

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS**

**THAÍSA LEITE ROLIM**

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Hyptis umbrosa* SALZM. (LAMIACEAE) E DO COMPONENTE  
MAJORITÁRIO FENCHONA**

**João Pessoa**

**2013**

**THAISA LEITE ROLIM**

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Hyptis umbrosa* SALZM. (LAMIACEAE) E DO COMPONENTE  
MAJORITÁRIO FENCHONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,  
em cumprimento às exigências para a obtenção do título  
de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.  
Área de Concentração: Farmacologia.

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral**

**João Pessoa  
2013**

**THAÍSA LEITE ROLIM**

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Hyptis umbrosa* SALZM. (LAMIACEAE) E DA FENCHONA, SEU  
COMPONENTE MAJORITÁRIO**

**APROVADA EM     /     /2013**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianna Vieira Sobral**

(Orientadora)

---

**Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio**

(Examinador Externo – UFPB)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liana Clébia Soares Lima de Moraes**

(Examinador Externo – UFPB)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilzeth de Luna Freire Pessôa**

(Examinador Interno – UFPB)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Piuvezam**

(Examinador Interno – UFPB)

Aos meus pais **Maria de Fátima Leite Rolim** e **José Maurício Leite Rolim**, pelo exemplo de vida, dignidade, perseverança e amor. Por não medirem esforços para a minha formação profissional.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, por todas as oportunidades a mim concedidas, e sobretudo pela fé, que me leva a prosseguir. Por ter colocado todos esses anjos na minha vida.

Aos meus pais **Maurício e Fátima** por nunca mediram esforços para me educar, sempre ao meu lado, incentivando, aconselhando, orgulhosos com as minhas vitórias, por serem exemplo incondicional de vida, dignidade, perseverança, amor e dedicação, sem vocês eu não seria nada. Muito Obrigada!

Aos meus irmãos **Rodrigo e André** pelo companheirismo, pelo incentivo e presença nos momentos mais difíceis. Por me fazerem sentir protegida sempre. E aos meus pequeninos **César e Maurício Filho** pela imensa alegria da convivência.

Ao meu esposo **Kalino** por ter acompanhado toda essa caminhada sempre incentivando, compreendendo, ajudando e não me deixando desistir nunca. Obrigada por todo amor e dedicação.

Aos meus amados **familiares** que sempre torceram e vibraram com as minhas vitórias, que incentivam todos os meus passos e tornam o dia a dia mais prazeroso, que das mais diversas formas contribuíram para realização deste trabalho.

As minhas amigas **Chiara Kílvia, Lilianne Beserra, Michelle Pedrosa e Joannalaura Dantas**, com as quais tenho o prazer de conviver desde a infância, por torcerem e se alegrarem com as minhas conquistas.

A minha querida orientadora **Marianna Viera Sobral** por ter me acolhido em um momento tão difícil na minha vida com tanta dedicação, paciência, carinho. Por ser um exemplo profissional e pessoal de determinação, sabedoria, dedicação, alegria e amor pelo que faz. Você é um anjo que Deus colocou na minha vida.

Ao Prof. **Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha** por ter acreditado em mim desde a iniciação científica, pela orientação durante tantos anos e pela compreensão nos momentos tão difíceis.

A Profa Dra **Maria de Fátima Vanderlei**, minha primeira orientadora, por ter acreditado em mim, por ter disponibilizado sua disciplina para que eu pudesse realizar o meu estágio em docência e pela orientação durante a realização deste estágio.

Aos meus queridos amigos da Farmacoquímica **Fábio Tenório, Analúcia Guedes e Daysianne Lira** por estarem presentes em todos os momentos, por tantas vezes que rimos, choramos, brigamos, aconselhamos, brincamos juntos, pelas trocas de ensinamentos e conselhos pessoais e profissionais, enfim, por fazerem parte da minha vida.

As amigas **Maria Madalena e Gabriella Lemos**, pelo apoio e torcida constante.

As alunas de iniciação científica **Bruna, Ana Rebeke e Jamilly** pela presença, apoio e disponibilidade em ajudar.

A minha querida cunhada, irmã e aluna de iniciação científica **Renata Abrantes** pela adorável convivência, pela força, por me escutar, por estar sempre presente, até nas horas em que ela não podia, e por tornar esses dias mais alegres.

As alunas de pós-graduação **Tatyanna Kelvia, Tatianne Mota, Vivianne Mendes, Daiene Lunguinho, Ana Paula Gomes, Aline Xavier e Monalisa Brito**, pelo apoio, por não medirem esforços para ajudar, por estarem presente independente do horário, dia da semana, sempre com alegria e boa vontade. Pela agradabilíssima convivência.

Em especial aos pós-graduandos **Heloisa Mara** (por estar sempre disposta a ajudar, pela amizade e alegria constantes), **Déborah Passoa** (com quem tive o prazer de conviver constantemente durante o desenvolvimento deste trabalho e assim dividir as dúvidas, os medos, as alegrias. Obrigada pela amizade, compreensão, disposição) e a **João Carlos Pita** (pela ajuda incomensurável em todos os momentos deste trabalho, pela disposição SEMPRE, por todas as vezes que pacientemente retirou todas as minhas dúvidas, por ajudar na realização dos experimentos, pelo apoio e amizade). Obrigada por vocês tornarem os dias mais fáceis e alegres.

Sem essa grande **FAMÍLIA LABETOX** (Laboratório de Ensaios Toxicológicos) não seria possível à realização deste trabalho.

Aos amigos **Sócrates Golzio e Adriana Fernandes** pelos ensinamentos, apoio e torcida.

Aos Professores Dr. **Marcelo Sobral da Silva** e Dr. **Josean Fechine**, pela colaboração no fornecimento do material vegetal.

Aos Professores **Teresinha Gonçalves, Liana Clébia, Hilzeth Pessôa, Marcia Piuvezam, Lêonia Batista e Fábio Sampaio** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

A Profa. Dra. **Maria Salete Trigueiro de Araújo**, pela colaboração com as análises histopatológicas, pela disponibilidade, paciência e boa vontade para sempre nos atender e tirar nossas dúvidas.

A coordenadora do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Profa. Dra. **Maria de Fátima Agra**, pela atenção concedida sempre que necessário.

A todos os professores do doutorado, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A **Universidade Federal da Paraíba**, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

A todos os **funcionários** do CBiotec e as secretárias da Pós-graduação **Caroline Medeiros Mangueira** pelos serviços prestados.

A **Luis Cordeiro** e **Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George do CBiotec pelo fornecimento dos animais.

A **Capes** pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

MUITO OBRIGADA!

**THAISA LEITE ROLIM WANDERLEY**

“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece  
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.  
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos  
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar.  
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim,  
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor,  
Do que ficou, vou me lembrar  
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou  
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar,  
Vou persistir, continuar a esperar e crer.  
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora  
Mas na alma, há certeza da vitória.”

Padre Fábio de Melo



ROLIM, T. L. ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hyptis umbrosa* SALZM. (LAMIACEAE) E DA FENCHONA, SEU COMPONENTE MAJORITÁRIO. 2013. 135f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

## RESUMO

O câncer é o nome dado a um conjunto de centenas de doenças distintas que decorrem do acúmulo progressivo de mutações. Seu tratamento tem se beneficiado dos estudos que se baseiam em pesquisas de fontes naturais. Vários compostos e derivados vegetais têm mostrado atividade antitumoral, dentre eles, os óleos essenciais. *Hyptis umbrosa* Salzm. é conhecida popularmente por aleluia do serrote e alfazema-do-mato e é pouco relatada na literatura, sendo o componente majoritário do óleo essencial das folhas dessa espécie (O.E.H.) o monoterpeno fenchona (24,8%). Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do O.E.H. e da fenchona em modelos *in vitro* e *in vivo*. No ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos o valor de  $CH_{50}$  obtido foi de 494,9 µg/mL para O.E.H. e superior a 3000 µg/mL para a fenchona, o que sugere moderada e baixa toxicidade das amostras, respectivamente, para essas células não tumorais que são comumente afetadas pela terapia antineoplásica. O.E.H. mostrou fraco efeito antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais humanas, enquanto que a fenchona não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. Após administração aguda do O.E.H. em camundongos foram observados efeitos depressores e excitatórios do Sistema Nervoso Central nos animais tratados com 2000 mg/kg do óleo. O valor estimado da  $DL_{50}$  foi em torno de 500 mg/kg. Apesar de não apresentar atividade antitumoral *in vitro*, O.E.H. (50, 100 ou 150 mg/kg) e fenchona (60 mg/kg), após nove dias de tratamento, mostraram significativa atividade *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), considerando os parâmetros volume, peso e viabilidade celular. O tratamento com O.E.H. (150 mg/kg) induziu parada do ciclo na fase G0/G1 e aumento da fração sub-G1, o que sugere morte celular por apoptose. Em conjunto com os resultados da marcação com Anexina V-IP, onde houve pequeno aumento de células marcadas com Anexina V, bem como com Anexina V-IP, pode-se inferir que, possivelmente, as células em apoptose foram fagocitadas. A fenchona induziu parada do ciclo na fase S e aumentou significativamente a porcentagem de células marcadas com Anexina V-IP, sem aumentar a marcação apenas com Anexina V, o que sugere que está ocorrendo morte celular por necrose. Observou-se ainda, aumento na média de sobrevivência dos animais transplantados com tumor de Ehrlich e tratados com o óleo essencial. As análises toxicológicas indicam que, após nove dias de tratamento com O.E.H. foi observado redução no peso corporal e baixa toxicidade hematológica e bioquímica. O tratamento com a fenchona induziu alteração nos parâmetros AST e ALT sugestivas de fibrose. A análise histopatológica indicou danos hepáticos após tratamento com O.E.H., entretanto, os danos foram considerados moderados e reversíveis. O.E.H. induziu aumento na quantidade de eritrócitos micronucleados, no ensaio do micronúcleo, apenas na maior dose testada (300 mg/kg). Portanto, é possível inferir que O.E.H. e fenchona apresentam atividade antitumoral *in vivo* com moderada toxicidade, o que não representa um fator limitante para a continuação de seus estudos pré-clínicos. Os dados permitem sugerir que a fenchona não é o único componente responsável pela atividade do óleo, uma vez que, mostrou atividade apenas no dobro na dose associada com sua quantidade no referido óleo.

**Palavras-chave:** *Hyptis umbrosa*. Óleo essencial. Atividade antitumoral. Toxicidade.

ROLIM, T. L. **STUDY OF TOXICITY AND ANTITUMOR ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM *Hyptis umbrosa* SALZM. (LAMIACEAE) AND FENCHONE, ITS MAJOR COMPONENT.** 2013. 135f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

## ABSTRACT

Cancer is the name given to a collection of hundreds of different diseases that result from the progressive accumulation of mutations. Its treatment has been benefited from studies that are based on research of natural sources. Several compounds and plant derivatives have shown antitumor activity, including essential oils. *Hyptis umbrosa* Salzm. is popularly known as aleluia do serrote and alfazema-do-mato and is rarely reported in the literature. The fenchone monoterpene is the major component of the essential oil from the leaves of this species (24.8%). This study aimed to evaluate the toxicity and antitumor activity *in vitro* and *in vivo* of O.E.H. and fenchone. In hemolysis assay of mice erythrocytes it was obtained a CH50 value of 494.9 µg/mL for O.E.H. and greater than 3000 µg/mL for fenchone, suggesting moderate and low toxicity of the samples respectively for these non-tumor cells, which are commonly affected by antineoplastic therapy. The O.E.H. showed weaker antitumor effect *in vitro* on human tumor cell lines, while fenchone did not alter cell viability at any of the concentrations tested. After acute administration of O.E.H. depressant and excitatory effects were observed in central nervous system of animals treated with 2000 mg/kg of oil. Although it hasn't shown antitumor activity *in vitro*, O.E.H. (50, 100, or 150 mg / kg) and fenchone (30 or 60 mg / kg) showed significant activity *in vivo* of Ehrlich ascites carcinoma model (EAC) after nine days of treatment, given the parameters of volume, weight and viability of the cells. The treatment with O.E.H. induced cycle arrest in the G0/G1 phase and increased sub-G1, suggesting induction of cell death by apoptosis. In conjunction with the results of staining with Annexin V-PI, where there was a slight increase of cells stained with Annexin V as well as with Annexin V-PI, it can be inferred that possibly apoptotic cells were phagocytosed. The fenchone induced cycle arrest in S phase, and significantly increased the percentage of cells stained with Annexin V-PI, without increasing marking only with Annexin V, wich suggests that cell death by necrosis is occurring. There was also an increase in median survival of animals transplanted with Ehrlich tumor and treated with essential oil. The toxicological analyzes show that the treatment with O.E.H caused a body weight decrease and lower hematological and biochemical toxicity after nine days. The treatment with fenchone induced changes in ALT and AST parameters suggestive of fibrosis. Histopathologic analysis confirmed the evidence of hepatotoxicity especially for OEH, however, the damage was moderate and reversible. The O.E.H. induced an increase in the number of micronucleated erythrocytes, in the micronucleus essay, only the highest dose tested (300 mg / kg). Therefore, we can infer that O.E.H. and fenchone shows an antitumor activity *in vivo* with moderate toxicity, which is not a limiting factor for the continuation of the pre-clinical studies. The findings suggested that fenchone is not the only component responsible for the oil activity as it showed activity only at double of the dose associated with its quantity in that oil.

**Keywords:** *Hyptis umbrosa*. Essential oil. Antitumor activity. Toxicity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Partes aéreas de <i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ....	48
<b>Figura 2</b> - Histopatologia dos rins .....	83
<b>Figura 3</b> - Histopatologia dos fígados do grupo controle transplantado. ....	84
<b>Figura 4</b> - Histopatologia dos fígados. ....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos.....	66
<b>Gráfico 2-</b> Atividade antitumoral da doxorubicina em cultura de células tumorais humanas. .....	67
<b>Gráfico 3-</b> Atividade antitumoral do O.E.H. em cultura de células tumorais humanas .....	68
<b>Gráfico 4-</b> Atividade antitumoral da fenchona em cultura de células tumorais humanas .....	68
<b>Gráfico 5</b> - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose inicial (Anexina-V+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (50 mg/Kg), O.E.H. (100 mg/Kg), O.E.H. (150 mg/kg) ou 5-FU (25 mg/Kg). ....	73
<b>Gráfico 6</b> - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose (Anexina-V+/PI+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (100 mg/Kg) ou O.E.H. (150 mg/kg). ....	73
<b>Gráfico 7-</b> Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose inicial (Anexina-V+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/Kg) ou fenchona (60 mg/kg). ....	74
<b>Gráfico 8</b> - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose (Anexina-V+/PI+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/Kg) ou fenchona (60 mg/kg). ....	74
<b>Gráfico 9</b> - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (50 mg/kg), O.E.H. (100 mg/kg), O.E.H. (150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). . ....	75
<b>Gráfico 10</b> - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/kg), fenchona (60 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). . ....	76
<b>Gráfico 11-</b> Avaliação da sobrevivência de camundongos fêmeas inoculados com células de carcinoma de Ehrlich e tratados com O.E.H. (100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg).....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relações entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos.....	26
<b>Tabela 2</b> - Composição química do óleo essencial de <i>Hyptis umbrosa</i> .....	49
<b>Tabela 3</b> - Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios de atividade antitumoral <i>in vitro</i> com a Sulforrodamina B.....	56
<b>Tabela 4</b> - Efeitos da administração i.p. de doses únicas do O.E.H. em camundongos. ....	69
<b>Tabela 5</b> - Efeitos do tratamento agudo com O.E.H. (300 mg/kg) na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos. ....	70
<b>Tabela 6</b> - Efeitos do tratamento agudo do O.E.H. nos índices dos órgãos de camundongos.	70
<b>Tabela 7</b> - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona na viabilidade celular, volume tumoral e peso dos tumores de carcinoma ascítico de Ehrlich, em camundongos. ....	72
<b>Tabela 8</b> - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona sobre o consumo de água e ração e evolução ponderal dos animais tratados.....	77
<b>Tabela 9</b> - Efeitos do O.E.H. e 5-FU nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos. ....	78
<b>Tabela 10</b> - Efeitos do O.E.H. e 5-FU nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos. ....	79
<b>Tabela 11</b> - Efeitos do O.E.H. e 5-FU nos órgãos de camundongos .....	82
<b>Tabela 12</b> - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.H. e ciclofosfamida. ....	87

## LISTA DE FLUXOGRAMA

<b>Fluxograma 1</b> - Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do O.E.H. e fenchona.....	57
--	----

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

**5-FU** - 5-fluorouracil

**ALT** - Alanina aminotransferase

**ANOVA** - Análise de variância

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AST** - Aspartato aminotransferase

**CEUA** - Comitê de Ética em Uso de Animais

**CH50** - Concentração que produz 50 % de hemólise

**CHCM** - Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

**CI50** - Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular

**CPQBA** - Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio

**FITC** - Isotiocianato de Fluoresceína

**HBSS** - Solução tampão salina de Hank's

**HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média

**HE** - Hematoxilina-eosina

**HEPES** - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

**INCA** - Instituto Nacional do Câncer

**IP** – Iodeto de propídeo

**LABETOX** - Laboratório de Ensaio Toxicológicos

**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

**NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-Oxidase

**O.E.C.** - Óleo essencial das folhas de *Croton polyandrus*

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PBS** - Solução Tampão Fosfato

**PPgPNSB** - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

**SBF** - Soro Fetal Bovino

**SNA** - Sistema Nervoso Autônomo

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SDS** - Docecil Sulfato de Sódio

**SRB** - Sulforrodamina B

**TCA** - Ácido Tricloroacético

**TGI** - Inibição de Crescimento Total

**UFPB** - Universidade Federal da Paraíba

**UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas

**VCM** - Volume Corpuscular Médio

**VHT** - Veia Hepática Terminal

**VP** - Veia Porta

**v/v** - volume/volume

**M/T** – morte/tratado



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1 Câncer: etiologia, epidemiologia e tratamento .....	23
2.2 Modelos experimentais no estudo de fármacos com potencial atividade anticâncer .....	29
2.3 Produtos naturais e o câncer .....	36
2.4 Óleos essenciais com potencial atividade antitumoral .....	38
2.5 Toxicologia de produtos naturais .....	41
2.6 <i>Hyptis umbrosa</i> : família, gênero e espécie .....	46
3 OBJETIVOS .....	51
3.1 Objetivo geral .....	52
3.2 Objetivos específicos .....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
4.1 Local da pesquisa.....	54
4.2 Material.....	54
4.2.1 Material botânico .....	54
4.2.2 Óleo essencial de <i>Hyptis umbrosa</i> .....	54
4.2.3 Animais.....	55
4.2.4 Linhagens de células tumorais.....	55
4.3 Métodos .....	57
4.3.1 Ensaios <i>in vitro</i> .....	58
4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos .....	58
4.3.1.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas .....	58
4.3.2 Ensaios <i>in vivo</i> .....	59
4.3.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	59

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em células de carcinoma ascítico de Ehrlich .....	60
4.3.2.2.1 Análise e quantificação da apoptose.....	61
4.3.2.2.2 Análise do ciclo celular .....	61
4.3.2.2.3 Sobrevida.....	62
4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich .....	62
4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração .....	62
4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	62
4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos.....	63
4.3.2.3.4 Análises anatomopatológicas .....	63
4.3.2.4 Avaliação da genotoxicidade.....	63
4.3.3 Análise estatística .....	64
5 RESULTADOS .....	66
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> .....	66
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos .....	66
5.1.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas .....	66
5.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	69
5.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	69
5.2.1.1 Avaliação comportamental e estimativa da DL50.....	69
5.2.1.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração.....	69
5.2.1.3 Avaliação dos índices dos órgãos.....	70
5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em células de carcinoma ascítico de Ehrlich .....	71
5.2.2.1 Volume celular, peso do tumor e viabilidade celular .....	71
5.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose.....	72
5.2.2.3 Análise do ciclo celular .....	74

5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich .....	76
5.2.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração .....	76
5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	77
5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos .....	81
5.2.3.4 Análises anatomopatológicas .....	82
5.2.4 Avaliação do efeito dos tratamentos na sobrevida de animais transplantados com tumor de Ehrlich .....	86
5.2.5 Avaliação da genotoxicidade.....	87
6 DISCUSSÃO .....	89
7 CONCLUSÕES .....	103
8 REFERÊNCIAS .....	105

**ROLIM, T. L.**

# INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais, produzidos por organismos marinhos, micro-organismos e plantas, exibem, de maneira geral, considerável diversidade estrutural. Quando comparados a compostos orgânicos sintéticos, os produtos naturais apresentam tipicamente mais centros quirais, menos heteroátomos, átomos de menor massa molecular, e sistemas de anel mais variados. Estes atributos fazem dos produtos naturais um recurso inestimável de diversidade química e, portanto, podem ser considerados como compostos farmacologicamente ativos em potencial ou como modelos para a otimização de métodos de química orgânica sintética na descoberta de fármacos com diferentes atividade biológicas, dentre elas atividade antitumoral (LIPAN, 2013).

