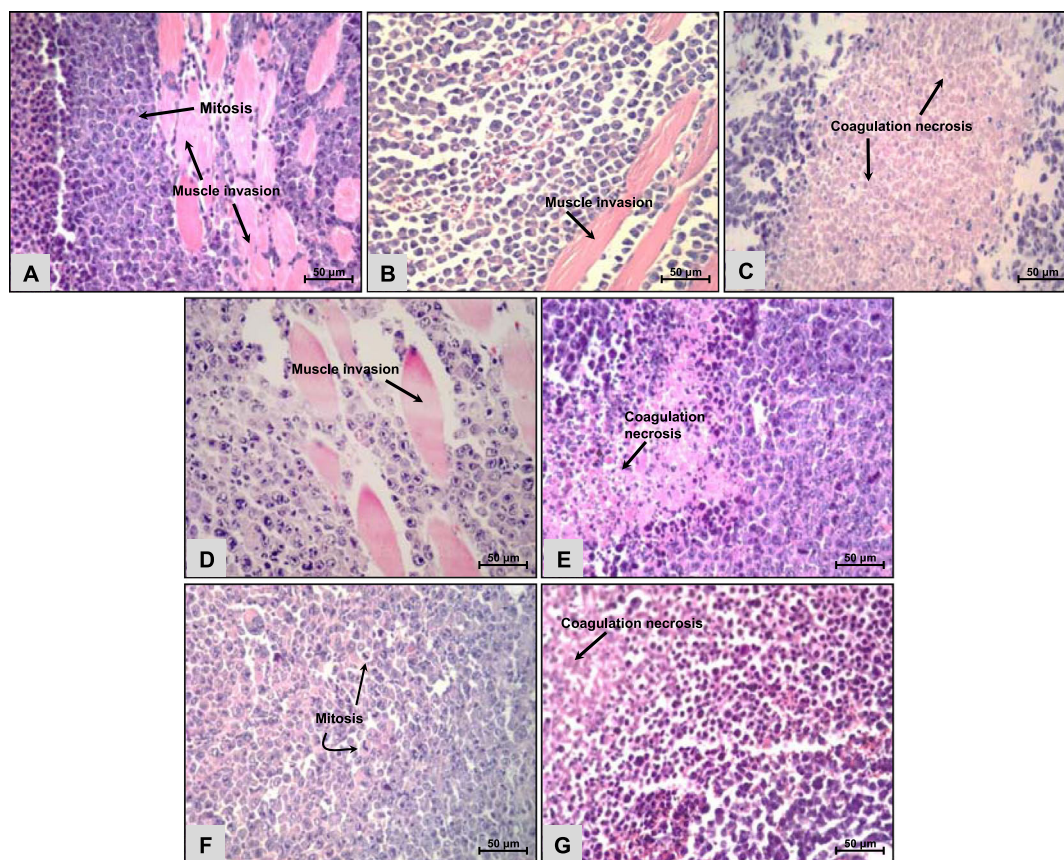


Fig. 2. Morphology of Sarcoma 180 tumor cells from Swiss mice after 7 days of treatment with a Fraction with Casearins and Casearin X extracted from *Casearia sylvestris*. Animals were treated by injection (10 and 25 mg/kg/dia: D and E) or gavage (25 and 50 mg/kg/dia: F and G, respectively). Negative control was treated with the vehicle used to dilute the substance (4% DMSO i.p. and oral; A and B). 5-Fluorouracil was used as i. p. positive control (C). Hematoxylin-eosin staining. Light microscopy magnification, 400x. Scale bar = 50 µm.

Kidneys of treated mice at 25 mg/kg/day i.p. showed macroscopically whitish appearance when compared with the negative control, and microscopically, there was glomerular and tubular hemorrhage with intense swelling of tubular epithelium and presence of hyaline cylinders (Fig. 4D). Hemorrhage focus and hyaline cylinders were also seen in all other groups (Fig. 4). Spleens of FC and Cas X groups at 25 mg/kg/day i.p. and FC 50 mg/kg/day oral showed decrease in size of follicles. Stomachs were similar to the negative control animals and morphological changes in both FC- and Cas X-orally treated groups were not detected in spite of the augment in their relative weights.

3.1.2. Profile of the peripheral blood white cells

Swiss mice bearing Sarcoma 180 and treated with FC were also analyzed regarding to the white blood cells' counting. It was found a decrease in the total number of leukocytes in the 5-FU group ($2.6 \times 10^3/\mu\text{L}$) due to the reducing of monocytes ($0.1 \pm 0.01 \times 10^3/\mu\text{L}$), neutrophils ($0.1 \pm 0.002 \times 10^3/\mu\text{L}$) and lymphocytes ($2.4 \pm 0.2 \times 10^3/\mu\text{L}$). On the other hand, there was an increasing of neutrophils ($5.0 \pm 0.3 \times 10^3/\mu\text{L}$) and reduction of lymphocytes ($2.0 \pm 0.1 \times 10^3/\mu\text{L}$) in animals intraperitoneally treated with FC 25 mg/kg/day i.p. (Table 2, $p < 0.05$), though no changes was noticed in relation to total number of white blood cells when compared to the control negative ($8.8 \pm 0.6 \times 10^3/\mu\text{L}$) presumably due to compensation in the overall score ($p > 0.05$).

3.2. Antiproliferative action on human cancer cells

In order to verify *in vivo* antitumor potential of FC on human cancer cells, HFA studies were performed. Then, after removing

fibers, cell proliferation was spectrophotometrically quantified by MTT assay. As demonstrated in Table 3, FC reduced multiplying of neoplastic cells in all doses tested (2.5 and 5 mg/kg/day i.p. and 25 and 50 mg/kg/day oral), with inhibition rates of cell growth of 33.3%, 36.7%, 44.9% and 56.9% for SF-295 cells and 47.4%, 45.4%, 51.9% and 67.4% for HCT-116 cells, respectively ($p < 0.05$). One death was recorded in both i. p. groups and an additional one in the dose of 50 mg/kg/day oral.