Historicamente, compostos derivados de plantas têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de vários agentes antineoplásicos. O século XX apresentou um avanço significativo na pesquisa de produtos naturais no campo da oncologia, relacionados a plantas, organismos marinhos e micro-organismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Cerca de 60%, dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. Dentre esses se destacam a vimblastina e a vincristina e os análogos vindesina e vinorelbina; o paclitaxel e o análogo docetaxel; a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo; a camptotecina e os análogos, topotecano e irinotecano. Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares (NEWMAN; CRAGG, 2007; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Ainda, novos agentes promissores, naturais ou sintéticos com estruturas baseadas em produtos naturais, estão na fase clínica de desenvolvimento, incluindo flavopiridol e combretastina A4 fosfato (SEDLACEK, 2001; KAPOOR, 2013).

Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, várias limitações permanecem evidentes, como por exemplo, alguns tumores ainda não dispõem de tratamento adequado, o aparecimento de inúmeros efeitos indesejáveis e o desenvolvimento de resistência ao tratamento. Considerando ainda os dados epidemiológicos relacionados ao câncer, pode-se inferir que os estudos para a busca de novos medicamentos para o tratamento da doença são imprescindíveis. Estima-se que o número anual de casos novos de câncer no mundo passou de 10 milhões em 2000 e, em 2020, ultrapassará 15 milhões, sendo que, aproximadamente 60%, casos novos, acontecerá em regiões menos desenvolvidas (OMS,

2002; SANTOS et al., 2012). No Brasil, as estimativas para o ano de 2013 apontam para 518.510 novos casos de câncer (INCA, 2011).

O Brasil tem quase um terço da flora mundial com uma biodiversidade exuberante, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (KATO, 2001). Entretanto, existe um grande número de plantas brasileiras que permanecem sem quaisquer estudos quanto a sua química, propriedades terapêuticas e/ou tóxicas e que representam um enorme potencial para o desenvolvimento de medicamentos (VARANDA, 2006; MARTINS-RAMOS; BORTOLUZZI; MANTOVANI, 2010).

Entre os produtos naturais obtidos de plantas, os óleos essenciais e seus componentes voláteis têm sido utilizados para prevenção e tratamento de diversas doenças. Há relatos na literatura de óleos essenciais com atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antidiabética, no sistema cardiovascular para o tratamento da aterosclerose, e antitumoral. Portanto, esse tipo de derivado vegetal representa uma alternativa em potencial para a descoberta de novas substâncias bioativas (EDRIS, 2007).

Entretanto, um dos principais problemas da utilização de produtos de origem vegetal é a crença de que eles são isentos de toxicidade. O uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas, dentre elas, alcaloides pirrolizidínicos, antraquinonas e lactonas sesquiterpênicas. Por isso, o balanço entre a atividade biológica *versus* a toxicidade de um determinado produto natural é um parâmetro fundamental para verificar sua aplicação farmacológica (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Diante do exposto, evidencia-se a importância e a necessidade de estudos farmacológicos e toxicológicos de plantas medicinais e produtos delas obtidos, na perspectiva de encontrar alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer.

Vislumbrando o potencial farmacológico da família Lamiaceae e reconhecendo a importância do gênero *Hyptis*, no presente trabalho optou-se por enveredar os estudos com a espécie *Hyptis umbrosa*, mais especificamente com o óleo essencial das partes aéreas desta planta, cujos dados farmacológicos e toxicológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá conduzir à descoberta de nova fonte de substâncias naturais com potencial atividade antitumoral e baixa toxicidade.

**ROLIM, T. L.**

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Câncer: etiologia, epidemiologia e tratamento**

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças distintas que decorrem do acúmulo progressivo de mutações celulares, ou seja, alterações no código genético. Através desse processo mutagênico as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades incluindo uma potencial capacidade de proliferação, autossuficiência ilimitada em sinais de crescimento e resistência a apoptose (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Sendo assim, as mutações fazem com que células que antes executavam um programa bem definido, associado às suas funções em seu tecido de origem, cresçam de maneira descontrolada (ANDRÉIA; ROGER; ROBERTO, 2006).

Todas essas propriedades geralmente são ocasionadas por um acúmulo de mutações nos oncogenes, nos genes supressores de tumor e nos genes reparadores de DNA, o que caracteriza o câncer como doença genética. A desregulação desses mecanismos que controlam o ciclo celular permite o acúmulo de mutações e a transformação neoplásica de uma célula (FOSTER, 2008; COSTA-LUTUFO, 2010).

Os tumores evoluem para obter apoio em torno de células estromais, atrair novos vasos sanguíneos para levar nutrientes e oxigênio, e evitar a detecção imunológica (HANAHA; WEINBERG, 2000; LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Ocorre então o processo de progressão, no qual algumas células tumorais perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem pela produção de enzimas proteolíticas, passam pela a parede dos vasos sanguíneos ou linfáticos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos, as denominadas metástases (PARMIGIANI; CAMARGO, 2004; LOPEZ, 2012). A capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de formar as metástases é responsável, em última análise, pela morte de dois a cada três pacientes com o diagnóstico de câncer (OTAKE; CHAMMAS; ZATZ, 2006).

Como o termo câncer refere-se a um conjunto de doenças distintas, estas foram classificadas de acordo com o seu local de origem no organismo. Quando o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Linfoma é o nome genérico usado para designar todo tipo de câncer do sistema linfático, e leucemia refere-



se ao câncer nas células jovens sanguíneas que se acumulam na medula óssea (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010).

O surgimento do câncer está relacionado a uma multicausalidade de fatores conhecidos como carcinogênicos, isto é, agentes iniciadores capazes de modificar a estrutura do DNA de uma célula (OTTO, 2002). Esses fatores podem ser divididos em intrínsecos que são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinados, como a constituição genética herdada, e fatores extrínsecos relacionados ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, que atuam de modo a alterar a estrutura genética das células (NASCIMENTO; FONSECA; RODRIGUES, 2012). Dentre estes fatores podem ser citados a radiação solar, exposição a agentes químicos, físicos ou biológicos, estilo e hábitos de vida e alimentares principalmente em relação a alimentos ricos em gorduras, nitritos, alcatrão e aflatoxina, sendo o surgimento do câncer dependente da intensidade e duração da exposição das células aos agentes cancerígenos. Ambos os fatores, intrínsecos e extrínsecos, estão, na maioria das vezes, inter-relacionados (CARNEIRO; PINTO; PAUMGARTTEN, 1997; SILVA, 2006).

Os fatores de risco extrínsecos, por serem mais vulneráveis e evitáveis, consistem em alvos de prevenção primária, que se refere a toda e qualquer ação voltada para redução da exposição da população a fatores de risco da doença (TEIXEIRA, 2001). Existe também a prevenção secundária que abrange ações as quais permitem o diagnóstico precoce da doença e o seu tratamento imediato, o que aumenta a possibilidade de cura (GILL; TATTERSALL, 1999; NASCIMENTO; FONSECA; RODRIGUES, 2012).

O câncer é considerado um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento igualando o comportamento observado nos países industrializados, com tendência de aumento da incidência em todos os países para todos os tipos de câncer. Dados demonstram que, em termos mundiais, a incidência do câncer pode aumentar em 50% para o ano de 2020, com 15 milhões de casos novos (GUANCHE et al., 2007; CAVALINI; CRUZ; SILVA, 2012).

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA/RJ/Brasil) mostram que, no Brasil, para o ano de 2013, prenunciam-se quase 520 mil novos casos da doença, com maior concentração nas regiões Sul e Sudeste do país. Os tipos mais incidentes, com exceção ao de pele tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão para o sexo masculino e os cânceres de mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2011).

O tratamento para o câncer pode ser realizado através da hormonioterapia, imunoterapia, radioterapia, quimioterapia e procedimento cirúrgico, bem como da

combinação de alguns desses procedimentos (DA SILVA et al., 2012). A quimioterapia baseia-se na busca por destruição das células neoplásicas, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Contudo, podem ocorrer efeitos secundários importantes naquelas células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (ALMEIDA et al., 2005; LONGLEY; JOHNSTON, 2005; BRANDÃO et al., 2010).

Por se tratar de uma doença com elevado índice de mortalidade, que atinge anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo, vários esforços estão sendo feitos na busca de novos agentes antineoplásicos. Novas estratégias vêm sendo estudadas na perspectiva de solucionar problemas da quimioterapia antineoplásica, como a baixa concentração de antineoplásicos em tumores, toxicidade sistêmica (EDMONSON et al., 2002; EXTERMANN et al., 2002; MA et al., 2002; TSALIC et al., 2003), ausência de seletividade para células tumorais, e o aparecimento de células tumorais resistentes aos quimioterápicos (PUSZTAI et al., 1998; BLAGOSKLONNY, 1999; KRISHNA; MAYER, 1997; FRACASSO et al., 2000). Baseadas em avanços significativos no conhecimento da biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (ALTMANN; GERTSCH, 2007; BRANDÃO et al., 2010).

Os antineoplásicos são fármacos quase tão heterogêneos (quando consideradas suas características químicas e mecanismos farmacológicos) quanto os tumores envolvidos, como mostrado na tabela 1 (ALMEIDA et al., 2005). Eles podem ser classificados em fármacos ciclo-celular específicos (CCS), quando exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, ou fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), os quais tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (Tabela 1). Estes últimos ainda podem ser subclassificados em relação ao mecanismo de ação no DNA, considerando que eles podem agir de diferentes maneiras, como por exemplo: i) interagindo diretamente com o DNA, como os agentes alquilantes, dentre estes, mostardas nitrogenadas, nitrossuréis e complexos tipo cisplatina; ii) formando radicais livres que interagem com o DNA fragmentando suas hélices, como a bleomicina; iii) interagindo com a fenda menor do DNA, como os fármacos berenil, pentamidina e análogos; iv) alterando as propriedades de pareamento das bases, como os agentes intercalantes proflavina, acridina, amsacrina; e v) inibindo a DNA-girase, como a doxorubicina (ALMEIDA et al., 2005).

**Tabela 1** - Relações entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos

<b>Agentes ciclo-celular específicos (CCS, “Cell Cycle-Specific”)</b>	<b>Agentes ciclo-celular não específico (CCNS, “Cell Cycle-NonSpecific”)</b>
1.1. Agentes Antimetabólitos	2.1. Produtos Naturais
1.1.a. Análogo do ácido fólico	2.1.a. Antibióticos naturais
1.1.b. Antagonistas das pirimidinas	2.1.a.1. Antraciclinas
1.1.c. Análogos das purinas e inibidores correlatos	2.1.a.2. Mitomicina
1.2. Agentes Hormonais	2.1.a.3. Dactinomicina
1.2.a. Adrenocorticosteróides	2.1.a.4. Plicamicina
1.2.b. Progestinas	2.1.a.5. Bleomicina
1.2.c. Estrogênios	2.1.b. Alcaloides pirrolizidínicos
1.2.d. Androgênios	2.2. Complexos de Coordenação de Platina
1.2.e. Antiestrogênio	2.2.a. Cisplatina (cis-DDP)
1.2.f. Antiandrogênio	2.2.b. Carboplatina (CBDCA)
1.2.g. Análogo do hormônio liberador de gonadotropina	2.3. Agentes Alquilantes Diversos
1.2.h. Inibidor da aromatase	2.3.a. Mostardas nitrogenadas
1.2.i. Inibidor do hormônio peptídico	2.3.b. Nitrossuréias
1.3. Produtos Naturais	2.3.c. Triazenos
1.3.b. Enzimas	

Fonte: Almeida et al., 2005, adaptado.

Outra classe de fármacos importantes são os inibidores da angiogênese. Esse processo envolve a formação de novos vasos sanguíneos, a partir daqueles existentes, com o objetivo de fornecer o suprimento de oxigênio e nutrientes necessários para a proliferação ativa das células tumorais. Portanto, a angiogênese representa um aspecto crítico da progressão tumoral e metástase. O primeiro fármaco anti-angiogênico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), utilizado atualmente para tratamento de tumores metastáticos de pulmão, mama, rins e coloretal (GIULIANO; PAGÈS, 2013).

Um importante problema frequentemente encontrado na terapia do câncer é o aparecimento de uma sub-população de células que são resistentes ao tratamento. Tumores sólidos contêm células em hipóxia que são resistentes à morte por radiação ionizante e pela maioria dos agentes antineoplásicos. Por isso, foram desenvolvidos os agentes biorredutíveis, compostos como a mitomicina C, misonidazol e tirapazamina, que necessitam de ativação metabólica para gerar metabólitos citotóxicos, processo este facilitado pela condição de hipóxia presente nos tumores sólidos (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Na terapêutica do câncer de mama surgiram os moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERM'S). Estes fármacos competem pelo sítio de ligação no receptor do estradiol endógeno localizado no tumor, reprimindo desta forma os sinais de crescimento por ele promovido. Somando-se a vantagem de menores índices de toxicidade, estes fármacos apresentam segurança em pacientes na pré e pós-menopausa devido a suas características singulares ao ambiente de ação. O tamoxifeno é o fármaco da classe dos SERM'S mais utilizado, possuindo efeito antagonico ao estrogênio em tecido mamário (o que reduz a proliferação do tumor) e efeito de agonista parcial na periferia (reprimindo assim a desmineralização óssea comum no pós-menopausa) (LEAL; CUBERO; DEL GIGLIO, 2010).

Os anticorpos representam uma promissora classe de novos fármacos em desenvolvimento contra o câncer, eles podem ser usados para exercer diferentes atividades biológicas ou como veículos, quando conjugados a diferentes substâncias como radioisótopos, fármacos, toxinas ou peptídeos. A capacidade do anticorpo carregando um agente terapêutico se ligar especificamente ao antígeno de uma determinada célula ou tecido tumoral tem sido uma grande ferramenta da indústria farmacêutica para aumentar a ação do fármaco e minimizar seus efeitos colaterais (MCCARRON et al., 2005).

Os anticorpos por si só normalmente não conseguem destruir uma célula, mas, ao se ligarem a ela, podem ativar diferentes mecanismos imunológicos capazes de bloquear o crescimento ou mesmo promoverem a sua morte. Os anticorpos ao se ligarem aos seus alvos específicos podem ser também usados como moduladores agonistas ou antagonistas de vias de sinalização celular estabilizando, diminuindo ou mesmo inibindo a proliferação celular ou induzindo a sua morte (MCCARRON et al., 2005; ANDRADY et al., 2011).

Uma estratégia para alcançar tumores sólidos e diminuir ainda mais a imunogenicidade foi a construção de fragmentos cada vez menores de anticorpos, com diminuição do peso molecular, mas que mantivessem a capacidade de se fixar a antígenos e pudessem ser conjugados à outras moléculas (ECCLES 2001; AGUILLÓN et al., 2003; HUST et al., 2012).

O primeiro anticorpo monoclonal (mAb - *monoclonal antibody*) aprovado pelo FDA para o tratamento de um tumor foi o Rituximab, um mAb quimérico anti-CD20 IgG1, específico para o antígeno de superfície CD20, presente em neoplasias linfoides de células B como a leucemia linfóide crônica e linfomas não-Hodgkin (NHL) de células B, resistentes a quimioterapia convencional (ORTIN 2005; ECCLES 2001; KLIMM et al., 2005; ANDRADY et al., 2011; KAUMAYA; FOY, 2012). Este foi seguido por outros mAbs como o trastuzumab, contra HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), utilizado para tratar pacientes com câncer de mama expressando o antígeno HER2/neu, cetuximab específico contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (STROME et al., 2007), e panitumumab, que se liga ao EGFR e é útil para o tratamento de pacientes com câncer colorretal que superexpressam EGFR, (RUTHANN et al., 2007; AURISICCHIO et al., 2012).

Eventos epigenéticos incluindo as modificações de histonas são cruciais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes. Erros nestes processos podem levar a uma expressão aberrante de genes e a uma perda de *check-points* anticâncer (ROTHHAMMER; BOSSERHOFF, 2007; MULLER; PRADO, 2008). Estas modificações podem resultar em transcrição ou silenciamento gênico através da ação de enzimas capazes de acetilar, desacetilar ou transferir grupamentos metil. Entretanto, por se tratarem de alterações epigenéticas, ou seja, que não estão na sequência de DNA, podem ser revertidas. A intervenção nas alterações epigenéticas tem se apresentado como um campo promissor na busca de agentes terapêuticos (MINAMI et al., 2013; WELLS et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que muitos agentes, alguns já utilizados na terapêutica (como o ácido valpróico), atuam sobre o complexo enzimático que está envolvido nas modificações das histonas, revertendo a alteração epigenética, permitindo assim a reativação de genes supressores de tumor e/ou outros genes que são cruciais para o funcionamento normal das células (GU et al., 2012). Os Inibidores das Histonas Desacetilases (iHDAC) têm emergido como uma nova classe de agentes anticâncer (MINAMI et al., 2013; WELLS et al., 2013). Estes fármacos têm demonstrado atividades contra diversos tipos de câncer e notáveis efeitos na proliferação da célula tumoral, na morte celular programada, na diferenciação e angiogênese tumoral *in vitro* e *in vivo*. Alguns têm demonstrado potencial terapêutico, em testes clínicos em fases iniciais, para malignidades hematológicas como linfoma cutâneo de células T, síndromes mielodisplásicas e linfoma difuso de células B. Exemplos de iHDAC incluem ácidos graxos de cadeia curta (butirato e ácido valpróico), compostos derivados do

ácido hidroxâmico (trichostatin A e oxanflatin), tetrapeptídeos cíclicos (apicidin e depudecin) e um derivado sintético da benzamida (MS-275) (MENDITI; KANG, 2007).

Apesar do grande progresso na terapia do câncer, como demonstrado pela ampla diversidade farmacológica surgida nos últimos anos, muitos tumores ainda são de difícil remissão (RIVA et al., 2012). Considerando ainda que o número de pessoas acometidas com a doença aumenta progressivamente no mundo inteiro, a descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração, alta eficácia e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

## **2.2 Modelos experimentais no estudo de fármacos com potencial anticâncer**

Diante da gravidade do câncer e do apelo social que representa, várias pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos, no intuito de compreender o desenvolvimento da doença, na busca por tratamentos mais eficazes e menos tóxicos (ARAUJO; McELWAIN, 2004).

Para isso, existem diversos modelos experimentais pré-clínicos validados. Os mais utilizados são as culturas de células e tecidos (pesquisa *in vitro*), e os animais de laboratório (pesquisa *in vivo*) (FERREIRA; FERREIRA, 2003).

Para a pesquisa de novos fármacos anticâncer, o aprimoramento da metodologia de cultura de células permitiu o cultivo e manutenção de diversas linhagens celulares oriundas de diferentes tumores humanos, possibilitando o desenvolvimento de metodologia para triagem *in vitro* (HARVEY; CREE, 2010).

A capacidade de estudar as células em nível molecular relaciona-se com a forma como as células podem crescer e serem manipuladas em laboratório. Desse modo, a cultura de células *in vitro* permite estudar crescimento, diferenciação e morte celular e efetuar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

A metodologia de ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* permite a avaliação de extratos e princípios ativos em diversas células neoplásicas e não neoplásicas, possibilitando a descoberta de novas drogas com maior especificidade. Conta ainda com maior rapidez e eficiência do método, que avalia um número grande de drogas em um curto intervalo de tempo (RUBISTEIN et al., 1990; SKEHAN et al., 1990).

Um dos procedimentos utilizados para avaliar a citotoxicidade e viabilidade é o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), um corante

amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectrofotometricamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

Outro método de avaliação da atividade citotóxica amplamente utilizado é a avaliação da proliferação de células cancerígenas humanas utilizando a sulforrodamina B (SRB). Esse teste avalia o conteúdo proteico de células (aderentes ou em suspensão), e baseia-se no pressuposto da síntese proteica ser uma medida da proliferação celular. SRB é um corante com dois grupos sulfônicos que lhe conferem a capacidade de se unir eletrostaticamente aos aminoácidos básicos das proteínas; como essa se liga aos resíduos dos aminoácidos a quantidade de corante acumulado é proporcional ao número de células presentes (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Apesar do ensaio de redução do MTT ser bastante utilizado mundialmente, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) tem estimulado a utilização de outros ensaios para a avaliação da atividade antitumoral *in vitro*, como a SRB. Isso ocorre porque a avaliação da atividade citotóxica utilizando a SRB possui um ponto final mais estável, isto é, esse corante não requer um tempo determinado de incubação para a sua posterior análise espectrofotométrica como ocorre no caso do MTT, que é mais instável. O ensaio com SRB possui ainda um desenvolvimento mais fácil e um melhor controle de qualidade (MONKS et al., 1991). Trabalhos mostram ainda, que algumas substâncias são capazes interagir de alguma forma com o MTT e assim inibir a redução do MTT sem afetar a viabilidade celular, ou ainda, induzir a redução do MTT na ausência de células vivas. Por isso, é recomendada a utilização de outros ensaios de citotoxicidade para avaliar o efeito de substâncias químicas na viabilidade de culturas celulares (AHMAD et al., 2006; TREVISI et al., 2006).

Entretanto, a atividade citotóxica seletiva sobre células cancerosas observada em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente numa atividade *in vivo*. Modelos de câncer em animais são sistemas que mimetizam a natureza do tumor encontrado em humanos. Assim, a escolha de um modelo para a avaliação da atividade *in vivo* é fundamental durante a investigação de uma nova terapia antineoplásica. As duas metodologias mais empregadas no

estabelecimento do câncer em animais de laboratório envolve indução química ou transplante de células tumorais (KERBEL, 2003).

Sendo assim, um grande avanço no estudo dos tumores tem sido a utilização de métodos experimentais, onde são usados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório, pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis, como por exemplo, o tumor de Ehrlich (DAGLI, 1989; ASSIS, 2007). Este tumor é um bom modelo para estudos envolvendo citologia, por crescer na forma ascítica, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas (HOSSNE, 2002).

O tumor de Ehrlich é um carcinoma de rápido crescimento com comportamento agressivo (NASCIMENTO et al., 2006). Foi primeiramente descrito por Paul Ehrlich em 1906. É um adenocarcinoma de mama de camundongos transplantável, constituído de células de origem epitelial (EHRlich, 1906). Originalmente de crescimento sólido foi convertido na forma ascítica por Loewenthal e Jahn em 1932, e desde então é estudado na forma sólida, quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal, desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal, com grande acúmulo de fluido no abdômen (ascite) (KLEIN; KLEIN, 1956; EHRlich, 1906; VIEIRA et al., 2010).

O líquido ascítico ou fluido ascítico consiste num líquido presente em quantidade anormalmente aumentada na cavidade abdominal. Fisiologicamente, existe uma quantidade mínima de fluido na cavidade peritoneal. Este fluido tem a função de lubrificar a cavidade abdominal, permitindo um movimento de deslize das alças intestinais entre si à medida que se faz necessário em virtude da progressão dos alimentos durante a digestão e produção do bolo fecal. Normalmente é um líquido claro, estéril e viscoso produzido sob a forma de ultrafiltrado do plasma, sob influência da permeabilidade vascular e das forças hidrostáticas (KARCHER; PHERSON, 2011). Após a inoculação intraperitoneal das células do tumor de Ehrlich, o volume da ascite e o número de células aumentam progressiva e rapidamente (VINCENT; NICHOLLS, 1967; VIEIRA et al., 2010).

O tumor de Ehrlich ascítico cresce produzindo, nos primeiros dias, um líquido fluídico com baixa população celular, que progride até o sétimo ou nono dias. Após esse período ocorre diminuição do número de células e o líquido torna-se hemorrágico e fibrinoso, coagulando-se de forma relativamente rápida. Normalmente, dependendo do número de células inoculadas, o animal pode sobreviver cerca de 20 a 25 dias após a inoculação intraperitoneal, o que depende da linhagem dos camundongos (DAGLI, 1989; BALA et al., 2010; HALDAR et al; 2010).



A implantação do tumor ascítico de Ehrlich induz uma reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação do edema, migração celular e formação progressiva do líquido ascítico. A formação do fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, afinal seus constituintes servem de fonte nutricional para as células tumorais (FECCHIO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2006).

Sabe-se que, grande número de princípios ativos obtidos de plantas tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais por alterações nas vias de transdução de sinais que modulam a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, a proliferação, o metabolismo e a morte celular (HEMAISWARYA; DOBLE, 2006). O mecanismo anticâncer mais procurado atualmente é o de indução seletiva da apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005; STRASSER; CORY; ADAMS, 2011). Isso porque, demonstrou-se que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem pela indução desse tipo de morte celular levando a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Apoptose é um processo de morte celular programada em resposta a muitos estímulos fisiológicos e patológicos (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001). É reconhecida como um mecanismo importante na homeostase celular durante o desenvolvimento, sendo um processo que elimina células supérfluas, danificadas ou células mutantes (REED, 2002). No entanto, a apoptose tem sido implicada em muitas doenças, incluindo doenças vasculares isquêmicas e o câncer (GILL et al., 2002; MAHMOOD; SHUKLA, 2010).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (ARAVINDARAM; YANG, 2010). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Essas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; STRASSER; CORY; ADAMS, 2011). Outra característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação

internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000).

Outro tipo de morte celular é a necrose, na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A presença de necrose muito provavelmente está relacionada à falta de oxigênio e de outros fatores nutricionais, sobretudo na região central de tumores sólidos. As células tumorais tem a capacidade de produzir fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, e quando a taxa de crescimento é muito alta e a produção desses fatores não é proporcional à necessidade, as células tumorais sofrem hipóxia e morrem por necrose (MONTENEGRO; FRANCO; 1999; ASSIS, 2007; RIZZO, 2011).

O processo apoptótico pode ser induzido por duas vias, a extrínseca, iniciada por receptores localizados na membrana externa das células e pela via intrínseca, associada a mitocôndria, as quais convergem para a via comum das caspases executoras que são sintetizadas como precursores chamados de pró-caspases e, quando clivados, assumem sua forma ativa. As caspases iniciadoras são responsáveis por detectar e traduzir sinais apoptóticos, clivando e ativando as caspases efectoras, que, por sua vez, clivam alvos e proteínas que incluem enzimas de reparo do DNA, proteínas do citoesqueleto e moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, o que, por fim, culmina em alterações associadas a apoptose (CURTI; COTTER, 2003; YOULE; STRASSER, 2008).

A via extrínseca da apoptose ou via receptores de morte como CD95 (Fas ou Apo-1) ou TNF-R1 (receptor do fator de necrose tumoral), são estimulados por ligantes de morte específicos. Tais receptores, quando estimulados, associam-se às caspases iniciadoras (como a pró-caspase -8 ou -10) através de proteínas adaptadoras, como a FADD (*Fas-Associated Death Domain*), TRADD (*TNF Receptor- Associated Death Domain*) e RIP (*Receptor-Interacting Protein*), levando a trimerização do receptor. O complexo resultante ativa a caspase iniciadora que, subsequentemente, ativa a cascata de caspases efectoras (ISRAELS; ISRAELS, 1999; FISCHER; SCHULZE-OSTHOFF, 2005; LIU, et al., 2006; FRAZÍLIO, 2011; MILOT; FOTOUHI-ARDAKANI; FILEP, 2012).

A via intrínseca (mitocondrial), regulada pela família de proteínas Bcl-2 (*The B-cell lymphoma protein-2 family*), é ativada por sinais internos (danos no DNA, oncogenes ativados ou privação de fatores de crescimento) os quais são detectados

pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação do citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003; FRAZÍLIO, 2011). Quando no citosol, o citocromo *c* forma um complexo proteico indutor de apoptose, denominado apoptossomo. Este complexo é formado por monômeros de Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) com moléculas de caspase 9 e citocromo *c* que ativam a caspase 3, responsáveis pela execução da morte celular por apoptose (RUPNARAIN et al., 2004; MILOT; FOTOUHI-ARDAKANI; FILEP, 2012).

Outra característica dos cânceres humanos é a perda da regulação normal do ciclo celular considerando que erros nesse processo contribuem diretamente para a formação um fenótipo maligno (NEBERT, 2002; BARTEK; LUKAS, 2001).

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna (HAHN; WEINBERG, 2002), mas a maior parte deles interfere na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular e dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer (SALMONM, 1998; ALMEIDA et al., 2005). Aliado a isso, observa-se que muitos fármacos, dentre eles produtos naturais como os alcaloides da vinca e taxois, antineoplásicos amplamente utilizados na prática clínica, exercem seus efeitos por interagir de alguma forma com o ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

A proliferação celular é um processo coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, de modo preciso, por uma rede bioquímica complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2 e M. Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenação dos processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES; BARBACID, 2009). O mau funcionamento nessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem o aparecimento de diversas enfermidades, dentre elas o câncer (PAULOVICH et al., 1997; OGINO et al., 2005).

A célula que não está replicando apresenta-se na fase G0. Nesta fase, o DNA apresenta-se super-enovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G1, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (FOSTER, 2008). Essa mudança de estágio responde a fatores extracelulares que, por uma cascata de sinalização, fornecem o estímulo para que a célula saia de G1 e se prepare para entrar em S. Nesta fase, ocorre a

duplicação dos cromossomos, resultando em uma fita recém sintetizada, exatamente complementar à matriz (ALMEIDA et al., 2005).

Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que afetam a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular. Esses controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detém a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado (SALMONM, 1998).

Ao fim de G1 após um momento definido como *check point*, o sistema que regula a progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado por mecanismos intracelulares que envolvem a sequencial ativação de uma família de proteínas chamadas de quinases dependentes de ciclina (CDKs) (PARDEE, 1974; HIRSCHI et al., 2010). A atividade destas enzimas é dependente da associação com uma subunidade reguladora positiva pertencente à família de ciclinas, formando um complexo catalítico ciclina-CDK ativo (SHERR, 2000). Apenas cinco CDKs parecem ser ativas durante o ciclo celular: CDK4, CDK6 e CDK2 (durante G1), CDK2 (na fase S), CDK1, também conhecida como CDC2 (em G2 e M). As CDKs restantes parecem não ter um papel crucial na progressão do ciclo celular normal (LAPENNA; GIORDANO, 2009; MALUMBRES; BARBACID, 2009). Os complexos ativos de ciclina e CDK, por sua vez, atuam sobre uma macromolécula central do sistema de controle do ciclo celular, a proteína Rb (Retinoblastoma). A proteína Rb é uma proteína inibitória que se encontra hipofosforilada em seu estado normal. Por influência de complexos enzimáticos ativados pela sinalização mitogênica, pode ser fosforilada, permitindo a liberação do fator de transcrição E2F, que por sua vez induz a expressão de genes que controlam a entrada na fase S (HIRSCHI et al., 2010). A Rb fosforilada (pRb) e suas proteínas relacionadas, p107 e p130, regulam a proliferação celular e foram descritas por estarem mutadas em muitos tipos de câncer (EKHOLM et al., 2001).

Após a fase S, inicia-se a fase G2, momento em que é sintetizado o RNA e muitas proteínas necessárias para as duas células que serão geradas, bem como a preparação para a próxima etapa, a mitose (M). Na mitose ocorre a condensação dos cromossomos, formação dos fusos mitóticos e alinhamento dos microtúbulos e, finalmente, a citocinese: separação das células filhas recém formadas, finalizando o ciclo de replicação celular (a célula retorna à fase G0). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à

fase G0), assim passa da fase M para nova fase G1 (ALMEIDA et al., 2005; HARPER; BROOKS, 2004; EGGERT; MITCHISON; FIELD, 2006).

Todas essas vias e alvos moleculares, relacionados a apoptose e ciclo celular, têm sido objetos de pesquisas no sentido de elucidar mecanismos de ação de novos fármacos antineoplásicos, dentre eles, àqueles de origem natural (COSTA-LUTUFO, 2010).

### **2.3 Produtos naturais e o tratamento do câncer**

O tratamento do câncer tem se beneficiado dos estudos que se baseiam em pesquisas de fontes naturais (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). Das drogas utilizadas no tratamento do câncer, cerca de 60% são provenientes de produtos naturais ou diretamente derivados destes (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; RIZZO, 2011).

Muitos vegetais, frutas e verduras possuem componentes como carotenoides, vitaminas antioxidantes, compostos fenólicos, terpenoides, esteroides, indols e fibras insolúveis que podem agir de forma a bloquear, suprimir ou inibir a carcinogênese (HAIL et al., 2008, GIBELLINI et al., 2011). Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos em humanos têm mostrado que essas substâncias naturais oferecem importantes benefícios para a saúde humana, como redução do risco de doenças cardiovasculares, atividade antioxidante e anticancerígena (ZAFRA-GOMEZ et al., 2010).

Dentre os quimioterápicos de origem vegetal utilizados para o tratamento do câncer se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); e ainda o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®) (HARVEY, 2008).

No final dos anos 50, estudos levaram a descoberta da propriedade antimitótica dos alcaloides vimblastina e vincristina, extraídos de *Catharrantus roseus*, sendo então aprovadas pelo FDA como agentes anticancerígenos, desde então, vários análogos semissintéticos têm sido pesquisados (ISHIKAWA et al., 2009). A vincristina e a vimblastina agem desestabilizando os microtúbulos (SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979; MANN, 2002). Ligam-se às  $\beta$ -unidades de tubulina em sítios específicos para tais alcaloides e a ligação é rápida e reversível, induzindo mudanças conformacionais na tubulina e dificultando a associação com outras moléculas iguais. A ligação também pode ser feita diretamente aos microtúbulos pela extremidade terminal positiva, sendo que aproximadamente duas moléculas

de vimblastina em cada unidade já são capazes de desestabilizar 50% dos microtúbulos, sem necessariamente causar a despolimerização (JORDAN; WILSON, 2004).

Outra descoberta importante na área de câncer foi os agentes clinicamente ativos, etoposídeo e teniposídeo, que são derivados semissintéticos do produto natural epipodofilotoxina, um isômero de podofilotoxina, que foi isolado como agente antitumoral a partir das raízes de várias espécies do gênero *Podophyllum*, tais como *P. peltatum* e *P. emodii*. Extensas pesquisas levaram ao desenvolvimento do etoposídeo e teniposídeo como agentes clinicamente eficazes que são utilizados no tratamento de linfomas e cânceres bronquiais e testiculares e que induzem o bloqueio pré-mitótico no final da fase S ou no início da fase G2 do ciclo celular, devido à ligação destes com a topoisomerase II, inibindo que essa enzima complete sua função e repare as duas fitas de DNA que foram previamente quebradas (CANEL et al., 2000; CRAGG; NEWMAN, 2009).

Ocorreu no ano de 2007 a aprovação dos medicamentos Ixempra® (ixabepilona), derivado da epotilona com ação em microtúbulos, Yondelis® (trabectedina), primeiro medicamento anticâncer verdadeiramente de origem marinha, alquilante de DNA, e Torisel® (temsirolimus), inibidor de proteína quinase mTOR (BAILLY, 2009).

Estudos mostraram que a salvicina, uma naftoquinona de estrutura diterpenoide (ZHANG et al., 1999), constituinte da planta chinesa *Salvia prionitis*, apresentou significativa atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo* contra tumores humanos sólidos (MENG; ZHANG; DING, 2001). A salvicina tem a mesma potência do etoposídeo, agindo contra três tipos de leucemia, além de ser citotóxica frente células malignas multi-resistentes. Esta atividade foi associada à indução de apoptose, por ação na topoisomerase II (MENG; ZHANG; DING, 2001).

A camptotecina, um alcaloide extraído e isolado de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), deu origem aos medicamentos semissintéticos irinotecano (Camptosar®) e topotecano (Hycamptin®). Esta classe de agentes atua através da inibição da topoisomerase I, uma enzima importante envolvida na via de replicação do DNA durante a progressão do ciclo celular (CRAGG; NEWMAN, 2004).

Há relatos da descoberta do paclitaxel (Taxol®), isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt.) em 1971. O paclitaxel e seus derivados agem pelo mecanismo de estabilizarem microtúbulos e inibirem a despolimerização dos mesmos, causando a morte celular. Estes compostos se ligam fracamente às tubulinas livres, mas com alta afinidade às que já fazem parte do microtúbulo, nas  $\beta$ -unidades da superfície interna (JORDAN; WILSON, 2004). Ao contrário do exemplo dos alcaloides da vinca, os taxanos

interagem preferencialmente com a tubulina polimerizada, ao invés de interagirem com os heterodímeros de tubulina, e acabam por estabilizar os microtúbulos, impedindo a despolimerização. A ligação ocorre na subunidade  $\beta$ , sendo esse processo específico e reversível (EFFERTH et al., 2007).

Dentre as várias classes de compostos que tem como alvo proteínas reguladoras do ciclo celular, os flavonoides têm se mostrado promissores por apresentarem este tipo de efeito, como ocorre no caso da apigenina, que é capaz de modular a expressão de p53 e p21 desencadeando diferentes mecanismos de morte celular (CHIANG et al., 2006), entretanto, na maioria dos casos, o mecanismo observado é morte celular por apoptose dependente de caspases (SHUKLA; GUPTA, 2010).

O produto natural fascaplisina (um flavonoide) é inibidor seletivo *in vitro* de várias quinases dependentes de ciclinas, porém o alvo principal desses compostos é a CDK4/CycD1 (SONI et al., 2000).

Compostos da classe dos oxindóis interrompem o ciclo celular via inibição da atividade de CDK2. Além disso, esses compostos previnem a alopecia que normalmente acontece durante a quimioterapia (DAVIS et al., 2001; BRAMSON et al., 2001).

Vários produtos naturais, especialmente de origem vegetal e marinha, continuam sendo estudados, considerando que essas amostras continuam sendo fonte em potencial de substâncias farmacologicamente ativas contra o câncer.

## **2.4 Óleos essenciais com potencial atividade antitumoral**

Entre os produtos naturais largamente investigados nas últimas décadas, destacam-se os óleos essenciais. Estes podem ser obtidos pelos métodos de enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (SIMÕES et al., 2004) de diferentes partes da planta (ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011). São provenientes do metabolismo secundário e são constituídos predominantemente por terpenos, mas muitos podem ser constituídos também por fenilpropenos (CSEKE et al., 2006).

Fisicamente, se apresentam no estado líquido a temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. O óleo obtido de uma planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos iguais qualitativamente, diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et al., 2005; EDRIS, 2007).

Desde a antiguidade esse tipo de derivado vegetal tem sido utilizado no tratamento de diversas afecções e na preparação de perfumes, como aditivos alimentares e para o controle de pragas agrícolas (ISMAN; MIRESMAILLI; MACHIAL, 2011). Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas a ele. Óleos essenciais de várias espécies vegetais têm mostrado atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral e antioxidante (RUFINO; PÉREZ-JIMÉNEZ; ARRANZ, 2010).

Diversos óleos essenciais e seus componentes aromáticos individuais já mostraram atividade supressora tumoral quando testados em um significativo número de linhagens tumorais humanas, incluindo glioma, câncer de cólon, câncer gástrico, tumor hepático, tumores pulmonares, câncer de mama, leucemia e outros (DEANGELIS, 2001; EDRIS, 2007).

O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), e o composto citral, seu principal constituinte, têm demonstrado importante propriedade antitumoral. (RABBANI; DEVI; SHIVANANDA, 2004; DUDAI et al., 2005; NEGRELLE; GOMES, 2007).

O  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno presentes no óleo essencial de *Cordia verbenacea* (MICHIELIN, 2009) possuem diversas atividades farmacológicas, como por exemplo, inibição da formação de edema, anti-inflamatória (SHIMIZU et al., 1990; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002) e anticarcinogênica (ALCÂNTARA et al., 2010). O espatulenol, obtido óleo do caule de *Licaria martiniana*, apresenta, por sua vez, moderada atividade citotóxica contra células do tipo kB (ALCÂNTARA et al., 2010). Relatos da literatura mostram ainda os efeitos de *Syzygium aromaticum*, conhecido popularmente como cravo da Índia, no combate ao câncer (CHAIEB et al., 2007). O óleo essencial de *S. aromaticum* possui atividade antimutagênica potencial, anticarcinogênica e ação citotóxica e apoptótica em linhagens de células tumorais humanas (PC-3 e Hep G2). Seu componente majoritário, o eugenol, também apresentou significativa atividade antitumoral (PAL et al., 2010).

O óleo essencial de *Croton micans* e de *Croton matourensis* são ricos em limoneno, espatulenol,  $\alpha$ -cadinol e  $\beta$ -elemeno, compostos de ação anticâncer reconhecida (COMPAGNONE et al., 2010). O limoneno apresenta potente atividade antitumoral, resultando na regressão de tumores em diferentes sítios orgânicos (MILLS et al., 1995; KAWAMORI et al., 1996; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006). O limoneno foi o primeiro monoterpene a ser testado como agente anticancerígeno e demonstrou atividade na prevenção do desenvolvimento de tumores e na regressão de carcinoma mamário em ratos (CHANDER et al., 1994).



Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais, já estando evidenciada a participação de vias apoptóticas nos efeitos tóxicos contra células tumorais produzidos por alguns óleos como, por exemplo, o óleo obtido de *Schinus molle* em células K562 (célula leucêmica) (DÍAZ et al., 2008) e àquele obtido de *Cymbopogon flexuosus* em células HL60 (leucemia humana) (SHARMA et al., 2009).

Uma alternativa promissora que vem sendo pesquisada para o tratamento de tumores sólidos é a utilização do álcool perfílico (AP). AP é um monoterpene isolado dos óleos essenciais de menta, cereja e sementes de aipo, dentre outras plantas (BELANGER, 1998; FISCHER et al., 2005). Estudos em animais mostram que o AP é um agente quimioterápico eficaz na regressão de tumores de mama (HAAG; LINDSTROM; GOULD, 1992; FISCHER et al., 2005), pâncreas (STARK et al., 1995; FISCHER et al., 2005), fígado (MILLS et al., 1995; FISCHER et al., 2005) e próstata (JEFFERS et al., 1995; FISCHER et al., 2005) e agente quimiopreventivo nos tumores de cólon (REDDY et al., 1997; FISCHER et al., 2005) melanomas (HE et al., 1997; FISCHER et al., 2005) e neuroblastomas (SHI; GOULD, 1995; FISCHER et al., 2005). AP atua na indução de apoptose de células tumorais sem afetar as células normais e pode reverter as células tumorais para um estágio diferenciado (BELANGER, 1998; FISCHER et al., 2005). A inibição da transdução de sinal através da membrana pelo AP resulta da não ancoragem da proteína Ras através da inibição de sua isoprenilação (FISCHER et al., 2005).