3.3. Biochemical alterations on S180 cells

Outcomes revealed that FC at concentrations of 0.4 and 0.8 µg/mL reduced membrane integrity (63.5 ± 1.5 and $11 \pm 1.8\%$), caused DNA fragmentation (19.1 ± 1.1 and $48.4 \pm 1.8\%$) and induced mitochondrial depolarization (14.0 ± 0.5 and $18.3 \pm 0.3\%$) in primary cultures of S180 cells when compared to the negative control (80.0 ± 0.1 , 6.7 ± 0.6 and $10.3 \pm 0.4\%$), respectively, after 24 h exposure (Fig. 5). Doxorubicin also caused similar changes ($p < 0.05$).

The bioactivity of FC on topoisomerases I and II was evaluated in supercoiled plasmid DNA relaxation experiments. None of the studied concentrations was capable of altering DNA topology (0.01, 0.1, 1 and 10 µg/mL). On the hand, camptothecin and etoposide, used as controls, inhibit the activity of topoisomerase I and II, respectively.

4. Discussion

Cancer is characterized as a collection of almost 200 kinds of complex diseases with proliferative, mutational, aberrant and

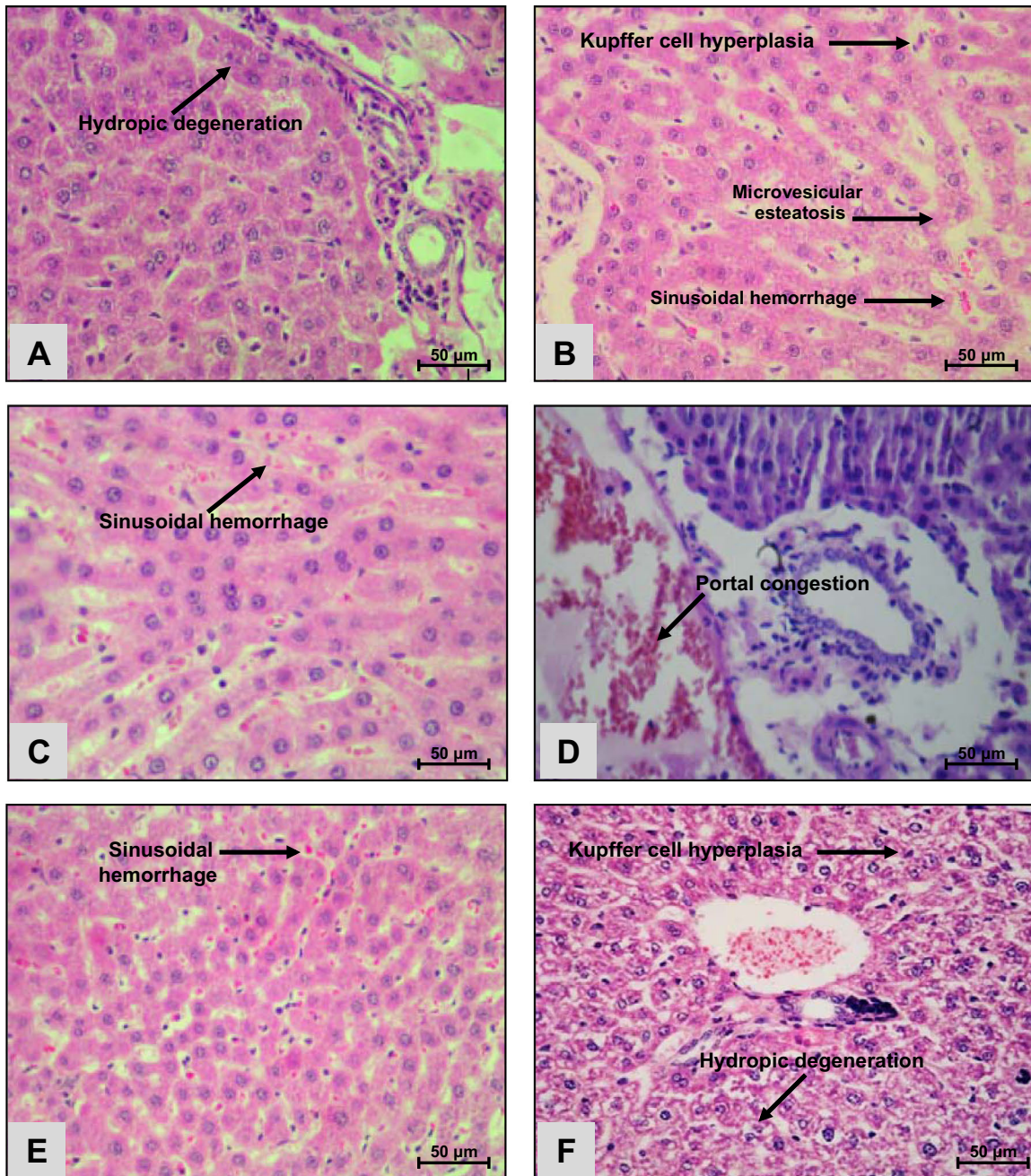


Fig. 3. Histological analyzes in livers of mice treated with Casearin X isolated from *Casearia sylvestris* leaves at doses of 10 (C) and 25 mg/kg/day i.p. (D) and 25 (E) and 50 mg/kg/day oral (F) during 7 days. Negative control (A) received DMSO 4%. 5-Fluorouracil (5-FU) was used as positive control (B). Hematoxylin-eosin staining. Light microscopy magnification, 400x. Scale bar = 50 µm.

uncontrolled cell growth nature, wherein cells present in the same microenvironment, usually spread to adjacent tissues and organs (metastasize) and regions away from the primary tumor. These neoplastic properties are often caused by accumulation of mutations in oncogenes and in suppressor and DNA repair genes (Kumar et al., 2004; Grivicich et al., 2007; Hanahan and Weinberg, 2011). The genetic diversity and genomic instability in tumor cells contribute to the wide phenotypic heterogeneity, complicate treatment and facilitate the manifestation of resistance(s) and relapse(s) that can arise at any stage of the cancer development (Hanahan and Weinberg, 2011; McCubrey et al., 2015). In this scenario, natural compounds arise as alternative to overcome tumor resistance of aggressive forms of solid tumors, since about 60% of the drugs currently used in cancer chemotherapy has

natural origin, including natural products or substances derived from natural prototypes, such paclitaxel, docetaxel, vinblastine, vincristine, vindesine, irinotecan and camptothecin. Then, instead of the development of chemical synthesis techniques, plant compounds remain essential to the discovery of new anticancer agents (Cragg and Newman, 2005; Srivastava et al., 2005; Bezerra et al., 2015; Monção et al., 2015; Simões et al., 2015).

In relation to the *Casearia sylvestris* plant, chemical studies have isolated clerodane diterpenes, whose molecules displayed remarkable *in vitro* and *in vivo* activity on different histological human and murine cancer lines, such as Ehrlich, Lewis ascite lung cancer, S180 cells, leukemias (HL-60, CEM, K-562), colon (HCT, HCT-8, HCT-116), breast (MDA/MB-231, Hs578-T, MX-1, MCF-7), melanoma (MDA/MB-435, A2058, B-16/F10, B16F10-Nex2),

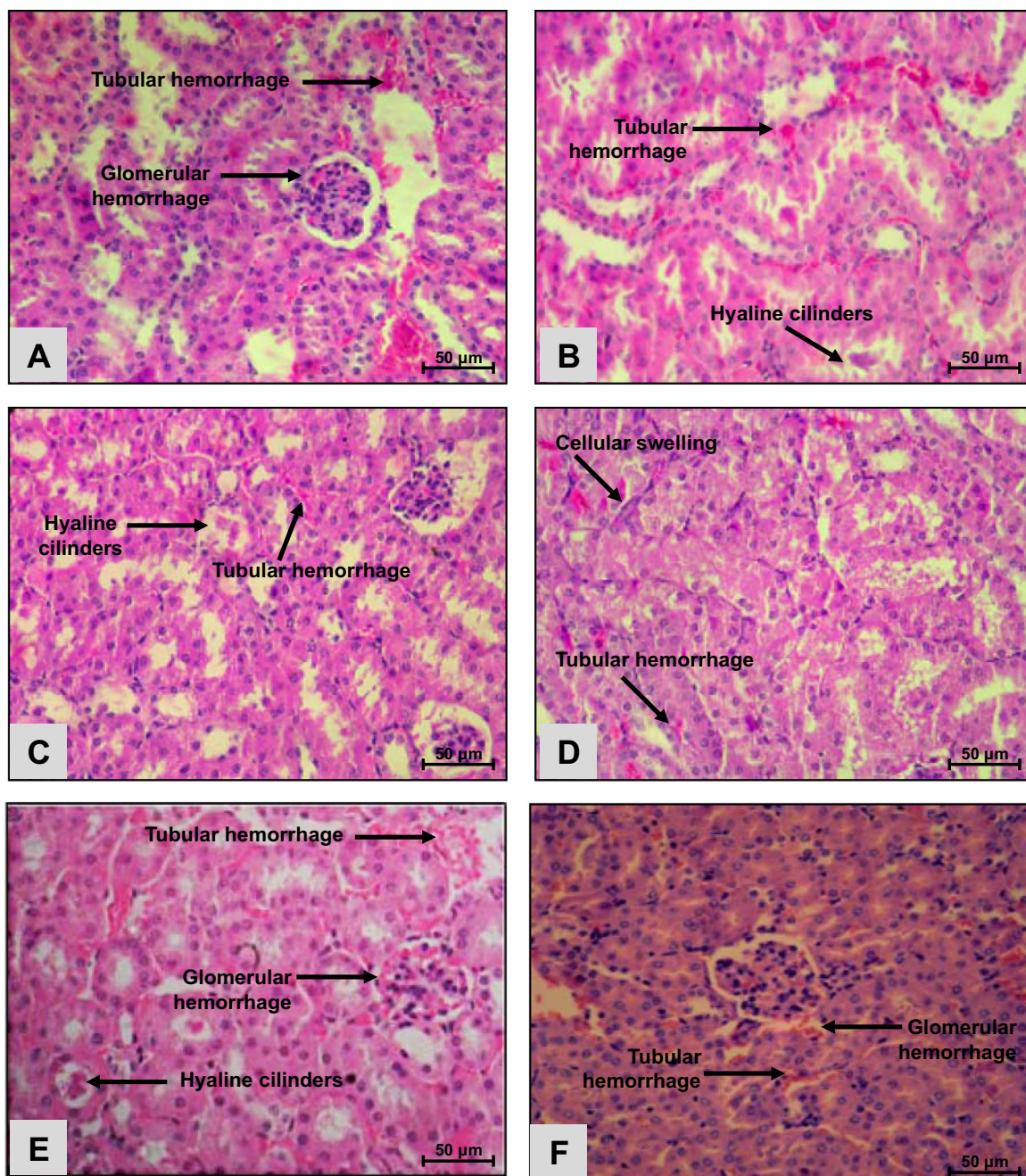


Fig. 4. Histological analyzes in kidneys of mice treated with Casearin X isolated from *Casearia sylvestris* leaves at doses of 10 (C) and 25 mg/kg/day i.p. (D) and 25 (E) and 50 mg/kg/day oral (F) during 7 days. Negative control (A) received DMSO 4%. 5-Fluorouracil (5-FU) was used as positive control (B). Hematoxylin-eosin staining. Light microscopy magnification, 400x. Scale bar = 50 μ m.

prostate (PC-3, DU-145), ovarian (A-2780), lung (LX-1, A-549), cervical carcinoma (HeLa) and glioblastoma (SF-295) (Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Da Silva et al., 2008c, 2009; Wang et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Santos et al., 2010; Felipe et al., 2014; Bou et al., 2015).