Estudos recentes, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que óleos essenciais obtidos de diferentes espécies podem apresentar efeito *in vitro* e *in vivo* contra células tumorais. O óleo essencial de *Xylopija langsdorffiana* demonstrou alta atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais humanas K-562 (leucemia) e moderada em células da linhagem NCI/ADR-RES (ovário resistente a múltiplos fármacos) e ainda atividade antitumoral *in vivo* em células tumorais murinas da linhagem sarcoma 180 (MOURA, 2012). Outra espécie do gênero, *Xylopija frutescens*, também apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em células tumorais malignas da linhagem S180 (LUNGUINHO, 2012).

Ainda, foi demonstrado que o óleo essencial obtido de *Lippia microphylla* apresentou atividade antitumoral *in vitro* em células da linhagem de sarcoma 180 e K562, e significativa atividade antitumoral *in vivo* na linhagem sarcoma 180 (XAVIER, 2011). Mais recentemente o óleo de *Croton polyandrus* apresentou atividade antitumoral *in vivo* frente células da linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich, induzindo parada do ciclo celular na fase G0/G1 e aumento da fração Sub-G1, o que sugere indução de morte celular por apoptose; e ainda

induziu aumento na média de sobrevida dos animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich (PESSOA, 2013).

Portanto, óleos essenciais obtidos de plantas são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas contra o câncer.

## **2.5 Toxicologia de produtos naturais**

Substâncias químicas não são consideradas totalmente seguras nem totalmente danosas. Seus efeitos estão relacionados com as suas concentrações no meio e seu tempo de permanência ou tempo de exposição sobre o organismo. Neste sentido os testes de toxicidade são aplicados para avaliar os efeitos adversos de compostos químicos e plantas medicinais em um organismo de forma padronizada, em condições replicáveis que permitam comparações com outros compostos testados (SILVEIRA, 2007).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparadas com as dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitoterápicos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Mesmo com o uso disseminado de plantas medicinais, as pesquisas que avaliam a toxicidade desses produtos são escassas (TUROLA; NASCIMENTO, 2006). Para melhor entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Portanto, o uso da medicina popular baseado no conhecimento tradicional não são suficientes para validar as plantas medicinais como alternativas terapêuticas eficazes e seguras (FARIAS et al., 2007).

As plantas medicinais podem causar reações adversas devido aos seus próprios constituintes, devido a interações com os medicamentos ou alimentos e ainda devido às características do paciente: idade, gênero, estado de saúde, estado nutricional e características genéticas (BALBINO; DIAS, 2010), sendo assim, faz-se necessário um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração dos derivados vegetais e do medicamento final (TUROLA; NASCIMENTO, 2006).

Como exemplos de efeitos tóxicos de plantas podem ser citados àqueles produzidos pelas espécies do gênero *Senecio* (BUCKEL, 1998), a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) e arnica (*Arnica montana* L.), que podem causar irritação gastrointestinal; o mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a trombeteira (*Datura suaveolens* Humb. & Bopl ex Willd.), que podem lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana câmara* L.), conhecido por sua hepatotoxicidade; a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), que causa distúrbios gastrintestinais (como diarreia grave) (SIMÕES et al., 1986; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005) e a arruda (*Ruta graveolens*) que pode provocar aborto, fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (GUIL; RODRIGUEZ-GARCIA; TORIJA, 1997). Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1983; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Outro caso importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L.). Esta planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos. Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcaloides, o uso do confrei foi condenado pela OMS (BUCKEL, 1998; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Deve-se ressaltar ainda que os óleos essenciais não são isentos de propriedades tóxicas, alguns também devem ser evitados, como exemplo, os óleos essenciais provenientes de bétula (*Betula alba*), cedro (*Cedrela brasiliensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjerição (*Origanum basilicum*), manjerona (*Majorana hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), rosa (*Rosa sp.*) e lavanda (*Lavanda angustifolia*). Neste último caso, deve-se evitar o consumo, especialmente nos primeiros meses de gravidez (DAVIS, 1996; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Pacientes epiléticos tratados com fenotiazínicos devem evitar o consumo de óleo de prímula (*Oenothera biennis*), que pode provocar um quadro de epilepsia do lóbulo temporal (PISCITELLI et al., 2002).

Diante do exposto, é evidente a importância da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais por meio de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia complementar segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanto

se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos sofreu modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elaborou normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a RDC n. 14 de 2010, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; BRASIL, 2010).

Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução Específica (RE) n. 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004). De acordo com esse guia, devem ser realizados ensaios para avaliação de toxicidade aguda (avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas), ensaios para avaliação de toxicidade de doses repetidas (avalia a toxicidade após exposição a doses repetidas, 28 dias - subcrônico - ou 13 semanas - crônico) e estudos sobre genotoxicidade, que devem ser efetuados quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos (BRASIL, 2004).

Ainda no que se refere à realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos de substâncias químicas, os critérios para a realização desses testes também estão bem especificados nas normas da *The Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) em “*OECD Guidelines for testing of chemicals*”, os quais são aceitos mundialmente e são referendados pelo GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE SEGURANÇA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS, publicado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia (GESEF) da ANVISA em 2010. Este guia é uma orientação para a condução de estudos não clínicos que incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (BRASIL, 2010).

Testes que avaliam a toxicidade aguda sistêmica são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em

órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a possível relação dose-resposta (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; COECKE et al., 2005; PRIETO, et al., 2006).

A toxicidade aguda é avaliada pela administração de uma única dose da amostra em teste ou de doses fracionadas ao animal, em um período não superior a 24 horas (BRASIL, 2010). Em seguida serão observados os efeitos sofridos pelo organismo decorrentes desse curto período de exposição. Sendo assim, a finalidade é determinar a dose de uma amostra que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos-teste sob condições controladas (RODRIGUES, 2007; BERNARDI et al., 2008). Os efeitos observados vão desde a letalidade até qualquer outra manifestação do organismo que a anteceda (JARDIM, 2004; MASSARO, 2006; RODRIGUES, 2007; BERNARDI et al., 2008), o que inclui a observação de efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC) e Autônomo (SNA) (ALMEIDA et al., 1999).

Quando uma substância química entra em um organismo, diversas respostas fisiológicas, hematológicas e bioquímicas podem ocorrer, as quais podem se adaptar ou conduzir para a toxicidade (BEGUM, 2005; BORGES, 2005; BORGES, 2007). Por isso, para avaliação de efeitos tóxicos vários trabalhos, envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam a avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos (BEZERRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como ureia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos, eritrograma, leucograma e plaquetograma. Adicionalmente, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são relevantes, pois analisam estrutura e função, em nível celular (BEZERRA et al., 2009).

Por motivos éticos e financeiros, a utilização de ensaios toxicológicos *in vitro* também é recomendada para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de prever o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO et al., 2003).

A estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um bom indicador de danos *in vitro* em triagens de citotoxicidade, já que as drogas podem alterar esta delicada estrutura, fornecendo um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias, sendo um possível indicador de dano às células (SHARMA; SHARMA, 2001). O teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos do organismo (APARICIO et al., 2005). Este

teste é empregado para a avaliação toxicológica de diferentes plantas (HARBELL et al., 1997; GANDHI; CHERIAN, 2000; LEE et al., 2001; LIMA et al., 2004).

Deve-se levar em consideração ainda a avaliação de uma potencial atividade tóxica das plantas sobre o material genético. Essa avaliação é de fundamental importância, pois muitos compostos presentes nas plantas possuem atividade tóxica que podem causar danos celulares ou genéticos. Tais danos podem afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos neoplásicos ou morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (COSTA; MENK, 2000). Os testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* são fundamentais para que as indústrias farmacêuticas deliberem um novo agente terapêutico (PURVES et al., 1995; BELCAVELLO et al., 2012).

Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste de micronúcleo em células da medula óssea ou sangue periférico de camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica como parte da avaliação de segurança de um produto (CHOY, 2001; MATEUCA et al., 2006, VALADARES et al., 2007).

Os micronúcleos são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e, assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas permanecendo no citoplasma das células interfásicas (HEDDLE et al., 1973; SUZUKI et al., 2008). Constituem-se em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Na telófase essas regiões cromossômicas são incluídas nas células filhas onde podem fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos pequenos secundários no citoplasma - os micronúcleos (SARTO et al., 1987; MEIRELES, 2012).

O ensaio do micronúcleo é capaz de detectar tanto clastogenicidade (quebra de cromossomos) quanto aneugenicidade (aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), decorrentes de disfunções no aparato mitótico (MACGREGOR et al., 1987; BELCAVELLO et al., 2012). Há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e em humanos (AZEVEDO et al., 2003).

Embora as células alvo da medula óssea e do sangue periférico sejam as mesmas, os eritroblastos, o método desenvolvido para o sangue periférico oferece vantagens como o fato das células nesse tecido serem mais uniformes e mais facilmente analisadas quando comparadas as da medula óssea (CSGMT, 1995). Além disso, o teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico dispensa o árduo trabalho de coleta de medula

óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006). Quando o baço sequestra as células micronucleadas em sangue periférico, o ensaio tem que ser realizado em medula, entretanto, em camundongos isso não acontece, visto que o baço desses animais não tem a capacidade de sequestrar as células micronucleadas e, por isso, pode-se usar sangue periférico (FREIRE, 2012; OECD, 1997).

Evidencia-se assim a importância do estudo da toxicidade de drogas candidatas a agentes farmacológicos, principalmente àquelas derivadas de produtos naturais, especialmente na área da quimioterapia antineoplásica, considerando a semelhança entre células normais e neoplásicas.

## **2.6 *Hyptis umbrosa*: família, gênero e espécie**

A família Lamiaceae é composta por ervas, arbustos e árvores, com aproximadamente, 300 gêneros e 7500 espécies, possuindo uma distribuição cosmopolita, mas centrada, principalmente, na região mediterrânea, onde constitui parte integrante da vegetação. No Brasil ocorrem 28 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

As espécies desta família acumulam substâncias com grande diversidade estrutural, tais como esteroides, flavonoides, iridoides e terpenoides, incluindo os triterpenos pentacíclicos (ESEQUIVEL et al., 1996). Há relatos de algumas espécies da família, como *Ruta graveolens* L. e *Mentha pulegium* L., serem utilizadas para o tratamento de doenças do sistema respiratório mais recorrentes como gripe ou resfriado e bronquite (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; POLLIO et al., 2008; PHILANDER, 2011).

A família Lamiaceae é conhecida em todo o mundo pelo aroma que suas plantas exalam. Elas produzem essências, e por isso podem ser consideradas plantas aromáticas por excelência, sendo as essências e seus componentes os principais produtos do metabolismo secundário (FONT QUER, 1990). Por isso, muitas espécies de diferentes gêneros dessa família são importantes para extração de óleos essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Marrubium*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, *Hyptis* etc.), tanto para uso cosmético, como condimentar, aromático e/ou medicinal. Há ainda o uso caseiro de várias espécies, tanto para chás, condimentos e uso medicinal com as mais diversas propriedades (FALCÃO; MENEZES, 2003).

O gênero *Hyptis* encontra-se inserido nessa família, sendo composto por ervas, arbustos ou raramente árvores pequenas, possuindo aproximadamente 580 espécies. Muitas dessas espécies apresentam grande importância econômica e etnofarmacológica, principalmente pelos seus óleos essenciais, pois são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que conferem aos alimentos (MENEZES, 1994) e utilizadas para diversos fins medicinais, não só no Brasil (BARBOSA; RAMOS, 1992; OLIVEIRA et al., 2011).

Esse gênero possui espécies exclusivamente neotropicais, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. Algumas espécies invasoras são bem estabelecidas na Ásia, África e norte da Austrália. O centro da diversidade do gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (BORDIGNON, 1990).

Várias espécies desse gênero são aromáticas e usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios digestivos, dor, problemas gastrintestinais, e infecções da pele (MORAI et al., 2005). Muitas propriedades farmacológicas do gênero *Hyptis* têm sido relatadas como atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2004), antiúlcera (BARBOSA; RAMOS, 1992), larvicida (COSTA et al., 2005), antidepressiva (BUENO et al., 2006), anti-inflamatória e antinociceptiva (BISPO; MOURÃO; FRANZOTTI, 2001; FALCÃO et al., 2005). Um estudo recente demonstrou que o extrato aquoso de *H. mutabilis* possui atividade antitumoral promissora contra sarcoma 180 (tumor murino), e o mesmo não apresentou efeito adverso detectável nem alterações histopatológicas foram observadas após sete dias de tratamento. Foi observado ainda que o extrato hexânico dessa espécie mostrou moderada inibição do tumor sólido de Ehrlich, sendo essa, uma espécie promissora para o tratamento do câncer (XIMENES et al., 2013).

Apesar da predominância de óleos essenciais como produto do metabolismo de plantas do gênero *Hyptis*, também há relatos de constituintes como alcaloides, apenas o (R)-5-hidroxi-pirrolidina-2-ona foi isolado da *H. verticillata* (KHUNT; RIMPLER; HEINRICH, 1994), e alguns derivados fenólicos, como o ácido p-metoxicinâmico (MESSANA et al., 1990), fenilpropanoides glicosilados, ácido clorogênico, ácido protocatequínico, hidroquinona e timohidroquinona (PEDERSEN, 2000), foram encontrados na espécie *H. salzmanii*.

A espécie *Hyptis umbrosa* Salzm. (Figura 1), conhecida popularmente por “aleluia do serrote” (SILVA; ANDRADE, 2004) e “alfazema-do-mato” (FERNANDES, 1998) trata-se de uma planta com hábito perene/anual e na forma subarborescente. As partes mais utilizadas desta espécie são as folhas e as flores. Sua indicação terapêutica específica na medicina popular é



**ROLIM, T. L.**

no tratamento das moléstias do estômago, nas dores de cabeça, como expectorante, carminativa, tônica e sudorífera (MATOS, 1999).

Essa espécie é pouco relatada na literatura tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico. Estudos fitoquímicos demonstram o isolamento do ácido ursólico e seu derivado 2 $\alpha$ -hidroxilado (MATIDA; ZELNIK; PANIZZA, 1986), de uma quinona e um diterpeno nomeado umbrosone, o qual demonstrou significativa atividade antimicrobiana (MONACHE et al., 1990).

Portanto, um dos pontos importantes desse trabalho está no fato da espécie apresentar poucos estudos do ponto de vista científico, tanto químico quanto farmacológico, fazendo com que essa espécie possa servir de protótipo produtor de moléculas para aplicações farmacológicas.



**Figura 1** - Partes aéreas de *Hyptis umbrosa* Salzm. Fonte: Josean Fechine

O óleo essencial obtido das partes aéreas de *Hyptis umbrosa* foi identificado pela análise em CG-EM (Cromatografia Gasosa em Espectrometria de Massa) e CG-FID (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama) e foi possível identificar 59 componentes, correspondendo a 75,5%. Os constituintes majoritários foram a fenchona (24,8%), cubebol (6,9%), limoneno (5,4%),  $\alpha$ -cadieno (4,7%),  $\beta$ -cariofileno (4,6%) e espatulenol (4,5%) como mostrado na Tabela 2 (Dados não publicados).

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de *Hyptis umbrosa*

SUBSTÂNCIAS	(% relativa)
Fenchona	24,8
Cubebol	6,9
Limoneno	5,4
$\alpha$ -cadinol	4,7
$\beta$ -cariofileno	4,6
Espatuleno	4,5
Dauca-5,8-dieno	2,4
$\alpha$ -humuleno	2,2
$\delta$ -elemeno	2,0
Acetato de bornila	1,9
$\delta$ -cadineno	1,8
Elemol	1,8
Biciclogermacreno	1,7
Epi- $\alpha$ -muurolol	1,4
$\alpha$ -felandreno	1,3
Epi- $\alpha$ -cadinol	1,1
$\gamma$ -cadineno	1,0
$\beta$ -elemeno	0,8
Germacreno D	0,8
Canfora	0,7
$\alpha$ -gurjuneno	0,7
$\alpha$ -muuroleno	0,6
$\alpha$ -terpineol	0,5
$\gamma$ -elemeno	0,5
<i>trans</i> -cadin-1(6),4-dieno	0,5
10-epi- $\gamma$ -eudesmol	0,5
Mirceno	0,4
4-terpineol	0,4
globulol	0,4
$\alpha$ -muurolol	0,4
Shiobunol	0,4
Endo-fenchol	0,3
<i>Trans</i> -muurola-3,5-dieno	0,3
Óxido de cariofileno	0,3
$\gamma$ -muuroleno	0,3
Ledol	0,3
Palustrol	0,2
Linalol	0,2
Borneol	0,2
10-epi- $\beta$ -acoradieno	0,2
$\alpha$ -guaieno	0,2
$\gamma$ -gurjuneno	0,2
$\beta$ -selineno	0,2
$\alpha$ -cadineno	0,2
<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	0,2
Epóxido de humuleno II	0,2
1,10-di-epi-cubebol	0,2

ROLIM, T. L.

Epóxido de aloaromadendreno	0,2
$\alpha$ -fencheno	0,1
$\gamma$ -terpineno	0,1
Terpinoleno	0,1
Butanoato de 3-metil-2-butenil 2-	
metil	0,1
Geraniol	0,1
$\alpha$ -cubebeno	0,1
$\alpha$ -copaeno	0,1
$\alpha$ -calacoreno	0,1
$\alpha$ -pineno	0,1
Viridiflorol	0,1
Guaíol	0,1
<b>Totais identificados</b>	<b>75,5</b>

---

**ROLIM, T. L.**

**OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e a atividade antitumoral do óleo essencial das partes aéreas de *Hyptis umbrosa* (O.E.H.) e da fenchona, seu componente majoritário.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do O.E.H. e da fenchona em eritrócitos de camundongos, bem como em linhagem de células não tumorais (HaCat);
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do O.E.H. em camundongos;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do O.E.H. e da fenchona em diferentes linhagens de células tumorais humanas;
- Avaliar a viabilidade das células tumorais retiradas da cavidade peritoneal dos animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com O.E.H. ou fenchona;
- Investigar o possível mecanismo de ação do O.E.H. e da fenchona na apoptose e ciclo celular;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do O.E.H. e da fenchona pela avaliação de parâmetros bioquímicos, hematológicos, análise anatomopatológica de órgãos vitais, consumo de água e ração, e evolução ponderal em camundongos transplantados;
- Avaliar o efeito do O.E.H. e da fenchona na sobrevida dos animais inoculados com tumor de Ehrlich;
- Avaliar a genotoxicidade do O.E.H. pelo Teste do Micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

**ROLIM, T. L.**

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George localizados no Centro de Biotecnologia (CBiotec), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB). Os ensaios de citotoxicidade com Sulforrodamina B foram realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

### 4.2 Material

#### 4.2.1 Material botânico

O material vegetal, partes aéreas de *Hyptis umbrosa*, foi coletado no município de Maturéia, Estado da Paraíba, em agosto de 2009, e identificado pela botânica Profa Dra. Maria de Fátima Agra do PPgPNSB/CCS/UFPB. Uma exsicata dessa espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob o registro de coleta AGRA 6964.

#### 4.2.2 Óleo essencial de *Hyptis umbrosa*

Para a obtenção do óleo essencial de *Hyptis umbrosa* (O.E.H.) o material vegetal, logo após a coleta, foi triturado e submetido à extração pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger utilizando seis litros de água destilada em balão de vidro (capacidade 12,0 L), aquecida em manta aquecedora, mantendo-se a temperatura de ebulição por quatro horas. O material resultante foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar, e mantido em temperatura inferior a 4 °C.

O.E.H. foi gentilmente fornecido pelos colaboradores da fitoquímica, Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares (PPgPNSB/CCS/UFPB).

#### 4.2.3 Animais

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32g, com faixa etária aproximada de oito semanas, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1$  °C), em ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à comida (pellets de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram mantidos no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do CBIotec/UFPB (CEUA), sob a certidão N° 0510/11.

#### 4.2.4 Linhagens de células tumorais

Para os ensaios *in vitro* com a Sulforrodamina B (SRB), foram utilizadas diferentes linhagens de células tumorais humanas, como listado na Tabela 3. As linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos e mantidas no CPQBA/UNICAMP.

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foi usada a linhagem de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP). As células são mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus musculus*) no Biotério Prof. Thomas George, sendo realizado repique semanal.



**Tabela 3** - Densidade de inoculação das linhagens celulares nos ensaios de atividade antitumoral *in vitro* com a Sulforrodamina B.