Based on the use of experimental tumors for the identification of substances with chemotherapeutic potential, the *in vivo* activity of the FC and Cas X was firstly assessed using Swiss mice transplanted with S180 tumor cells, a murine sarcoma experimental model extensively applied in the search for natural products with antitumor action (Itokawa et al., 1990; Bezerra et al., 2008; Magalhães et al., 2010; Ferreira et al., 2011b; Militão et al., 2012). Regression of tumors in animals, growth reduction of sensitive tumors and/or increase in life expectancy are factors directly

related to the antineoplastic activity (Schabel, 1977; Da Silva et al., 2009). Schabel (1977) showed that better results depend on the treatment procedure, which shall be started within 48 h after tumor transplantation. At this time, tumor cells have already started the formation of tumor nodules. Based on these findings, the treatment was performed within 24 h after S180 inoculation. After 7 days of administration, FC and Cas X was capable of causing, approximately, until 90% of tumor mass reduction. In some animals, tumors were not macroscopically detected.

Since animals treated with FC caused amazing reduction in S180 tumors, *ex vivo* biochemical analysis by cytometry were carried out in attempting to understand this biological action. Previously, we have already demonstrated promising cytotoxic activities of the FC and Cas X on primary culture of S180 cells (IC₅₀

Table 2

Profile of the peripheral blood white cells of Swiss mice bearing Sarcoma 180 after intraperitoneal or oral treatment during 7 days with the Fraction with Casearin (FC) extracted from *Casearia sylvestris* leaves.

Substance	Dose (mg/kg/dia)	Total leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	Leukocyte differential counting ($10^3/\mu\text{L}$)				
			Eosinophils	Lymphocytes	Neutrophils	Monocytes	
Intraperitoneal	Control	–	8.8 ± 0.6	0.1 ± 0.01	4.7 ± 0.7	3.7 ± 0.5	0.28 ± 0.1
	5-FU	25	$2.6 \pm 0.1^*$	0.0 ± 0.0	$2.4 \pm 0.2^*$	$0.1 \pm 0.002^*$	$0.1 \pm 0.01^*$
	FC	10	7.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.9 ± 0.1	3.0 ± 0.6	0.3 ± 0.1
		25	7.3 ± 0.7	0.1 ± 0.1	$2.0 \pm 0.1^*$	$5.0 \pm 0.3^*$	0.3 ± 0.1
Oral	Control	–	6.5 ± 0.9	0.1 ± 0.1	3.7 ± 0.9	2.5 ± 0.4	0.2 ± 0.1
	FC	25	8.4 ± 0.8	0.2 ± 0.1	4.1 ± 0.4	3.7 ± 0.5	0.4 ± 0.1
		50	6.9 ± 0.6	0.2 ± 0.1	3.4 ± 1.1	2.8 ± 0.6	0.4 ± 0.1

Values are means \pm S. E. M., $n=10$ animals/group. Negative control was treated with the vehicle used to dilute the drug (4% DMSO). 5-Fluorouracil (5-FU) was used as positive control.

* $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 3

Antitumor action of a Fraction with Casearins (FC) extracted from *Casearia sylvestris* leaves on human glioblastoma (SF-295) and colon carcinoma (HCT-116) cells determined by the *in vivo* Hollow Fiber Assay (HFA).

Substance	Dose (mg/kg/day)	Administration	Survival	Proliferation (absorbance)		Inhibition rate (%)	
				SF-295	HCT-116	SF-295	HCT-8
Negative control	–	i. p.	6/6	0.84 ± 0.10	1.02 ± 0.17	–	–
FC	2.5	i. p.	5/6	0.28 ± 0.08	0.48 ± 0.12	33.3	47.4
	5	i. p.	5/6	0.30 ± 0.10	0.50 ± 0.09	36.7	45.4
Negative control	–	oral	6/6	1.12 ± 0.14	1.01 ± 0.15	–	–
5-FU	25	i. p.	6/6	$0.52 \pm 0.08^*$	$0.59 \pm 0.10^*$	65.4	62.1
FC	25	oral	6/6	$0.62 \pm 0.17^*$	$0.49 \pm 0.11^*$	44.9	51.9
	50	oral	5/6	$0.48 \pm 0.10^*$	$0.30 \pm 0.06^*$	56.9	67.4

Values are means \pm S. E. M. Negative control was treated with the vehicle used to dilute the drug (4% DMSO). 5-Fluorouracil (5-FU) was used as positive control.

* $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

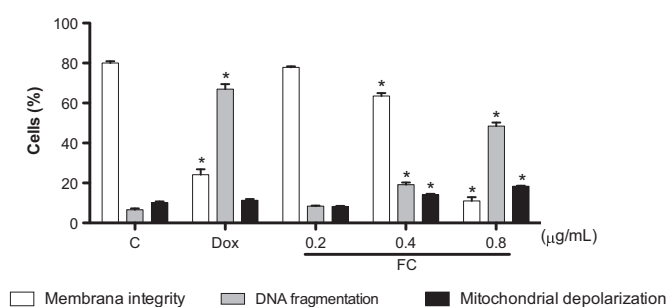


Fig. 5. Effects of the Fraction with Casearins (FC) on *ex vivo* primary cultures of Sarcoma 180 cells after 24 h exposure and analysis by flow cytometry. Cell membrane integrity was evaluated by the exclusion of propidium iodide. DNA fragmentation evaluation was performed by nuclear fluorescence using propidium iodide, triton X-100 and citrate. Mitochondrial transmembrane potential was determined by rhodamine 123 retention. Negative control (C) was treated with the vehicle used for diluting the tested substance. Doxorubicin (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control (Dox). Results are expressed as mean \pm standard error of measurement (S.E.M.) from two independent experiments. * $p < 0.05$ compared to control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

values of 0.60 and 1.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) (Ferreira et al., 2014). Herein, this cytotoxicity was confirmed by flow cytometry, with reduction of membrane integrity and induction of DNA fragmentation and mitochondrial depolarization. Indeed, prior reports have indicated apoptosis as the main way by which clerodane diterpenes activate cell death and that Cas X causes DNA fragmentation as early as 6 h exposure (Huang et al., 2004; Ferreira

et al., 2010, 2014), explaining, partially, the significant values of necrosis after 24 h of treatment, which may represent a secondary necrosis or late apoptosis.