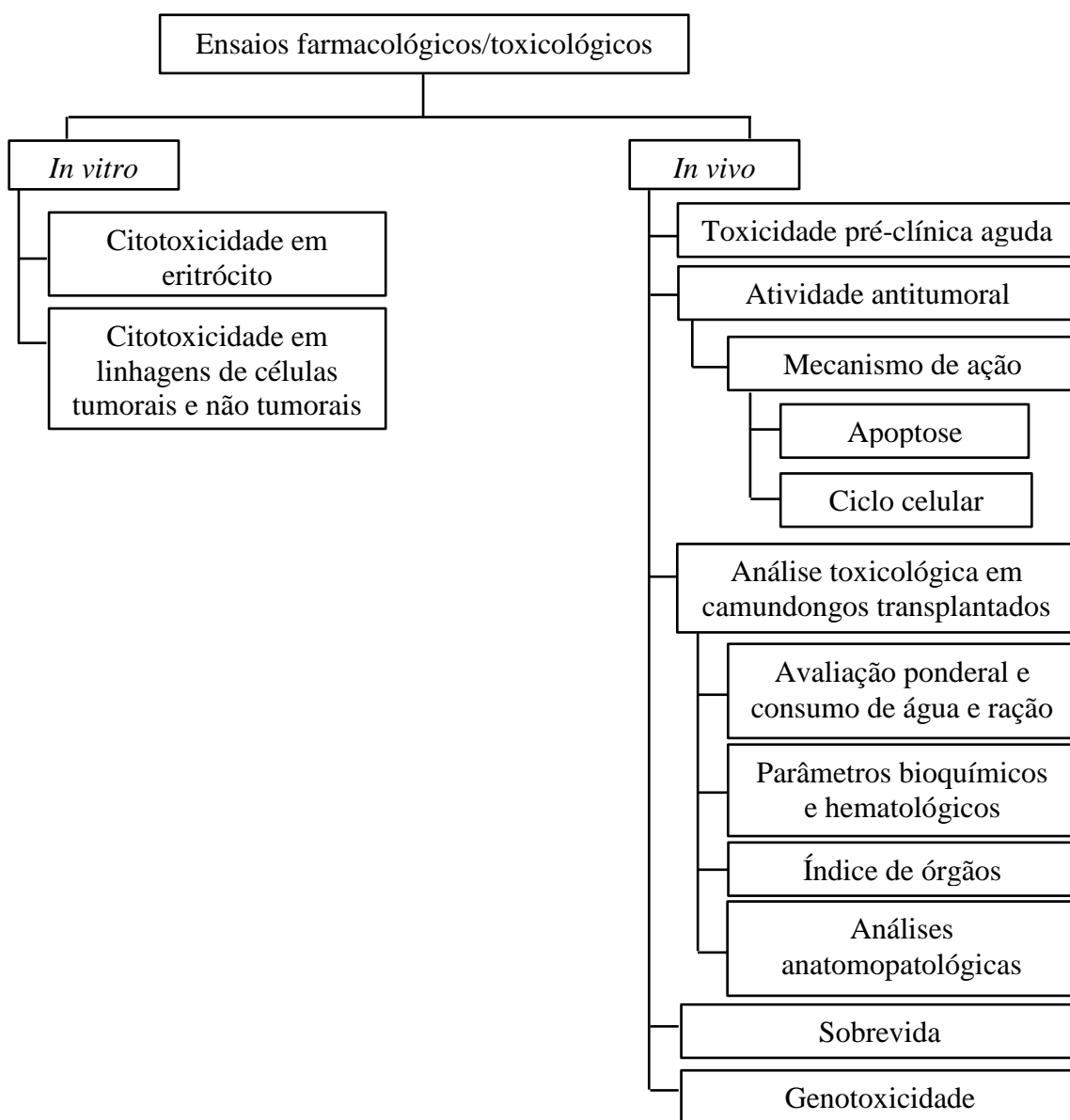
<b>Linhagem</b>	<b>Órgão/Doença</b>	<b>Origem Embrionária</b>	<b>Densidade de Inoculação (10<sup>4</sup> cel/mL)</b>
U251	SNC; glioma	Ectoderme	4,0
UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme	4,0
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme	6,0
*NCI-ADR/RES	Ovário; adenocarinoma	Ectoderme	5,0
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme	5,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme	4,0
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme	4,5
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme	7,0
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme	5,0
K562	Medula óssea; Leucemia mieloide crônica	Mesênquima	6,0
HaCaT	Pele	Ectoderme	5,0
CHO	(queratinócito)/Normal Ovário de Hamster Chinês	Ectoderme	5,0

\* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

### 4.3 Métodos

Foram utilizados métodos *in vitro* e *in vivo* para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral do O.E.H. e da fenchona, segundo o fluxograma a seguir.

**Fluxograma 1** - Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.



#### 4.3.1 Ensaios *in vitro*

##### 4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi diluído em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O.E.H. ou fenchona foram solubilizados em DMSO (5%) e preparados em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles positivo e negativo foram realizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH<sub>50</sub> (concentração que produz 50% de hemólise) do O.E.H. e da fenchona.

##### 4.3.1.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do O.E.H. e da fenchona pelo método da sulforrodamina B, foram utilizadas as linhagens de células listadas na Tabela 2, as quais foram semeadas, em meio RPMI-1640 suplementado (25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal - SBF). As células foram incubadas com diferentes concentrações do O.E.H. ou da fenchona: 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, em quadruplicata (em 0,5% de DMSO). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 48 h de incubação, o experimento foi interrompido pela fixação das

células via adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. As placas foram incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse período, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água para a remoção dos resíduos de TCA, meio de cultura e SBF, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. As células foram então coradas com 50 µL/compartimento de sulforradamina B (SRB) a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%, por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas por três vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em leitor de microplacas a 540 nm (SKEHAN; STORENG; SCUDIERO, 1990).

Foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste. Os valores abaixo de 50% de crescimento celular e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática). Os valores negativos, abaixo de zero, representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células aferida pela absorbância no final do experimento, nesse caso, é menor da que iniciou o experimento. Os resultados para a doxorrubicina e O.E.H. foram ainda expressos como GI50 (*Growth inhibition*)

#### **4.3.2 Ensaios *in vivo***

##### **4.3.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda**

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 (Anexo 1).

Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 300 e 2000 mg/kg do O.E.H. intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 5% de Tween 80). O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a amostra a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL<sub>50</sub> (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS (Anexo 1).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do O.E.H. por via intraperitoneal (i.p.), foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB e descrito por Almeida et al (1999). Desde a 24<sup>a</sup> hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observados o consumo de água e alimentos pelos animais de todos os grupos. A evolução ponderal foi avaliada através da diferença de peso no início e no final do experimento.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por deslocamento cervical e autopsiados. Os órgãos, fígado, rins, coração, timo e baço foram removidos e pesados. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

#### **4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich**

As células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram implantadas ( $2 \cdot 10^6$  células/animal) na cavidade peritoneal de camundongos fêmeas (n=12). Vinte e quatro horas após o implante das células, O.E.H. (50, 100 ou 150 mg/kg) ou fenchona (30 ou 60 mg/kg) foram solubilizados em Tween 80 (5%) e administrados (i.p.) durante nove dias. 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg, foi usado como controle positivo. Ao grupo controle negativo foi administrado uma solução de 5% de Tween 80. Foi utilizado ainda um sexto grupo (controle sadio), cujos animais (n=6) permaneceram nas mesmas condições experimentais dos outros grupos, porém não foram transplantados com as células tumorais (Carcinoma de Ehrlich).

No dia seguinte após a administração da última dose, seis animais de cada grupo foram anestesiados para coleta de sangue e análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Os animais foram então eutanasiados, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal, e o volume do líquido foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para contagem das células viáveis e não-viáveis, pelo ensaio de exclusão do azul de tripan, no qual foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante. As células foram então analisadas em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de

**ROLIM, T. L.**

tripan, permitindo assim, a quantificação do número de células viáveis (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

O peso do tumor foi determinado pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expresso em gramas (g).

Adicionalmente, seis animais de cada grupo foram mantidos vivos para a avaliação da sobrevida de animais experimentais (DOLAI et al., 2012).

#### **4.3.2.2.1 Análise e quantificação da apoptose**

A capacidade do O.E.H. ou da fenchona produzir apoptose das células tumorais de carcinoma de Ehrlich presentes no líquido ascítico de camundongos transplantados foi avaliada utilizando-se o *kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Sigma-Aldrich®, EUA), segundo recomendações do fabricante. As células coletadas da cavidade peritoneal de camundongos dos diferentes grupos, após tratamento de nove dias com O.E.H. ou fenchona, foram lavadas e ressuspensas em solução de HBSS estéril de modo a se obter uma concentração final de  $1 \times 10^6$  células/mL. Numa alíquota contendo esta densidade de células, foram adicionados 300  $\mu$ L do tampão de ligação (HEPES/NaOH 100 mM, NaCl 1,4 M,  $\text{CaCl}_2$  25 mM), 2,5  $\mu$ L de Anexina -V FITC e 5  $\mu$ L de solução iodeto de propídeo - IP (100  $\mu$ g/mL em 10 mM de  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , contendo 150 mM de NaCl). A suspensão foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo (FacsCalibur®, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram tratados no programa WinMDI versão 2.9.

#### **4.3.2.2.2 Análise do ciclo celular**

Para a análise do ciclo celular, uma alíquota de células foi retirada do líquido ascítico dos animais dos diferentes grupos, após nove dias de tratamento com O.E.H. ou fenchona. As células foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) e a concentração ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL. Em seguida,  $1 \times 10^6$  células/mL foram transferidas para um tubo de poliestireno e centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300  $\mu$ L da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100 0,1% (p/v)] (Sigma-Aldrich® – T-8787, EUA), 50  $\mu$ g/mL de PI e água Milli-Q (volume final = 50 mL) e as células foram incubadas durante quatro horas, a 4°C, ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em citômetro

**ROLIM, T. L.**

de fluxo (FacsCalibur®, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram tratados no programa WinMDI versão 2.9.

#### **4.3.2.2.3 Sobrevida**

Seis animais de cada grupo foram mantidos vivos, com água e ração *ad libitum* e acompanhados diariamente para a avaliação do percentual da sobrevida dos animais transplantados com o tumor ascítico de Ehrlich, determinando assim o tempo de sobrevivência médio, com base na percentagem de dias de sobrevivência dos animais, comparados com o grupo controle (DOLAI et al., 2012).

#### **4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich**

##### **4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração**

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com O.E.H. ou fenchona, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e ração.

##### **4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos**

No dia seguinte após administração da última dose, após jejum de quatro horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico, 50 mg/kg, e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, AST e ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (*Roche Diagnostic System*) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas

**ROLIM, T. L.**

automaticamente no HEMATEL 200<sup>®</sup> e analisadas em microscópio óptico TAIMIN<sup>®</sup>, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

#### **4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos**

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) extirpados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

#### **4.3.2.3.4 Análises anatomopatológicas**

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático (LEIKA<sup>®</sup>), os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Marson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os procedimentos descritos foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Maria Salete Trigueiro de Araújo e o registro fotomicrográfico foi realizado no Laboratório Virchow<sup>®</sup>, sediado em João Pessoa/PB, em microscópio triocular Leica ATC 2000<sup>®</sup>, acoplado a um sistema de transmissão de vídeo-imagem com placa de captura Wonder.

#### **4.3.2.4 Avaliação da genotoxicidade**

Para o ensaio do micronúcleo, grupos de cinco camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas foram intraperitonealmente tratados com duas diferentes doses do O.E.H. (150 e 300 mg/kg). Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 5%) foram incluídos. Após 48 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico, 50 mg/kg, e amostras de sangue periférico foram coletadas



pelo plexo orbital, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov<sup>®</sup>) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

#### 4.3.3 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro* com células tumorais, foram realizados pelo menos três experimentos em quatro replicatas. Os valores de CH<sub>50</sub> foram determinados graficamente a partir das curvas concentração resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95 %.

Para a curva concentração dose resposta para cada linhagem celular, a Taxa de Inibição de Crescimento (*Growth Inhibition*, GI) foi determinada através de regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando software específico, Graphpad Prism 5.0.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* tiveram seus valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t* não pareado, para análise de duas amostras, teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas amostras, seguido do teste de *Tukey* (para variáveis paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

A análise estatística da sobrevida dos animais foi realizada por ANOVA e as curvas de sobrevivência foram analisadas pelo modelo de avaliação não paramétrica de Kaplan-Meier.

**ROLIM, T. L.**

**RESULTADOS**

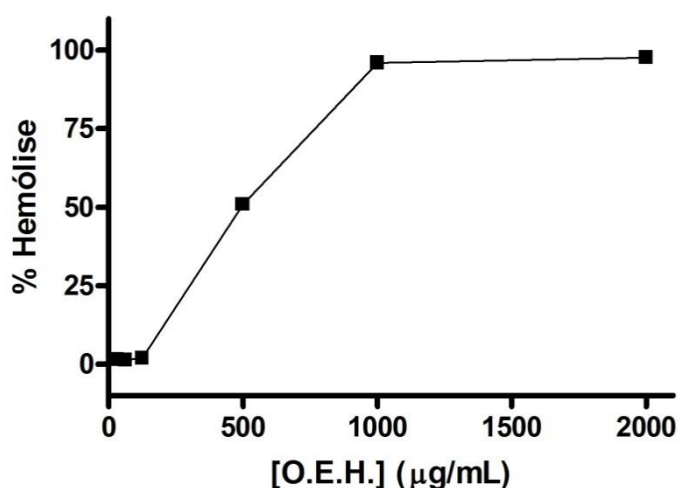
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaios *in vitro*

#### 5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

No ensaio de avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos observou-se que a porcentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com o óleo essencial. O valor de  $CH_{50}$  obtido foi de 494,9 (494,2 - 495,6)  $\mu\text{g/mL}$  (Gráfico 1).

O tratamento com a fenchona, até a concentração de 3000  $\mu\text{g/mL}$ , não causou citotoxicidade em eritrócitos.



**Gráfico 1-** Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com O.E.H. ( $\mu\text{g/mL}$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos em triplicata, com intervalo de confiança de 95%.

#### 5.1.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas

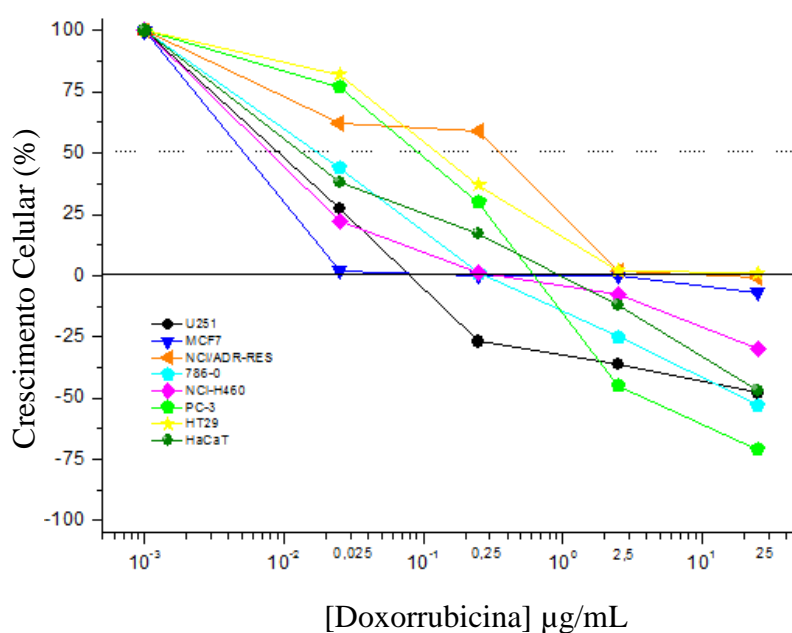
Os gráficos 2, 3 e 4 representam a avaliação da atividade citotóxica da doxurribicina, O.E.H e fenchona, respectivamente, em cultura de células tumorais humanas e em uma linhagem de células não tumorais (HaCat).

**ROLIM, T. L.**

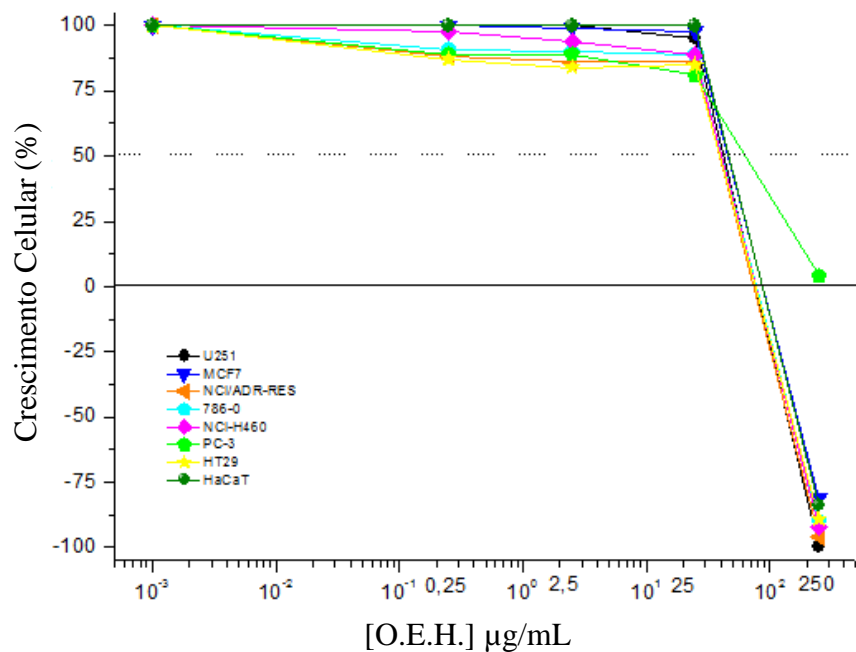
Como esperado, a doxorrubicina apresentou efeito citotóxico, para todas as linhagens celulares, em todas as concentrações testadas (gráfico 02). Os valores de  $GI_{50}$  variaram de 0,13 a 0,085  $\mu\text{g/mL}$  na diferentes linhagens testadas.

Os resultados mostram que o O.E.H. possui efeito citotóxico para a maioria das linhagens celulares utilizadas apenas na maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ) (gráfico 03). Os valores de  $GI_{50}$  variaram de 30,6 a 52,6  $\mu\text{g/mL}$  na diferentes linhagens testadas.

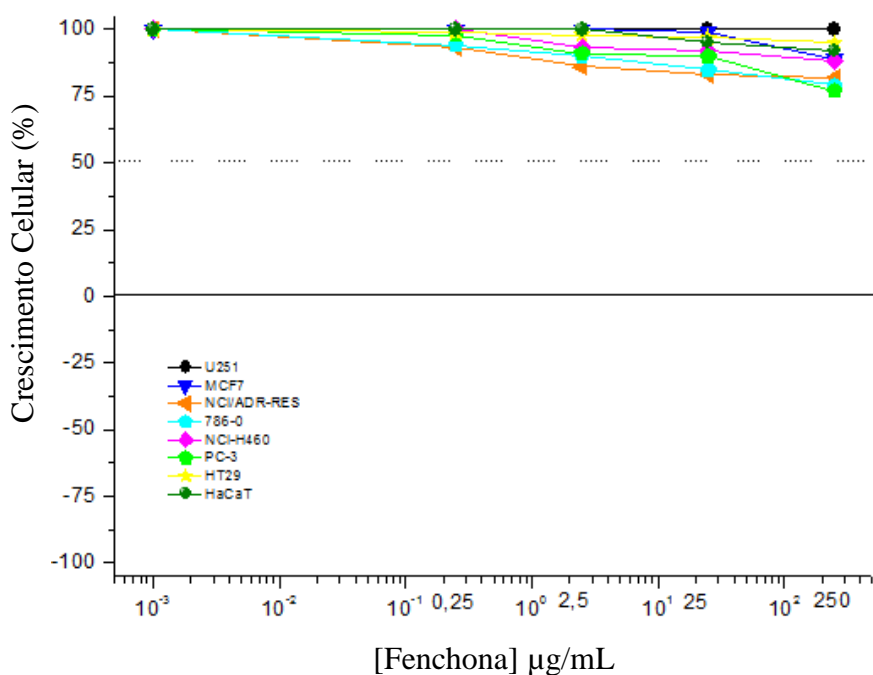
A fenchona não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (gráfico 04).



**Gráfico 2-** Atividade antitumoral da doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração da doxorrubicina. **U251** – glioma; **MCF-7** – mama; **NCI/ADR-RES**- ovário resistente a múltiplos fármacos; **786-0** – rim; **NCI-H460** – pulmão; **PC-3** – (próstata); **HT29** – cólon; **HaCat** – pele (linhagem de células não tumorais).



**Gráfico 3-** Atividade antitumoral do O.E.H. em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração do óleo. Legenda: **U251** – glioma; **MCF-7** – mama; **NCI/ADR-RES-ovário resistente a múltiplos fármacos**; **786-0** – rin; **NCI-H460** – pulmão; **PC-3** – (próstata); **HT29** – cólon; **HaCaT** – pele (linhagem de células não tumorais).



**Gráfico 4-** Atividade antitumoral da fenchona em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração da fenchona. Legenda: **U251** – glioma; **MCF-7** – mama; **NCI/ADR-RES-ovário resistente a múltiplos fármacos**; **786-0** – rin; **NCI-H460** – pulmão; **PC-3** – (próstata); **HT29** – cólon; **HaCaT** – pele (linhagem de células não tumorais).