Despite the antitumor oral activity of FC and Cas X, an i.p. action was notoriously superior with both substances on S180 bearing mice. Pharmacokinetic parameters may alter *in vivo* anticancer action when a substance is orally administered, since absorption is governed by several factors such as absorptive surface area, transit time, blood flow and gastric and intestinal pH (absorption barriers), and by the hepatic metabolism, through which all exogenous substances usually undergo biotransformation (first-pass metabolism) (Undevia et al., 2005). It is possible that gastric acid causes acid hydrolysis and, subsequently, opening of the diacetal ring of the clerodane diterpenes and structural changes. In fact, acid hydrolysis and other reactions that open this ring leads to molecular instability and loss of antiproliferative effects, as seen with Cas X dialdehyde and (-)-hardwickiic acid (Ferreira et al., 2010; Santos et al., 2010). So, such findings can explain, at least in part, the reduction or loss of the FC and Cas X antitumor activity when orally administered in S180 bearing mice.

Previously, we have shown that both FC and Cas X are *in vitro* cytotoxic substances on glioblastoma and colon cancer cells (Ferreira et al., 2014). Herein, this cytotoxicity against SF-295 and HCT-116 cells was also seen using the *in vivo* HFA. This technique is a new preclinical tool more suitable from a methodological and financial point of view when compared with xenograft assay. Moreover, it can predict the possibility of chemotherapy success in coming studies with tumor xenografts testing simultaneously two

different body compartments and six tumor lines (Hollingshead et al., 1995; Decker et al., 2004; Amaral et al., 2014; Bezerra et al., 2015). Some studies have shown a direct correlation between activity in HFA and xenograft models, increasing the likelihood of activity in clinical trials, at least for cytotoxic drugs (Johnson et al., 2001). In this method, lower intraperitoneal doses (2.5 and 5 mg/kg/day) were chosen because our previously studies with higher ones (10 and 25 mg/kg/day) were toxic for BALB/c nude animals, since some animals died during treatment with FC, mainly at 25 mg/kg/day. Lower doses for i.p. treated groups in HFA can explain because such ones were less active in comparison with oral treatment, but these findings showed just a seeming (but not a comparative) antitumor activity since different doses were administered.

Prior investigations with ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves at a dose of 100 mg/kg/day i.p. showed a potent antitumor activity in mice transplanted with S180 cells and tumor growth inhibition ranging from 87% to 98% (Itokawa et al., 1990). Bioguided studies of Itokawa et al. (1990) resulted in the purification of six new clerodane diterpenes (Casearin A, B, C, D, E and F) and showed casearin C as the most active molecule. Herein, such bioactivity was similar in this study, since both substances (FC and Cas X) intraperitoneally administered also presented inhibiting rates of tumor growth ranging from 86.2 to 90.0%. Almeida (2000) also demonstrated that the alcoholic extract of *C. sylvestris* leaves inhibited Ehrlich tumor growth and presented anti-inflammatory activity at a dose of 300 mg/kg/day. Similarly, two gallic acid-derived compounds isolated from *C. sylvestris* leaves – isobutyl gallate-3,5-dimethyl ether (IGDE) and methyl gallate-3,5-dimethyl ether (MGDE) – showed significant chemotherapeutic potential against Ehrlich and Lewis lung cancer ascite tumor cells and increased animals' survival (approximately 90%), though IGDE possesses a slightly superior activity when compared to MGDE (Da Silva et al., 2009). More recently, Felipe et al. (2014) showed that treatment with crude aqueous ethanolic extract (CAE) and chloroform fraction ((f-CHCl₃)) of *C. sylvestris* leaves caused tumor growth decreasing in Ehrlich ascites-bearing mice (40% and 60%, respectively), whose *in vivo* anti-proliferative effects were confirmed by ³H-thymidine uptake and trypan blue exclusion methods.

Toxicity analyzes of key organs indicated liver and kidneys as main targets for FC and Cas X, especially in groups i.p. treated. Similar results were described by Araújo et al. (2015) about hepatic changes, since vascular congestion and hydropic degeneration were apparent in FC groups (2.5, 5 and 25 mg/kg/day) and slight perivascular infiltration associated with necrosis was detected with FC 2.5 mg/kg/day. Kidney and liver are proposed as major target organs for environmental contaminants, drugs and xenobiotics, since these substances usually have a low solubility in aqueous systems and require biotransformation in hepatocytes to metabolites that are more hydrophilic and more readily eliminated in the urine. Biotransformation reactions generally follow a detoxification process rendering metabolites inactive. Nevertheless, many drug intermediary products generated during metabolism are highly reactive and toxic, causing hepatotoxicity and nephrotoxicity (Williams et al., 2002; Ramaiah, 2007). However, liver and kidneys also possess a pronounced regenerative capacity and compensatory action: even when necrosis is found with conjunctive tissue preservation, there is often complete tissue restoration (Kumar et al., 2004). In this context, all observed morphological alterations in treated animals could be considered potentially reversible. Moreover, *in vivo* blood changes in neutrophils and lymphocytes were slighter in comparison with 5-FU-treated animals, which demonstrated decreasing in monocytes, neutrophils and lymphocytes. Unfortunately, anticancer drugs in clinical use usually cause hematologic and immunologic suppression, as observed with docetaxel (Ringel and Horwitz, 1991), methotrexate (Katzung et al., 2003) and 5-FU (Bezerra et al., 2008). Most of them

are available for intravenous administration only, and this kind of treatment is very expensive due to hospitalization costs. Therefore, the development of new and effective oral cytotoxic agents has great social and economic interest (Ismael et al., 2008), but a substance with oral antitumoral capacity, as FC or Cas X, is uncommon primarily because the first pass effects (Undevia et al., 2005).