## 5.2 Ensaios *in vivo*

### 5.2.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

#### 5.2.1.1 Avaliação comportamental e estimativa da DL<sub>50</sub>

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi evidenciado que o tratamento com 2000 mg/kg do O.E.H. induziu morte em todos os animais experimentais, enquanto que o tratamento com 300 mg/kg não provocou mortes, como mostrado na Tabela 4. O valor de DL<sub>50</sub> foi estimado, segundo o guia OECD 423 (Anexo 1) em torno de 500 mg/kg.

Ainda, foram observados alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Tabela 4). Foram observados leves efeitos excitatórios sobre o SNC, de curta duração, como hiperatividade, na menor dose (300 mg/kg) e tremores e convulsões, na maior dose (2000 mg/kg), assim como efeitos depressores sobre o SNC (ataxia, perda do reflexo corneal e perda do reflexo auricular) na dose de 2000 mg/kg. Esses efeitos estimulantes e depressores se manifestaram durante todo o período de observação e apareciam como precursores nos eventos de óbito, especialmente as convulsões e cianose.

**Tabela 4** - Efeitos da administração i.p. de doses únicas do O.E.H. em camundongos.

Grupo	M/T	Sintomas
Controle	0/3	Nenhum
300 mg/kg Experimento 1	0/3	Constipação e micção diminuída
300 mg/kg Experimento 2	0/3	Micção diminuída, vocalização e hiperatividade
2000 mg/kg	3/3	Tremores, convulsões, ataxia, perda do reflexo corneal e auricular, cianose, perda do tônus muscular e sem força para agarrar

M/T – morte/tratado

#### 5.2.1.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Na Tabela 5 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que, após tratamento com dose única do O.E.H., não houve alteração no consumo de água, ração e peso corporal nos dois experimentos realizados com a dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle.

Esses parâmetros não puderam ser avaliados na dose de 2000 mg/kg devido a morte dos animais experimentais.

**Tabela 5** - Efeitos do tratamento agudo com O.E.H. (300 mg/kg) na avaliação ponderal e consumo de água e ração dos camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	--	24,29 ± 1,72	25,91 ± 2,47	29,80 ± 1,04	34,00 ± 0,51
O.E.H.	300	21,43 ± 1,60	21,01 ± 2,11	30,33 ± 0,43	33,57 ± 0,98
O.E.H.	300	22,86 ± 1,13	19,44 ± 2,04	28,33 ± 0,18	31,20 ± 0,60

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

### 5.2.1.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a eutanásia, os órgãos foram removidos e pesados. Nenhuma alteração significativa no índice do coração, fígado, rins, timo e baço foi observada entre os grupos de animais controle e tratados com O.E.H. nos dois experimentos realizados com a dose de 300 mg/kg (Tabela 6).

**Tabela 6** - Efeitos do tratamento agudo do O.E.H. nos índices dos órgãos de camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle	--	3,63 ± 0,10	60,50 ± 0,81	10,76 ± 0,69	4,04 ± 0,22	6,30 ± 0,86
O.E.H.	300	4,19 ± 0,41	59,91 ± 2,72	13,12 ± 1,31	3,55 ± 0,11	7,39 ± 0,07
O.E.H.	300	4,26 ± 0,06	57,60 ± 0,69	11,54 ± 0,40	3,83 ± 0,35	6,09 ± 0,28

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Comparado com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

## **5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich**

### **5.2.2.1 Volume celular, peso do tumor e viabilidade celular**

Camundongos transplantados com células de carcinoma de Ehrlich foram tratados intraperitonealmente com O.E.H. (50, 100 ou 150 mg/kg) ou fenchona (30 ou 60 mg/kg), por nove dias, para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

Os dados de viabilidade celular, volume (mL) e peso (g) dos tumores dos animais tratados com O.E.H. e fenchona estão apresentados na Tabela 7.

Significante redução de todos os parâmetros foi observada nos grupos tratados com o óleo essencial (100 ou 150 mg/kg) e também com o 5-FU, droga padrão (25 mg/kg), quando comparados ao controle transplantado. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com O.E.H. (50 mg/kg) quando comparado ao grupo controle.

O ensaio também foi realizado com a fenchona, componente majoritário do O.E.H.. Foram observadas diferenças entre os parâmetros viabilidade celular, volume e peso do tumor dos animais do grupo tratado com essa substância apenas na maior dose (60 mg/kg), em comparação com o controle transplantado.



**Tabela 7** - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona na viabilidade celular, volume tumoral e peso dos tumores de carcinoma ascítico de Ehrlich, em camundongos após nove dias de tratamento.

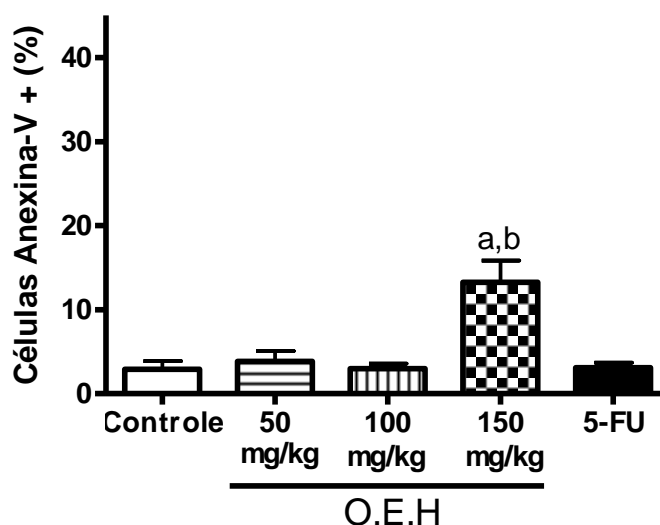
Grupos	Dose (mg/kg)	Viabilidade celular ( $\times 10^6$ cél./mL)	Volume tumoral (mL)	Peso tumoral (g)
Controle	----	$339,8 \pm 46,37$	$7,64 \pm 0,64$	$11,94 \pm 0,86$
5-FU	25	$8,45 \pm 2,31^a$	$0,09 \pm 0,02^a$	$2,30 \pm 0,09^a$
O.E.H.	50	$120,1 \pm 18,92$	$4,91 \pm 2,17$	$12,13 \pm 1,36$
O.E.H.	100	$4,40 \pm 1,80^a$	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,78 \pm 0,37^a$
O.E.H.	150	$6,94 \pm 4,13^a$	$0,03 \pm 0,02^a$	$1,30 \pm 0,22^a$
Fenchona	30	$228,0 \pm 39,94$	$5,50 \pm 1,00$	$8,43 \pm 0,98$
Fenchona	60	$10,85 \pm 4,14^a$	$0,82 \pm 0,55^a$	$3,90 \pm 0,93^a$

Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de seis animais.

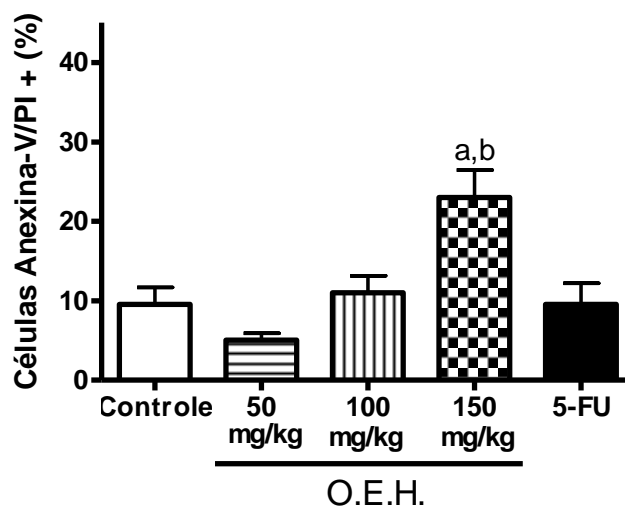
<sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

### 5.2.2.2 Análise e quantificação da apoptose

Após análise da marcação celular por citometria de fluxo, foi possível observar que o tratamento com O.E.H. na dose de 150 mg/kg induziu aumento significativo na porcentagem de células de carcinoma de Ehrlich marcadas com Anexina V-FITC (Gráfico 5) e Anexina V-FITC e IP (Gráfico 6), em comparação com o controle. Após o tratamento com O.E.H. (50, 100 ou 150 mg/kg) a porcentagem de células em apoptose inicial foi de 3,84%, 2,91% e 13,25%, respectivamente. Adicionalmente, a porcentagem de células em apoptose tardia/necrose foi de 5,03%, 11,01% e 23,02%, respectivamente.

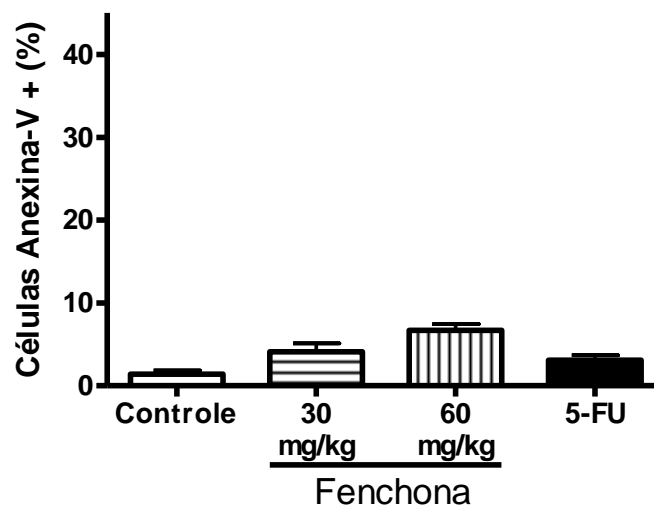


**Gráfico 5** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose inicial (Anexina-V+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (50 mg/Kg), O.E.H. (100 mg/Kg), O.E.H. (150 mg/kg) ou 5-FU (25 mg/Kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey). <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo tratado com 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

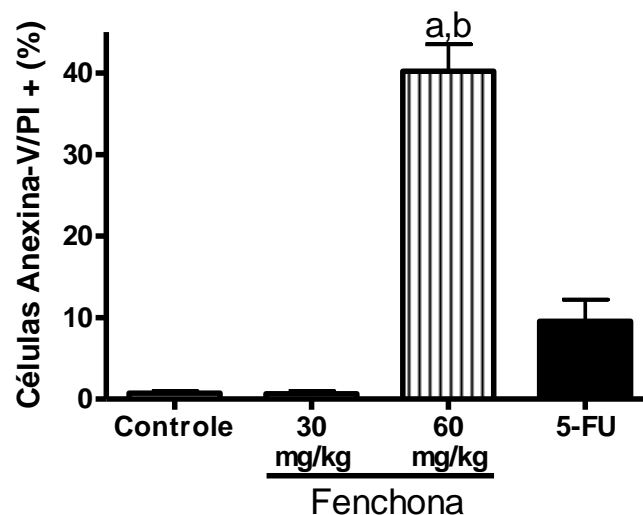


**Gráfico 6** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose (Anexina-V+/PI+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (100 mg/Kg) ou O.E.H. (150 mg/kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey). <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo tratado com 100 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey.

O tratamento com fenchona na dose de 60 mg/kg induziu aumento significativo na porcentagem apenas nas células de carcinoma de Ehrlich marcadas com Anexina V-FITC e PI (Gráfico 8), em comparação com o controle. Após o tratamento com fenchona (30 ou 60 mg/kg) a porcentagem de células em apoptose inicial foi de 4,10% e 6,69%, respectivamente. Adicionalmente, a porcentagem de células em apoptose tardia/necrose foi de 0,66% e 40,20%, respectivamente.



**Gráfico 7-** Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose inicial (Anexina-V+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/Kg) ou fenchona (60 mg/kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey). <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo tratado com 100 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey.



**Gráfico 8 -** Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich em apoptose tardia/necrose (Anexina-V+/PI+) após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/Kg) ou fenchona (60 mg/kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey). <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo tratado com 100 mg/kg por ANOVA seguido de Tukey.

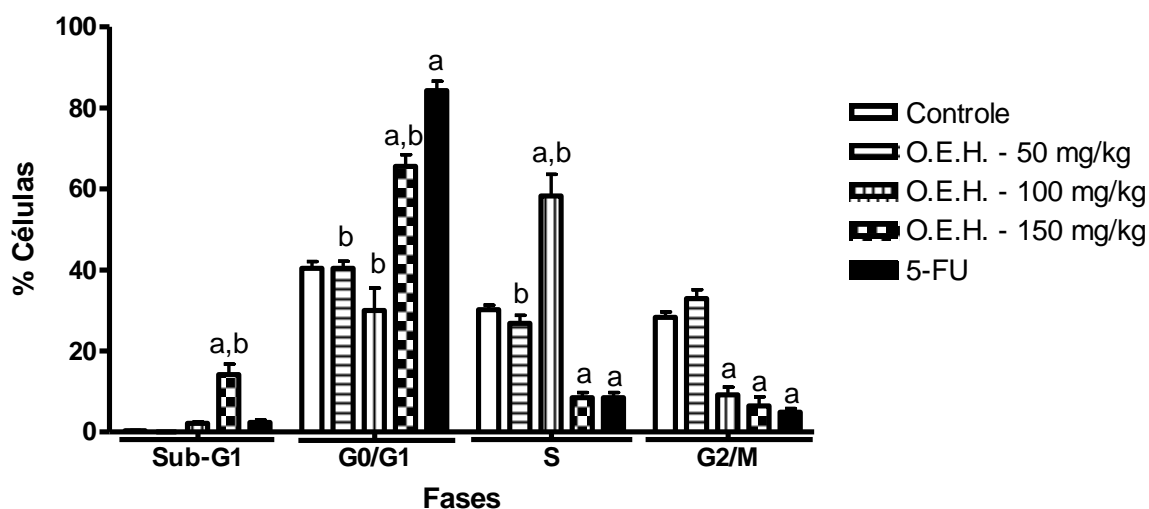
### 5.2.2.3 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com 50, 100 ou 150 mg/kg do O.E.H. induziu alteração significativa na distribuição das células de carcinoma de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular (gráfico 09).

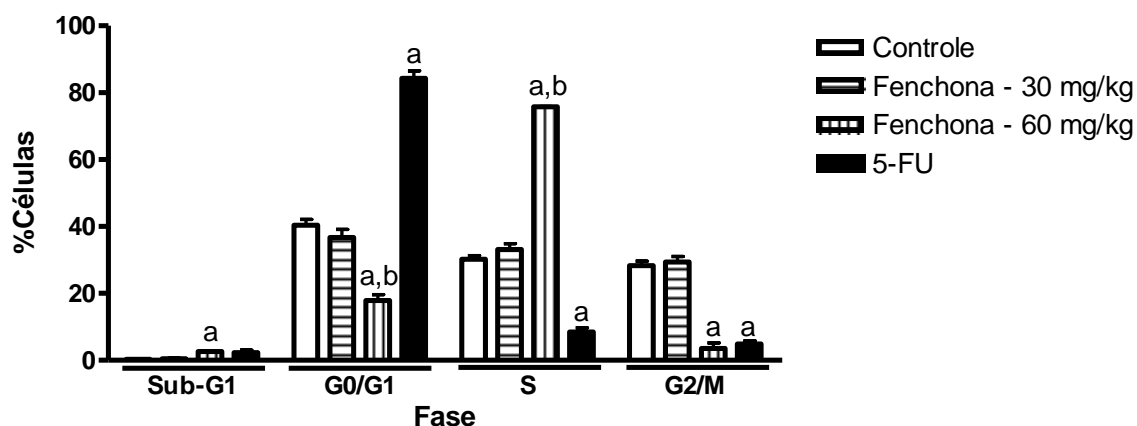
Os resultados mostram que houve redução no percentual de células na fase G2/M após tratamento com 100 ou 150 mg/kg do O.E.H. ou 5-FU (9,1%, 6,4% e 4,8%, respectivamente). Essa redução foi acompanhada por um aumento no percentual de células na fase S (para a dose de 100 mg/kg do O.E.H. 58,27%) e na fase G0/G1 (para a dose de 150 mg/kg do O.E.H. ou 25 mg/kg de 5-FU, 65,6% e 84,3% respectivamente). Para esses dois últimos grupos foi ainda observada redução no percentual de célula na fase S (13,7% e 8,4% respectivamente).

Além disso, aumento significativo no conteúdo de DNA sub-diploide (DNA fragmentado) foi encontrado nos animais tratados com O.E.H. (150 mg/kg) (14,1%) ou fenchona (60 mg/kg) (2,60%) quando comparado ao grupo controle (0,3%).

Em relação ao tratamento com a fenchona (60 mg/kg) houve um aumento significativo na porcentagem de células na fase S para 75,8% em comparação ao grupo controle. Esta exposição também ocasionou redução no percentual de células na fase G2/M para 3,5% e na fase G0/G1 para 17,8%.



**Gráfico 9** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), O.E.H. (50 mg/kg), O.E.H. (100 mg/kg), O.E.H. (150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle, <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com o grupo tratado com o 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.



**Gráfico 10** - Porcentagem de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 5% tween 80 (controle), fenchona (30 mg/kg), fenchona (60 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). <sup>a</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com grupo controle, <sup>b</sup> $p < 0,05$  dados analisados em comparação com o grupo tratado com o 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

### 5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

#### 5.2.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Na Tabela 8 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal.

De acordo com os resultados obtidos observa-se que, após tratamento de nove dias, houve diminuição significativa no consumo de ração apenas nos animais tratados com a maior dose do O.E.H. (150 mg/kg), quando comparado aos grupos controle transplantado ao 5-FU. Em relação ao consumo de água, não foi observada alteração significativa nas maiores doses do tratamento com O.E.H ou 5-FU, entretanto, houve um aumento significativo do consumo de água nos animais tratados com a menor dose (50 mg/kg) do O.E.H e nos animais tratados com ambas as doses da fenchona (30 ou 60 mg/kg).

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/ drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi verificada uma diminuição significativa desse parâmetro nos animais tratados com o 5-FU e com as maiores doses do O.E.H. quando comparados aos grupos controle transplantado e sadio.

**Tabela 8** - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona sobre o consumo de água e ração e evolução ponderal dos animais tratados durante nove dias.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Sadio	--	35,67 ± 1,12	30,85 ± 1,57	28,62 ± 0,37	32,27 ± 0,86
Controle	--	34,38 ± 1,50	31,96 ± 1,84	28,28 ± 0,66	30,84 ± 0,67
5-FU	25	29,38 ± 1,81	32,84 ± 1,21	28,66 ± 0,35	25,78 ± 0,34 <sup>a,b</sup>
O.E.H.	50	47,19 ± 2,28 <sup>a,b,c</sup>	33,96 ± 2,88	28,46 ± 0,34	32,46 ± 1,38 <sup>c</sup>
O.E.H.	100	32,50 ± 1,64	30,79 ± 1,63	27,58 ± 0,54	25,20 ± 1,17 <sup>a,b</sup>
O.E.H.	150	29,38 ± 2,73	23,28 ± 2,12 <sup>a,c</sup>	27,10 ± 0,60	23,60 ± 0,52 <sup>a,b</sup>
Fenchona	30	42,19 ± 1,01 <sup>a,b,c</sup>	35,56 ± 0,81	26,98 ± 0,33	29,42 ± 0,93 <sup>c</sup>
Fenchona	60	46,56 ± 1,62 <sup>a,b,c</sup>	35,33 ± 0,11	27,42 ± 0,89	29,40 ± 1,10 <sup>c</sup>

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao controle transplantado ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

### 5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos do O.E.H. e da fenchona prosseguiu-se também com a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT em ambos os grupos tratados com O.E.H. e no grupo tratado com o 5-FU, quando comparados com o controle transplantado e tampouco com o sadio. Nos grupos tratados com a fenchona houve uma diminuição significativa no nível de AST quando comparados com o controle transplantado e sadio, e uma diminuição no nível da ALT quando comparado ao grupo controle transplantado. Já em relação à ureia, pode-se observar um aumento significativo no grupo tratado com a dose de 150 mg/kg do O.E.H., em relação ao grupo controle transplantado e ao sadio, e a droga padrão 5-FU (Tabela 9).

**Tabela 9** - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Sadio	--	283,21 ± 24,94	53,60 ± 6,55	39,0 ± 1,87	0,42 ± 0,08
Controle	--	242,0 ± 12,17	67,80 ± 7,11	43,0 ± 7,14	0,32 ± 0,02
5-FU	25	199,3 ± 38,48	39,00 ± 9,51	33,20 ± 1,53	0,51 ± 0,02
O.E.H.	50	217,4 ± 27,47	53,80 ± 11,81	27,52 ± 12,02	0,20 ± 0,05
O.E.H.	100	285,4 ± 22,12	60,25 ± 1,43	45,90 ± 5,77	0,24 ± 0,02
O.E.H.	150	320,2 ± 73,92	44,00 ± 6,86	81,80 ± 8,37 <sup>a,b,c</sup>	0,59 ± 0,15
Fenchona	30	155,8 ± 7,45 <sup>a,b</sup>	29,25 ± 2,68 <sup>a</sup>	38,80 ± 3,78	0,25 ± 0,04
Fenchona	60	163,8 ± 8,35 <sup>a,b</sup>	34,75 ± 5,36 <sup>a</sup>	37,80 ± 2,39	0,24 ± 0,01

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup>p < 0,05 comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup>p < 0,05 comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

<sup>c</sup>p < 0,05 comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

Em relação à avaliação hematológica, houve um aumento significativo na contagem de hemácias e nos valores de hemoglobina e hematócrito nos grupos tratados com 5-FU (25 mg/kg) ou O.E.H. (100 ou 150 mg/kg) ou fenchona (60 mg/kg), quando comparados ao controle transplantado. Observa-se que, ao passo que a inoculação do tumor por si só induziu redução desses parâmetros, os tratamentos supracitados restauraram seus valores para a normalidade (grupo sadio). O tratamento com O.E.H. (50 mg/kg) foi capaz de reverter a redução, produzida pelo tumor, apenas do parâmetro hemetócrito, ao passo que o tratamento com fenchona (30 mg/kg) reverteu essa redução nos parâmetros hematócrito e hemoglobina (Tabela 10).

**Tabela 10** - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Sadio	--	$9,36 \pm 0,14$	$14,84 \pm 0,24$	$43,84 \pm 0,55$
Controle	--	$5,88 \pm 0,38^b$	$9,40 \pm 0,57^b$	$29,04 \pm 1,79^b$
5-FU	25	$9,69 \pm 0,26^a$	$14,90 \pm 0,35^a$	$46,85 \pm 1,06^a$
O.E.H.	50	$6,95 \pm 0,11^{b,c}$	$10,26 \pm 0,76^{b,c}$	$40,00 \pm 1,63^a$
O.E.H.	100	$8,13 \pm 0,22^a$	$13,42 \pm 0,38^a$	$43,78 \pm 1,35^a$
O.E.H.	150	$9,05 \pm 0,34^a$	$14,70 \pm 0,71^a$	$44,28 \pm 2,18^a$
Fenchona	30	$6,92 \pm 0,41^{b,c}$	$12,04 \pm 0,33^{a,b,c}$	$40,24 \pm 0,92^a$
Fenchona	60	$7,95 \pm 0,36^a$	$13,25 \pm 0,64^a$	$45,16 \pm 3,28^a$

Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

<sup>c</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

Em relação aos parâmetros hematimétricos, houve aumento significativo do Volume Corpuscular Médio (VCM) nos animais tratados com 50 ou 100 mg/kg do O.E.H. ou com ambas as doses da fenchona em comparação com aos controles sadio e transplantado. Houve aumento significativo nos valores da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) apenas no grupo tratado com 30 mg/kg de fenchona. Em relação à Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), houve diminuição significativa nos animais tratados com 50 mg/kg do O.E.H. ou 30 mg/kg da fenchona, em comparação ao controle transplantado e sadio (Tabela 10).



**Tabela 10-** Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento (continuação)

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm <sup>3</sup> )	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Sadio	--	46,80 ± 0,97	15,84 ± 0,47	33,74 ± 0,38
Controle	--	49,80 ± 0,58	16,00 ± 0,18	34,52 ± 0,83
5-FU	25	49,00 ± 0,63	15,40 ± 0,17	31,28 ± 0,22
O.E.H.	50	57,60 ± 2,24 <sup>a,b</sup>	14,80 ± 1,10	25,72 ± 1,66 <sup>a,b</sup>
O.E.H.	100	55,60 ± 0,97 <sup>a,b</sup>	17,06 ± 0,28	30,70 ± 0,34
O.E.H.	150	48,80 ± 0,58	16,22 ± 0,31	33,22 ± 0,63
Fenchona	30	59,00 ± 3,46 <sup>a,b,c</sup>	17,18 ± 0,22 <sup>a,b,c</sup>	28,43 ± 0,89 <sup>a,b</sup>
Fenchona	60	59,20 ± 2,13 <sup>a,b,c</sup>	16,56 ± 0,32	30,97 ± 0,76

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup>*p* < 0,05 comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup>*p* < 0,05 comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

<sup>c</sup>*p* < 0,05 comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

No que se refere à contagem total de leucócitos, foi observado uma diminuição significativa nesse parâmetro no grupo tratado com 5-FU ou O.E.H (100 ou 150 mg/kg) ou fenchona (60 mg/kg) em comparação com o grupo controle transplantado (Tabela 10). Já no grupo tratado com O.E.H. (50 mg/kg) ou fenchona (30 mg/kg) ocorreu um aumento significativo nesse parâmetro quando comparado aos controles sadio e transplantado. Adicionalmente, animais transplantados com as células de carcinoma de Ehelich mostraram um significativo aumento no número de leucócitos totais circulantes quando comparados com os animais sadio.

O tratamento com O.E.H., nas maiores doses, não induziu alteração significativa na contagem diferencial de leucócitos, em comparação com os grupos controle transplantado e sadio. Entretanto, o tratamento de nove dias com o 5-FU induziu aumento de linfócitos e diminuição de neutrófilos em comparação com o grupo controle transplantado (Tabela 10).

**Tabela 10-** Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos após nove dias de tratamento (continuação)

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Sadio	--	$8,18 \pm 0,43$	$60,60 \pm 4,24$	$34,60 \pm 4,21$	$4,40 \pm 0,74$	$0,40 \pm 0,24$
Controle	--	$15,07 \pm 1,11^b$	$52,40 \pm 12,71$	$45,40 \pm 12,38$	$2,00 \pm 0,54$	$0,20 \pm 0,2$
5-FU	25	$3,20 \pm 0,18^a$	$90,40 \pm 0,92^a$	$7,00 \pm 0,70^a$	$2,60 \pm 0,67$	$0,0 \pm 0,0$
O.E.H.	50	$29,83 \pm 8,7^{a,b,c}$	$43,60 \pm 9,38^c$	$46,60 \pm 8,75^c$	$4,00 \pm 0,63$	$0,20 \pm 0,2$
O.E.H.	100	$3,12 \pm 0,48^a$	$56,60 \pm 2,11$	$35,60 \pm 2,87$	$2,4 \pm 0,51$	$0,0 \pm 0,0$
O.E.H.	150	$5,07 \pm 1,66^a$	$51,20 \pm 11,98^c$	$47,40 \pm 13,86^c$	$3,40 \pm 0,40$	$0,0 \pm 0,0$
Fenchona	30	$20,23 \pm 1,43^{a,b,c}$	$41,60 \pm 8,37^c$	$52,80 \pm 8,64^c$	$2,00 \pm 0,54$	$0,0 \pm 0,0$
Fenchona	60	$3,97 \pm 0,60^a$	$64,60 \pm 5,56$	$30,00 \pm 5,44$	$1,40 \pm 0,51^b$	$0,0 \pm 0,0$

Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey

<sup>c</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

### 5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Na Tabela 11 estão expressos os valores referentes aos índices dos órgãos dos animais avaliados após nove dias de tratamento.

Nenhuma alteração significativa nos índices de rins e baço foi observada entre os grupos de animais controles transplantado e sadio, e tratados com O.E.H. ou fenchona nas doses avaliadas.

Houve um aumento significativo no índice do coração nos animais do grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU e com a fenchona (60 mg/kg) quando comparado ao grupo controle transplantado. Um aumento significativo foi observado no índice do fígado do grupo controle transplantado e grupo tratado com fenchona (30 e 60 mg/kg) em comparação ao controle sadio, assim como uma diminuição nos grupos tratados com O.E.H (50, 100 ou 150 mg/kg) e

5-FU (25 mg/kg) em comparação ao grupo controle transplantado. Ainda, foi observado aumento significativo no índice do timo nos animais tratados com 30 mg/kg de fenchona em relação ao controle transplantado (Tabela 11).

**Tabela 11** - Efeitos do O.E.H., 5-FU e fenchona nos órgãos de camundongos após nove dias de tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Sadio	----	4,22 ± 0,25	50,83 ± 2,07	10,85 ± 0,47	3,73 ± 0,54	5,54 ± 0,46
Controle	----	3,47 ± 0,17	71,17 ± 3,11 <sup>b</sup>	10,59 ± 0,31	2,51 ± 0,22	5,76 ± 0,77
5-FU	25	4,84 ± 0,48 <sup>a</sup>	56,31 ± 2,04	12,29 ± 0,30	2,85 ± 0,08	6,32 ± 0,51
O.E.H.	50	3,20 ± 0,48	59,34 ± 2,96 <sup>a</sup>	9,01 ± 0,67	2,65 ± 0,55	6,52 ± 1,57
O.E.H.	100	4,08 ± 0,12	55,78 ± 1,46 <sup>a</sup>	11,55 ± 0,37	3,59 ± 0,41	7,14 ± 0,40
O.E.H.	150	4,19 ± 0,20	56,81 ± 3,01 <sup>a</sup>	11,62 ± 0,88	2,37 ± 0,19	7,40 ± 1,26
Fenchona	30	4,03 ± 0,22	71,37 ± 6,28 <sup>b</sup>	11,05 ± 0,76	4,13 ± 0,19 <sup>a,c</sup>	8,91 ± 1,28
Fenchona	60	4,67 ± 0,38 <sup>a</sup>	75,66 ± 1,41 <sup>b,c</sup>	13,35 ± 1,01	3,53 ± 0,31	7,93 ± 0,68

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle sadio por ANOVA seguido de Tukey.

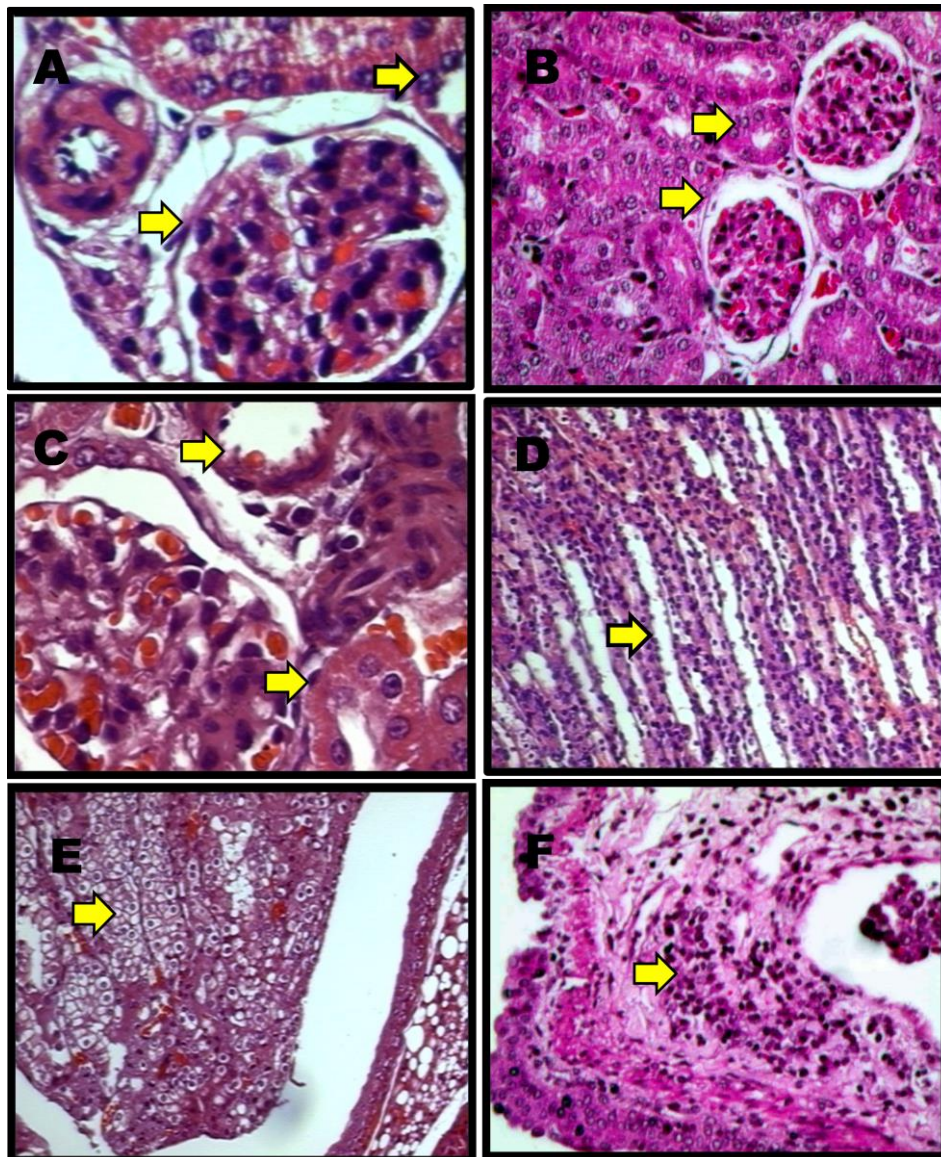
<sup>c</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

#### 5.2.3.4 Análises anatomopatológicas

Para avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do O.E.H. sobre os órgãos dos animais tratados, foi realizada uma avaliação histopatológica especificamente no fígado e rins.

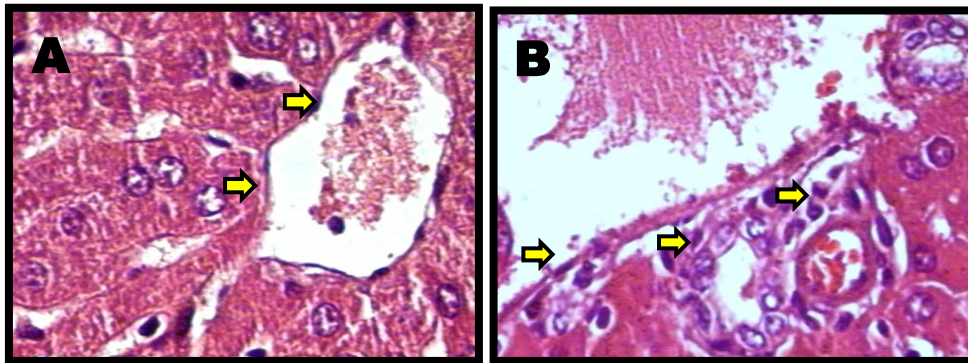
Os rins removidos dos grupos controle transplantado e tratados com 5-FU ou O.E.H., nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, apresentaram-se histologicamente com lobos bem definidos (pirâmide medular e tecido cortical recobrimdo a sua base e lados) e lóbulos preservados. Os glomérulos (corpúsculo de Malpighi) estavam preservados, inclusive numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman, e o tufo capilar sustentado por delicado mesângio (Figura 2A), fazendo relação com a arteríola renal e túbulos contorcidos proximais (Figura 2B e 2C). A região medular foi representada por túbulos contorcidos

proximais e túbulos contorcidos distais em continuidade com as alças de Henle, sendo revestidos por epitélio cilíndrico simples, sem particularidades histológicas (Figura 2D). Partes delgadas e curvilíneas das alças de Henle estavam delineadas por células achatadas. Túbulos coletores direcionados para as papilas, delineados por células altas, com citoplasmas claros (anofílicos), tendo tecido fibroconjuntivo interveniente delicado (Figura 2E). Focos de infiltração inflamatória linfoplasmocitária na lâmina própria do sistema pielocalicial foram observados nos animais tratados com a dose de 50 mg/kg do O.E.H. (Figura 2F).



**Figura 2** - Histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado – Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio; (B) O.E.H. (50 mg/kg) e (C) 5-FU (25 mg/kg) - Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio e sua relação com arteríola renal e túbulos contorcidos proximais; (D) O.E.C. (100 mg/kg) – Alças de Henle sem particularidades histológicas; (E) O.E.C. (150 mg/kg) – Túbulos coletores revestidos por epitélio cilíndrico, cujas células mostram citoplasmas claros, configurando estrutura calicial, em relação com a pélvis renal; (F) O.E.C. (50 mg/kg) – Focos de infiltração inflamatória linfoplasmocitária; Hematoxilina-eosina (100 e 400 x).

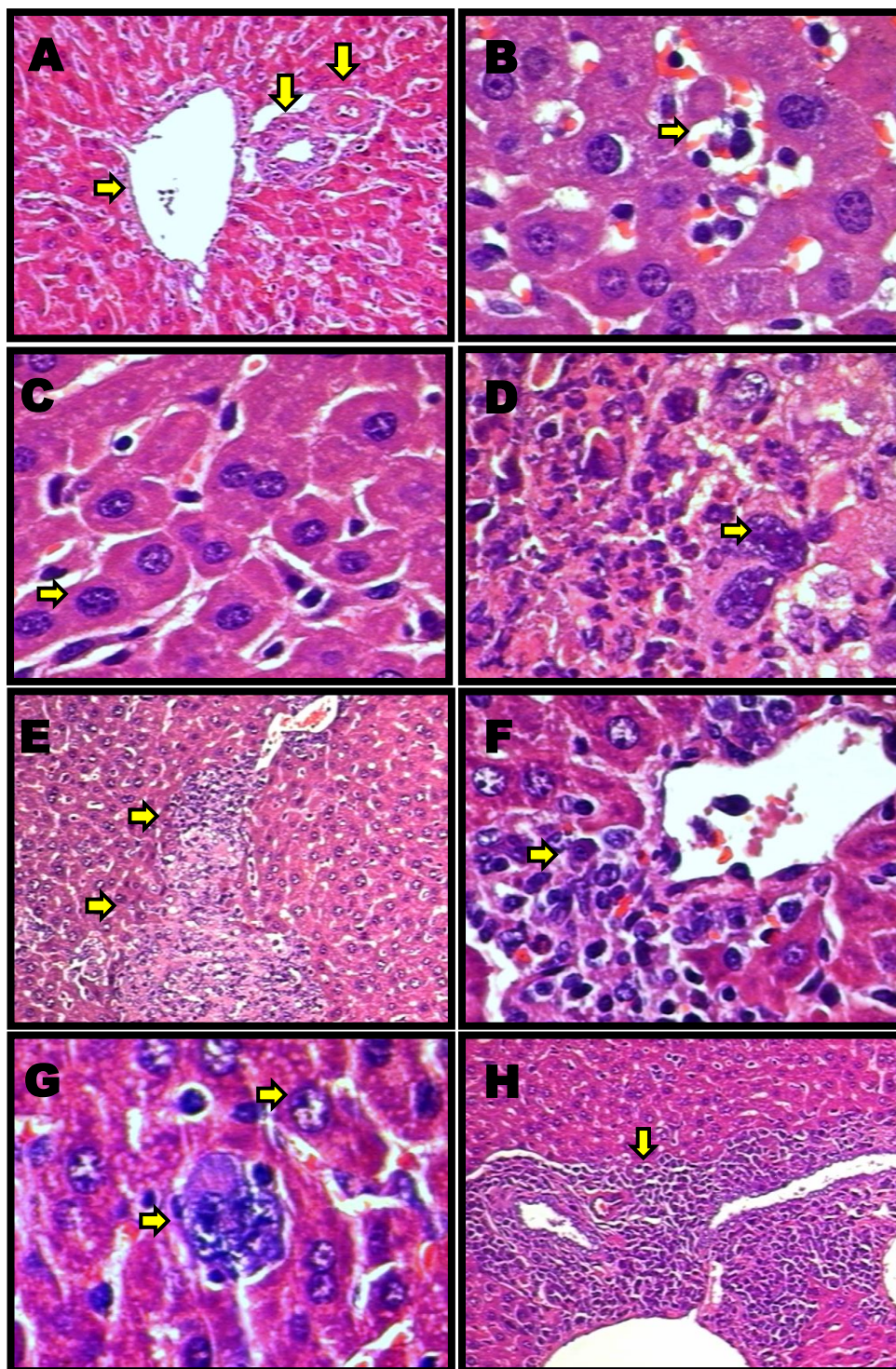
Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado apresentaram arquitetura do tipo lobular normal, com veias hepáticas terminais de paredes finas, presença de inflamação sinusoidal leve e ausência de fibrose lobular (Figura 3A). No seio do lóbulo, identificou-se discreto infiltrado inflamatório linfoistiocítico, em raros focos. Os hepatócitos estavam normais, isomorfos e apresentavam necrose focal, além de estarem circundados por agregados linfo-histiocitários, em raros sítios. Os raros focos de necrose parenquimatosa são vistos nas zonas III (Figura 3B). Não foram observadas atividades periportal e perisseptal.



**Figura 3** - Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado – Veia hepática terminal com parede fina e permeável aos sinusóides; (B) Controle transplantado – Infiltrado linfo-histiocitário na zona III; Hematoxilina-eosina (400 x).

Os grupos tratados com as doses de 50, 100 ou 150 mg/kg do O.E.H. apresentaram arquitetura lobular normal, com veias hepáticas terminais com paredes finas, presença de inflamação sinusoidal leve e ausência de fibrose lobular. Presença de espaço portal com tríade vasculobiliar (Figura 4A). Foi observado aumento discreto do número de linfócitos em raros espaços portais que se associam a histiócitos e neutrófilos. Os hepatócitos estavam normais e isomorfos, sendo detectado raros e pequenos focos de necrose hepatocelular, circundados por agregados linfo-histiocitários (Figura 4B). Adicionalmente a essas observações, também detectadas no grupo controle transplantado (Figura 3), o fígado dos animais tratados com o O.E.H. apresentaram discreta hiperplasia de células de Kupffer (Figura 4C), presença de capsulite nos grupos tratados com as doses de 100 ou 150 mg/kg (Figura 4D) e os focos de necrose parenquimatosa foram vistos, aleatoriamente, nas zonas II e III (Figura 4E). Excetuando-se a presença de capsulite, as mesmas características já descritas anteriormente foram observadas para os animais tratados com o 5-FU. Entretanto, para estes animais, observou-se ainda atividade periportal e perisseptal com discreta necrose em “saca-bocado” (pequenas áreas em poucos espaços portais) (Figura 4F), atividade parenquimatosa com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários, em numerosos sítios (Figura 4G), e fenômenos hepatocelulares de poliploidia (Figura 3J).