Despite toxicity findings, ethnopharmacological uses have encouraged the consumption of different parts of *C. sylvestris* because folk data and toxicological studies did not indicate unsafe clinical evidences for humans (Silva et al., 1988; Basile et al., 1990; Ferreira et al., 2011a; Araújo et al., 2014). However, Araújo et al. (2015) verified that FC-treated animals exhibited some alterations indicative of neurotoxicity and recommend precaution regarding the consumption of medicinal formulations based on *C. sylvestris*.

5. Conclusions

A fraction with casearins extracted from *C. sylvestris* leaves and Casearin X were efficient *in vivo* antitumor substances against murine cells and human glioblastoma and colon carcinoma neoplasms by intraperitoneal as well as oral routes, caused reversible morphological changes in the liver, kidneys and spleens. Additionally, *ex vivo* studies indicated apoptosis as the main way by which cell death is triggered. Taken together, these findings corroborate folk uses of *C. sylvestris* against different types of cancers and emphasize the reputation of clerodane diterpenes as an emerging class of anticancer molecules.

Acknowledgements

We wish to thank the Federal Brazilian agency “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) for financial support in the form of grants (#473167/2012-3) and fellowship (#301976/2013-9) and Silvana França dos Santos for technical assistance.

References

- Aboin, E., Arquer, P., Balboa, V., 1987. Prostaglandina PGE, análogo sintético misto no manuseio de lesões de mucosa gástrica induzidas por etanol. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61, 277–283.
- Almeida, A., 2000. Inflammatory and Antitumor Activities of the Hydroalcoholic Extract of *Casearia Sylvestris*: A Comparative Study With Piroxicam and Meloxicam. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil.
- Amaral, D.N., Cavalcanti, B.C., Bezerra, D.P., Ferreira, P.M.P., Castro, R.P., Sabino, J.R., Machado, C.M.L., Chammas, R., Pessoa, C., Sant'anna, C.M.R., Barreiro, E.J., Lima, L.M., 2014. Docking, synthesis and antiproliferative activity of *n*-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. *PLoS One* 9, e85380.
- Araújo, E.J.F., Oliveira, G.A.L., Sousa, L.Q., Bolzani, V.D., Cavalheiro, A.J., Tome, A.R., Peron, A.P., Santos, A.G., Citó, A.M.G.L., Pessoa, C., Freitas, R.M., Ferreira, P.M.P., 2015. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 1791–1807.
- Araújo, E.J.F., Lopes, D.Y.M., Freitas, R.M., Ferreira, P.M.P., 2014. Toxicology of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz: a literature review. *Rev. Cienc. Farm. Basic. Apl.* 35, 355–361.
- Basile, A.C., Sertié, J.A.A., Panizza, S., Oshiro, T.T., Azzolini, C.A., 1990. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J. Ethnopharmacol.* 30, 185–197.
- Bezerra, D.P., Castro, F.O., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Elmiro, F.J.M., Alencar, N.M.N., Mesquita, R.O., Lima, M.W., Costa-Lotufo, L.V., 2008. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piperazine and piperine. *J. Appl. Toxicol.* 28, 156–163.
- Bezerra, D.P., Ferreira, P.M.P., Machado, C.L., Aquino, N.C., Silveira, E.R., Chammas, R., Pessoa, C., 2015. Antitumor efficacy of *Piper tuberculatum* and piperazine based on the hollow fiber assay. *Planta Med.* 81, 15–19.
- Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K.W., Sorg, C., Sunderkotter, C., 1999. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J. Leukoc. Biol.* 65, 217–231.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Quintero, A., Lizano, S., Gutiérrez, J.M., Giglio, M.I., Homs-Brandeburgo, M.I., 2000. Effects of aqueous extract of

- Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp. Biochem. Physiol.* 127, 21–30.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Oliveira, F., Franshechi, A.M., Rucavado, A., Giglio, J.R., Homsí-Brandeburgo, M.I., 2001. Neutralization of proteases from bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia Sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicol.* 39, 1863–1869.
- Bou, D.D., Santos, A.L., Figueiredo, C.R., Farias, C.F., Matsuo, A.L., Kitamura, R.O.S., Gimenes, L., Lagoa, J.H.G., Sartorelli, P., 2015. Dinor Casearin X, a new cytotoxic clerodane diterpene from *Casearia sylvestris*. *J. Braz. Chem. Soc.* 26, 1725–1729.
- Brant, N.M.F., Gasparotto, F.M., Araújo, V.A., Maraschin, J.C., Ribeiro, R.C.L., Lourenço, E.L.B., Junior, E.L.C., Junior, A.G., 2014. Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet. *J. Ethnopharmacol.* 154, 419–427.
- Carvalho, P.R.F., Furlan, M., Young, M.C.M., Kingston, D.G.I., Bolzani, V.S., 1998. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry* 49, 1659–1662.
- Cavalcante, W.L.G., Camosa, T.O., Pai-Silva, M.D., Pereira, O.S., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Gallacci, M., 2007. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 112, 490–497.
- Claudino, J.C., Sacramento, L.V.S., Koch, I., Santos, H.A., Cavalheiro, A.J., Tininis, A.G., Santos, A.G., 2013. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. *Acad. Bras. Cienc.* 85, 1253–1265.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 100, 72–79.
- Cury-Boaventura, M.F., Pompéia, C., Curi, R., 2003. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells 2003. *Clin. Nutr.* 23, 721–732.
- Da Silva, S.L., Calgarotto, A.K., Chaar, J.S., Ma-Rangoni, S., 2008a. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Sw. aqueous extract with anti-PLA2 activity. *Toxicol.* 52, 655–666.
- Da Silva, S.L., Chaar, J.S., Damico, D.C.S., Figueiredo, P.M.S., Yano, T., 2008a. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm. Biol.* 46, 347–351.
- Da Silva, S.L., Chaar, J.S., Figueiredo, P.M.S., Yano, T., 2008b. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amaz.* 38, 107–112.
- Da Silva, S.L., Chaar, J.S., Yano, T., 2009. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *Eur. J. Pharmacol.* 608, 76–83.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F., 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795–808.
- Decker, S., Hollingshead, M., Bonomi, C.A., Carter, J.P., Sausville, E.A., 2004. The hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. *Eur. J. Cancer* 40, 821–826.
- Esteves, I., Souza, I.R., Rodrigues, M., Cardoso, L.G., Santos, L.S., Sertie, J.A., Perazzo, F.F., Lima, L.M., Schneedorf, J.M., Bastos, J.K., Carvalho, J.C., 2005. Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.* 101, 191–196.
- Felipe, K.B., Kwiecinski, M.R., Da Silva, F.O., Bücker, N.F., Farias, M.S., Castro, L.S., Souza, G.V.M., Motta, N.S., Correia, J.F., Rossi, M.H., Pedrosa, R.C., 2014. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *J. Ethnopharmacol.* 155, 1492–1499.
- Ferreira, P.M.P., Santos, A.G., Tininis, A.G., Costa, P.M., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Pessoa, C., 2010. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 188, 497–504.
- Ferreira, P.M.P., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Barros, F.W.A., Martins, A.M.A., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Santos, A.G., Pessoa, C., 2011a. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Acad. Bras. Cienc.* 83, 1373–1384.
- Ferreira, P.M.P., Farias, D.F., Viana, M.P., Souza, T.M., Vasconcelos, I.M., Soares, B.M., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Carvalho, A.F.U., 2011b. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 1045–1058.
- Ferreira, P.M.P., Militão, G.C.G., Lima, D.J.B., Costa, N.D.J., Machado, K.C., Santos, A.G., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Pessoa, C., 2014. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. *Chem. Biol. Interact.* 222, 112–125.
- Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B., 2007. Morte celular por apoptose. *Rev. Bras. Cancer.* 53, 335–343.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hollingshead, M.G., Alley, M.C., Camalier, R.F., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Malspeis, L., Grever, M.R., 1995. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sci.* 57, 131–141.
- Huang, D.M., Shen, Y.C., Wu, C., Huang, Y.T., Kung, F.L., Teng, C.M., Guh, J.H., 2004. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 503, 17–24.
- Ismael, G.F.V., Rosa, D.D., Mano, M.S., Awada, A., 2008. Novel cytotoxic drugs: old challenges, new solutions. *Can. Treat. Rev.* 34, 81–91.
- Itokawa, H., Totsuka, N., Morita, H.N., Takeya, K., Itaka, Y., Schenkel, E.P., Montidome, M., 1990. New antitumor principles, Casearins A–F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 38, 3384–3388.
- Johnson, J.L., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., Sausville, E.A., 2001. Relationships between drug activity in NCI preclinical *in vitro* and *in vivo* models and early clinical trials. *Brit. J. Cancer* 84, 1424–1431.
- Katzung, G.B., 2003. *Basic and Clinical Pharmacology*. McGraw-Hill Medical, USA.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins, S.L., Cotran, R.S., 2004. *Pathology Basis of Disease*. WB Saunders, China.
- Magalhães, H.I.F., Ferreira, P.M.P., Moura, E.S., Torres, M.R., Alves, A.P.N.N., Pessoa, O.D.L., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., 2010. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. *Acad. Bras. Cienc.* 82, 407–416.
- McCubrey, J.A., Abrams, S.L., Fitzgerald, T.L., Cocco, L., Martelli, A.M., Montalto, G., Cervello, M., Scalisi, A., Candido, S., Libra, M., Steelman, L.S., 2015. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* 57, 75–101.
- Menezes, P.R., Schwarz, E.A., Santos, C.A.M., 2004. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia* 75, 398–400.
- Militão, G.C.G., Dantas, I.N., Ferreira, P.M.P., Alves, A.P., Chaves, D.C., Monte, F.J., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., 2012. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. *Pharm. Biol.* 50, 1479–1487.
- Monção, N.B.N., Araújo, B.Q., Silva, J.N., Lima, D.J.B., Ferreira, P.M.P., Airoidi, F.P.S., Pessoa, C., Citó, A.M.G.L., 2015. Assessing Chemical Constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* Stem Bark: Possible Bioactive Components Accountable for the Cytotoxic Effect of *M. caesalpiniiifolia* on Human Tumour Cell Lines. *Molecules* 20, 4204–4224.
- Morita, H., Nakayama, M., Kojima, H., Takeya, K., Itokawa, H., Schenkel, E.P., Motidome, M., 1991. Structure and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 693–697.
- Mosaddick, M.A., Banbury, L., Forster, P., Booth, R., Markham, J., Leach, D., Waterman, P.G., 2004. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomed* 11, 461–466.
- Mosmann, T., 1983. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Oberlier, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Fairchild, C.R., Peterson, R.W., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Wani, M.C., Wall, M.E., 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J. Nat. Prod.* 65, 95–99.
- Ramaiah, S.K., 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1551–1557.
- Ringel, I., Horwitz, S.B., 1991. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 288–291.
- Santos, A.G., Ferreira, P.M.P., Vieira-Júnior, G.M., Perez, C.C., Tininis, A.G., Silva, G.H., Bolzani, V.S., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Cavalheiro, A.J., 2010. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chem. Biodivers.* 7, 205–215.
- Schabel, F., 1977. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. *Pharmacol. Ther.* 1, 411–435.
- Silva, F.A., Baisch, A.L.M., Beatriz, O., Battastini, A.M., Torres, F., Racoski, G., Silva, E.S., Alam, M.F., Apolinário, J.C.G., Lapa, A.J., 1988. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. *Acta Amaz.* 18, 219–229.
- Simões, E.R.B., Santos, E.A., Abreu, M.C., Silva, J.N., Nunes, N.M.F., Costa, M.P., Pessoa, O.D.L., Pessoa, C., Ferreira, P.M.P., 2015. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* 4, 256–263.
- Srivastava, V., Negi, A.S., Kumar, J.K., Gupta, M., Khanuja, S.P.S., 2005. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5892–5908.
- Undeva, S.D., Gomes-Abuin, G., Ratain, M.J., 2005. Pharmacokinetic variability of anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 5, 447–458.
- Wang, W., Zhao, J., Wang, Y.H., Smillie, T.A., Li, X.C., Khan, I.A., 2009. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. *Planta Med.* 75, 1436–1441.
- Waynforth, B.H., 1980. *Injection Techniques: Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. Academic Press, London.
- Williams, D.P., Kitteringham, N.R., Naisbitt, D.J., Pirmohamed, M., Smith, D.A., Park, B.K., 2002. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? *Curr. Drug. Metab.* 3, 351–366.

APÊNDICE B - Artigo submetido ao Journal: *Toxicology Letters*.

“Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS)”. Autores: Jurandy N Silva; Denise B Santos; Amanda F Goudinho; Carla Lorena S Ramos; Patrícia C Souza; Ricardo Sérgio C Almeida; Diego S Moura; Rhaul Oliveira; Cesar K Grisolia; Alberto J Cavalheiro; José Roberto O Ferreira; Manoel O Moraes Filho; Cláudia Pessoa; Paulo Michel P. Ferreira.

Manuscript Number:

Title: Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified Health System (SUS)

Article Type: Full Length Article

Keywords: clerodane diterpenes; embryotoxicity; genotoxicity; histological changes; biochemical profile; risk assessment.

Corresponding Author: Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Jurandy N Silva, Ms

Order of Authors: Jurandy N Silva, Ms; Denise B Santos, Ms; Amanda F Goudinho, Ms; Carla Lorena S Ramos, Ms; Patrícia C Souza, Ms; Ricardo Sérgio C Almeida, Ph.D; Diego S Moura, Ms; Rhaul Oliveira, Ph.D; Cesar K Grisolia, Professor; Alberto J Cavalheiro, Professor; José Roberto O Ferreira, Ph.D; Manoel O Moraes Filho, Professor; Cláudia Pessoa, Professor; Paulo Michel Pinheiro Ferreira, PhD

Abstract: We have presented a promising potentiality of *Casearia sylvestris* against in vivo tumors. In the context of antineoplastic therapy, we investigated in vitro, ex vivo, and in vivo toxicological changes induced by a Fraction with Casearins (FC) and its main constituent - Casearin X - isolated from *C. sylvestris* leaves on animal and vegetal cells, and upon invertebrates and mammals. FC was cytotoxic against hamster lung cells and human and mice fibroblasts, and caused DNA breaks, and mitochondrial depolarization in leukocytes. After 24 h of exposure, FC revealed LC50 values of 48.8 and 36.7 µg/mL on *Artemia salina* nauplii and *Danio rerio* embryos, respectively. FC reduced mitotic index of *Allium cepa* roots and caused cell cycle arrest in metaphase and anaphase. Intraperitoneal and oral acute studies revealed LD50 values of 80.9 and 267.1 mg/kg body weight, respectively. Subacute i.p. injections induced loss of weight, swelling of proximal and distal tubules and of hepatocytes, tubular and glomerular hemorrhage, Kupffer cell hyperplasia, microvesicular steatosis, lung perivascular collections of inflammatory infiltrates with neutrophils, augment of GPT, decrease of albumin, alkaline phosphatase, glucose, erythrocytes, hematocrit, hemoglobin and lymphocytes, and neutrophilia ($p > 0.05$). Only FC-treated animals at 10 mg/kg/day i.p. revealed increase of DNA damage index in leukocytes and micronucleated polychromatic erythrocytes. This research postulated side effects following use of FC-related drugs, demonstrating FC as toxic on normal mammal and meristematic cells, teratogenicity upon zebrafish embryos, myelosuppression and clastogenicity in mice, and biochemical changes indicating liver as main target for FC-induced systemic toxicity.

**Toxicological findings about an anticancer fraction with casearins described
by traditional and alternative techniques as support to the Brazilian Unified
Health System (SUS)**

Jurandy do Nascimento Silva^{a,b}, Denise Barbosa Santos^{a,b}, Amanda Freitas
Goudinho^a, Carla Lorena Silva Ramos^{a,b}, Patrícia Canteri de Souza^c, Ricardo Sérgio
Couto de Almeida^c, Diego Sousa Moura^d, Rhaul de Oliveira^d, Cesar Koppe Grisolia^d,
Alberto José Cavaleiro^e, José Roberto de Oliveira Ferreira^f, Manoel Odorico de
Moraes Filho^g, Claudia Pessoa^g, Paulo Michel Pinheiro Ferreira^{a,b*}

*^a Department of Biophysics and Physiology, Laboratory of Experimental
Cancerology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil*

*^b Postgraduate Programs in Pharmaceutical Sciences and Biotechnology, Federal
University of Piauí, Teresina, Brazil*

^c Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, Brazil

*^d Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University
of Brasília, Brasília, Brazil*

^e Chemistry Institute, State University Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, Brazil

^f School of Medical Sciences, State University of Alagoas, Maceió, Brazil

*^g Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal
University of Ceará, Fortaleza, Brazil*

*Corresponding author at: Laboratory of Experimental Cancerology, Department of Biophysics and
Physiology, Center for Health Sciences, Federal University of Piauí, Universitária Avenue, 64.049-550,
Teresina, Brazil.

E-mail address: pmpf@ufpi.edu.br (P. M. P. Ferreira)