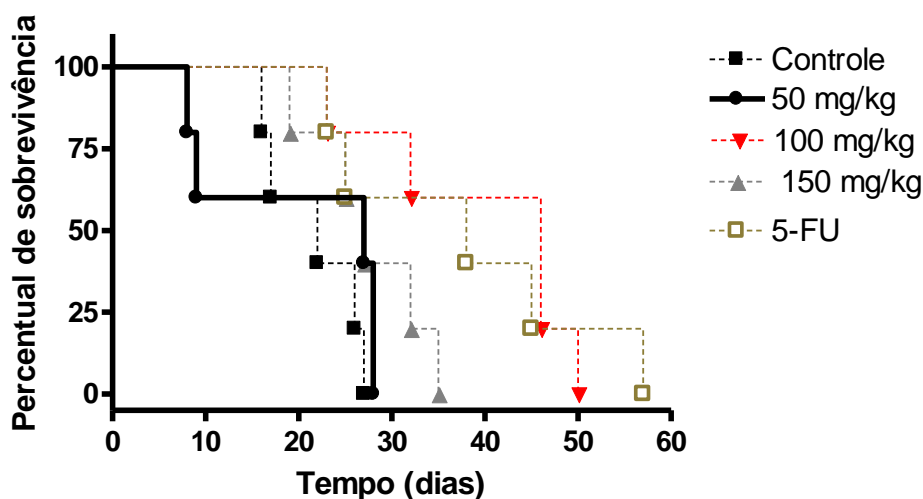


**Figura 4** - Histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A) O.E.H. (50 mg/kg) – Espaço portal com tríade vasculobiliar; (B) O.E.H. (100 mg/kg) – Inflamação sinusoidal; (C) O.E.H. (100 mg/kg) – Hiperplasia reacional de células de Kupffer; (D) O.E.H. (150 mg/kg) - Células tumorais anaplásicas, margeadas por necrose de coagulação do tecido hepático (E) O.E.H. (150 mg/kg) - Necrose parenquimatosa nas zonas II e III (F) - 5-FU (25 mg/kg) - Discreta necrose em “saca- bocado” (G) 5-FU (25 mg/kg) – Regeneração hepatocelular poliploide; (H) 5-FU (25 mg/kg) – Portite linfoistiocitária em nível moderado comprometendo o espaço portal. Hematoxilina-eosina (100 ou 400 x).

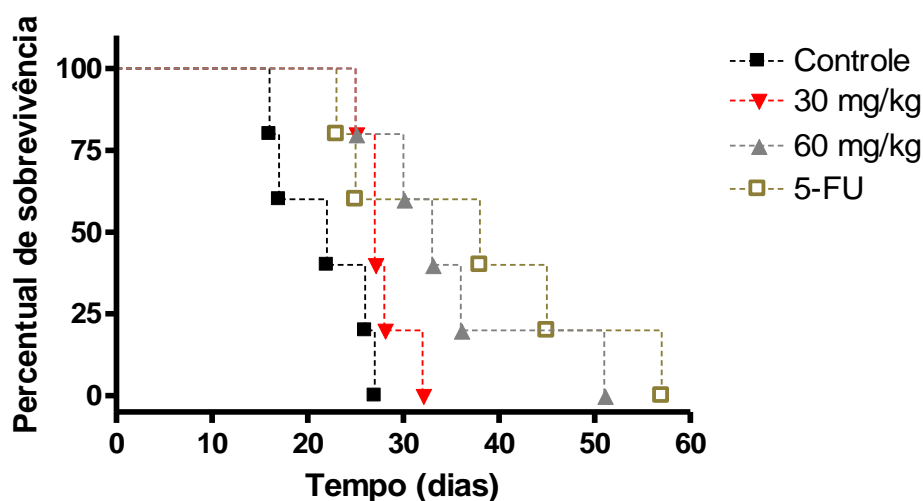
#### 5.2.4 Avaliação do efeito dos tratamentos na sobrevida de animais transplantados com tumor de Ehrlich

Os grupos tratados com doses de 50, 100 ou 150 mg/kg do O.E.H. ou o 5-FU apresentaram um aumento significativo no tempo de sobrevida quando comparados ao controle transplantado. A média de vida dos grupos estudados foi: controle transplantado – 22 dias; tratado com O.E.H. (50 mg/kg) – 27 dias; tratado com O.E.H. (100 mg/kg) – 46 dias; tratado com O.E.H. (150 mg/kg) – 27 dias; 5-FU (25 mg/kg) – 38 dias.

Ainda, foi possível observar que o grupo tratado com O.E.H. (100 mg/kg) foi mais eficaz que o tratado com O.E.H. (150 mg/kg), nesse parâmetro de avaliação (Gráfico 11).



**Gráfico 11-** Avaliação da sobrevida de camundongos fêmeas inoculados com células de carcinoma de Ehrlich e tratados com O.E.H. (50, 100 e 150 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). Curvas de sobrevivência do teste de Kaplan-Meier.



**Gráfico 12-** Avaliação da sobrevivência de camundongos fêmeas inoculados com células de carcinoma de Ehrlich e tratados com fenchona (30 e 60 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). Curvas de sobrevivência do teste de Kaplan-Meier.

### 5.2.5 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do O.E.H. foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado é apresentado abaixo, na Tabela 12. O tratamento dos animais com a maior dose do O.E.H. (300 mg/kg) induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico quando comparados ao grupo controle (5% de Tween 80).

**Tabela 12** - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do O.E.H. e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células	Células micronucleadas
Controle	-	6	2000	2,80 ± 0,37
Ciclofosfamida	50	6	2000	14,50 ± 2,60 <sup>a</sup>
O.E.H.	150	6	2000	4,40 ± 0,60 <sup>b</sup>
O.E.H.	300	6	2000	5,60 ± 0,40 <sup>a,b</sup>

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais

<sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido de Tukey

<sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com Ciclofosfamida por ANOVA seguido de Tukey.



**ROLIM, T. L.**

**DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, devido as importantes consequências sobre a morbimortalidade da população (FERLAY et al., 2007; FRANÇA; ROSA; FERRARI, 2012). Essa enfermidade é cada vez mais prevalente no Brasil e, atualmente, representa a segunda causa de mortalidade no país (INCA, 2011).

Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (COSTA-LOTUFO et al., 2010), e a maioria dos esquemas de quimioterapia faz uso de drogas citotóxicas de natureza não seletiva, o que causa danos colaterais às células normais do organismo. Sendo assim, a busca por alternativas terapêuticas para tratamento do câncer, com maior eficácia e especificidade é constante (EDRIS, 2007).

Dentro desse contexto as terapias naturais se configuram como opções em potencial para o cuidado com a saúde, enquanto práticas terapêuticas, sendo evidente a ampliação do uso dessas terapias em alguns casos específicos como, por exemplo, para o tratamento do câncer (SPADACIO; BARROS, 2008).

Dentre essas terapias naturais, destacam-se os óleos essenciais e seus constituintes, os quais apresentam diversas propriedades farmacológicas, havendo estudos que comprovam o uso desse tipo de derivado vegetal como potente droga antitumoral (SILVA et al., 2008). Considerando ainda que cerca de 60% dos agentes antineoplásicos são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, é evidente a contribuição destes no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para a terapia do câncer.

O presente estudo demonstra a toxicidade e a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial das partes aéreas de *Hyptis umbrosa* (O.E.H.) e do seu componente majoritário, a fenchona.

A estabilidade mecânica dos eritrócitos é um bom indicador de danos *in vitro* no ensaio de citotoxicidade, já que drogas podem alterar essa delicada estrutura quando exposta *in vivo* (SHARMA; SHARMA, 2001). Essas células são importantes para predizer efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou condições associadas com estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células (APARICIO et al., 2005; LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2006).

O valor de CH<sub>50</sub> do O.E.H. (494,9 µg/mL) obtido no ensaio de hemólise demonstra que ele foi citotóxico contra eritrócitos, uma vez que, segundo Santos Júnior e colaboradores

(2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar  $CH_{50}$  maior que 1250  $\mu\text{g/mL}$ . O tratamento com a fenchona até a concentração de 3000  $\mu\text{g/mL}$  não produziu citotoxicidade.

Tal atividade corrobora com achados da literatura, uma vez que estudos indicam que alguns compostos isolados de plantas, tais como terpenoides, assim como polifenóis, epicatequinas e saponinas podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997). Sendo assim, esses resultados demonstram que O.E.H. apresenta efeito citotóxico em eritrócitos, células estas comumente afetadas pelo tratamento com antineoplásicos.

Para avaliar a atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas. Dentre os diversos modelos experimentais para avaliação da viabilidade celular, o ensaio com a Sulforradamina B (SRB) fornece a melhor combinação de intensidade de coloração, razão sinal-ruído e linearidade com o número de célula. SRB é um corante brilhante, aniônico, que diluído em ácido acético, se liga eletrostaticamente a aminoácidos básicos de células fixadas (BOYD, 1995). Utilizando essa metodologia, é possível avaliar a atividade citostática e citocida de um produto em células tumorais humanas. Os resultados obtidos demonstram que O.E.H. foi capaz de inibir o crescimento tumoral e induzir morte celular nas linhagens avaliadas apenas na maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, como os valores de  $GI_{50}$  para O.E.H. foram bem maiores do que os do fármaco utilizado como droga padrão no experimento, a doxorrubicina, pode-se considera-lo inativo nas linhagens tumorais humanas testadas. A fenchona não foi capaz de inibir o crescimento tumoral, tampouco induzir morte celular nas linhagens avaliadas, sendo também considerada inativa nas linhagens tumorais humanas testadas.

Apesar dos dados de avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do O.E.H. não serem promissores, prossegui-se com a investigação do seu possível efeito *in vivo*, considerando que, alguns fármacos antineoplásicos amplamente utilizados na prática clínica, como a ciclofosfamida, apresentam potentes efeitos *in vivo*, apesar de serem ineficazes *in vitro*. Isso ocorre porque essas substâncias são pró-fármacos que necessitam sofrer um processo de ativação metabólica para produzirem seus efeitos (KOBUNAI; WATANABE; FUKUSATO, 2011). Alguns óleos essenciais de diferentes espécies também apresentam esse perfil de atividade, como por exemplo, o óleo de *Croton polyandrus* (PESSOA, 2013) e de *Xylopi frutescens* (LUNGUINHO, 2012).

Para a determinação de doses seguras a serem usadas no teste de avaliação de atividade antitumoral *in vivo* em camundongos, foi realizado inicialmente o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda na mesma espécie animal.

Após a administração do O.E.H. no ensaio de avaliação toxicológica de dose única, observou-se que os animais submetidos à dose de 2000 mg/kg morreram nos primeiros minutos após o tratamento, sendo, portanto, esta dose caracterizada como de alta toxicidade. Em contrapartida, a utilização da dose de 300 mg/kg, nos dois experimentos realizados, mostrou apenas o aparecimento de sinais como constipação e micção diminuída, vocalização e hiperatividade, considerados sem importância clínica, pois desapareceram após 60 minutos da administração. Além disso, a utilização desta dose não foi capaz de alterar o consumo de água e ração, a evolução ponderal e os índices dos órgãos dos animais tratados. Com isso, pode-se inferir que a administração intraperitoneal de 300 mg/kg do O.E.H. apresenta baixa toxicidade em camundongos.

Segundo o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (publicado pela Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia (GESEF) da ANVISA em 2010), não é exigida a determinação de DL<sub>50</sub> (dose que mata 50% dos animais) por ser um método que implica em grande precisão estatística. Ainda segundo o referido guia, podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como preconizado nos guias da OECD pela classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS (Anexo 1). A partir daí foi possível estimar a DL<sub>50</sub> do O.E.H. em torno de 500 mg/kg, o que forneceu segurança para o início dos ensaios de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* com doses menores.

Modelos de câncer em animais são sistemas que mimetizam a natureza do tumor encontrado em humanos. Assim, a escolha do modelo tumoral *in vivo* é fundamental durante a investigação de uma nova droga anticancerígena (KERBEL, 2003).

A ascite provocada pela inoculação intraperitoneal de células de carcinoma de Ehrlich é uma consequência da inflamação induzida pelo tumor, devido ao aumento na permeabilidade vascular, causando a chamada carcinomatose peritoneal (FASTAIA; DUMONT, 1976). Esta é uma preocupação no tratamento de tumores abdominais, tais como tumores hepático, gástrico e ginecológico. Para o tratamento desta situação, a administração intraperitoneal de drogas anticâncer foi introduzida com a intenção de alcançar níveis tumorídeos da droga, localmente, enquanto minimiza os efeitos colaterais sistêmicos (TAMURA et al., 2002; MARONI et al., 2012).

Tem-se preconizado a quimioterapia intraperitoneal com o 5-FU para o tratamento da carcinomatose peritoneal (SUGARBAKER et al., 1990). O seu mecanismo inclui inibição da timidilato sintase (TS) pelo 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), incorporação de 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) ao RNA e incorporação do 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA. A inibição da TS, uma enzima importante na síntese de pirimidina, resulta na depleção do trifosfato de deoxitimidina (dTTP) e um aumento no trifosfato de deoxiuridina (dUTP) seguida da diminuição na síntese e reparo de DNA. Portanto, o 5-FU é um antineoplásico, da classe dos antimetabólitos, que interfere com o processo de replicação celular. Incorporação do 5-FU ao RNA também tem sido relatada à sua ação citotóxica (NOORDHUIS et al., 2004).

Os resultados obtidos no ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em células de carcinoma ascítico de Ehrlich mostram que O.E.H., nas doses de 100 ou 150 mg/kg, e fenchona na dose de 60 mg/kg, possuem eficácia semelhante em reduzir a viabilidade celular, o volume e peso tumoral quando comparado ao antineoplásico 5-FU (25 mg/kg). O mesmo não ocorreu com a menor dose do O.E.H. (50 mg/kg) ou da fenchona (30 mg/kg).

O câncer é um dos cenários onde ocorre pouca apoptose, dando origem às células malignas resistentes à morte. O mecanismo de apoptose é complexo e envolve várias vias de sinalização. Defeitos podem ocorrer em algum ponto dessas vias, levando à transformação maligna das células afetadas, metástase tumoral e resistência a drogas anticâncer. Apesar de ser muitas vezes considerada a causa do problema, a indução da apoptose tem um importante papel no tratamento do câncer (WONG, 2011; LI et al., 2012).

A apoptose é caracterizada por várias alterações celulares. A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico, normalmente mantido no folheto interno das membranas celulares. Quando uma célula morre por apoptose, a fosfatidilserina torna-se exposta na sua superfície. Sendo assim, é comum, em protocolos laboratoriais, utilizar a Anexina-V, uma proteína de ligação para fosfatidilserina, para marcar as células que estão em apoptose (PORTUGAL, 2012). O iodeto de propídeo (IP) é um corante permeável somente em células onde a integridade da membrana (juntamente com o conteúdo citosólico) foi perdida. Esse marcador é utilizado para evidenciar os fenômenos típicos da morte por necrose, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica (NECKEL, 2011). Durante a apoptose, há um período de latência entre a positividade da fosfatidilserina (detectada com Anexina-V-FITC) e a positividade para o IP, enquanto que em células necróticas, ambos os eventos coincidem. Dessa maneira, apenas a combinação de ambos os marcadores, avaliados

na evolução temporal do processo de morte, poderia discriminar necrose de apoptose (KRYSKO et al., 2008).

Utilizando esse método de marcação celular, observou-se que O.E.H. na dose de 150 mg/kg foi capaz de aumentar a população de células marcadas apenas com Anexina-V, caracterizando o estágio inicial da apoptose, e duplamente marcadas com Anexina-V e IP, relacionada ao estágio tardio da apoptose ou necrose. A pequena porcentagem de células marcadas com Anexina V ou duplamente marcadas (com Anexina V e IP) sugere inicialmente que: i) as células estariam morrendo por outro tipo de morte celular que não apoptose nem necrose, como por exemplo, por autofagia, ou ii) as células apoptóticas sinalizaram o processo de morte, para macrófagos, através da externalização da fosfatidilserina, os quais fagocitaram os corpos apoptóticos produzidos.

Em relação a fenchona, pode-se observar que não houve aumento significativo na porcentagem de células marcadas apenas com Anexina-V, porém houve significativo aumento nas células duplamente marcadas. Esse aumento sugere que: i) se houve morte celular por apoptose, as células já foram fagocitadas, e eliminadas sem que haja ruptura da membrana e marcação com IP ou ii) possivelmente o monoterpeno está induzindo necrose em cerca de 40% das células.

Sabe-se que a desregulação do ciclo celular é uma das principais características das células tumorais (WANG et al., 2009). A indução à parada do ciclo celular tem sido considerada como um importante mecanismo das drogas envolvidas no tratamento anticâncer (KORNBER; LORCH, 1999; DICKSON; SCHWARTZ, 2009; XIAO et al., 2011).

A observação de que células em apoptose apresentam uma redução na marcação do DNA após utilização de diferentes fluorocromos, como o iodeto de propídeo, tem sido usado para detecção desse processo de morte de celular. Dessa forma, o aparecimento de células com DNA com menor marcação do que àquele das células em G0/G1, o qual representa o pico Sub-G1, tem sido considerado como marcador da célula em morte por apoptose (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

Várias observações indicam que a diminuição na marcação do DNA, observado em células em apoptose, é consequência da perda parcial de DNA dessas células, devido à ativação de endonucleases endógenas e liberação subsequente de fragmentos de DNA de baixo peso molecular a partir da célula, antes da análise por citometria de fluxo (KOOPMAN et al., 1994).

Em contraste com as células apoptóticas, células necróticas geralmente não mostram uma redução imediata da marcação do DNA. Assim, a discriminação entre células normais

viáveis e células necróticas é impossível baseado apenas nesse parâmetro (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

A avaliação do perfil do ciclo celular de células tumorais de Ehrlich após administração de O.E.H. (100 ou 150 mg/kg) durante nove dias, confirmou a potente atividade antitumoral deste derivado vegetal, como demonstrada nos parâmetros descritos anteriormente. A maioria das células apresentou parada na fase G0/G1 após tratamento com 150 mg/kg do óleo ou 5-FU (25 mg/kg), o que representa um bloqueio na progressão do ciclo celular. Como descrito na literatura, a parada em G0/G1 serve para dar às células um tempo para reparar danos importantes antes que a replicação do DNA ocorra, evitando assim a propagação de lesões genéticas para células descendentes ou ativando a via apoptótica (MUELLER et al., 2006).

Os resultados da análise do ciclo celular corroboram com o estudo de mecanismo de ação de muitos compostos que param o ciclo celular na fase G0/G1 (GALBIATI et al., 2001; LINKE et al., 2013). Além disso, já é estabelecido que o 5-FU aumenta a população de células em G0/G1 e diminui a população de células na fase S, o que está de acordo com seu mecanismo de ação (interfere com a síntese, fase S, do DNA no ciclo celular) (YOSHIKAWA et al., 2001). O tratamento com O.E.H. (150 mg/kg) também induziu diminuição da população celular na fase S e G2/M, em comparação com o controle. Ainda, o óleo essencial e a fenchona nas maiores doses induziram um aumento significativo na população sub-diplóide (pico sub-G1), sendo assim, indicativo de indução de apoptose.

O conjunto de todos os dados apresentados das análises de ciclo celular e Anexina V-FITC e IP permite sugerir que O.E.H., (150 mg/kg), exerce seu efeito antitumoral porque induz morte celular por apoptose em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

O tratamento com fenchona (60 mg/kg) induziu ainda parada do ciclo na fase S. Como relatado na literatura, alguns agentes antineoplásicos exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (MACHADO, 2000; OLIVEIRA; ALVES, 2002).

A maioria dos fármacos antineoplásicos derivados de produtos naturais são também denominados fármacos ciclo-celular específicos. Entre eles, podemos citar: *i*) alcaloides da vinca – que agem pela inibição do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, consequentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase; *ii*) taxol, éster alcaloide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*), (conhecido comercialmente como Paclitaxel®) – ação também pela inibição do fuso mitótico, dimerização da tubulina e estabilização dos túbulos, protegendo-os da despolimerização, o

que os estabiliza e resulta no bloqueio da multiplicação celular *iii*) podofilotoxinas (ou epipodofilotoxinas), tendo-se como exemplos principais a etoposida e teniposida, derivados semi-sintéticos da podofilotoxina, extraída da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) – ação pelo bloqueio das células nas fases S e G2 e inibição da enzima topoisomerase II, o que promove lesão no DNA (OLIVEIRA; ALVES, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

Considerando a composição química do O.E.H., a fenchona encontra-se presente em 25 mg no referido óleo (100 mg). Por isso, foi utilizada uma dose de 30 mg/kg desse composto para a avaliação de sua atividade antitumoral *in vivo*. Entretanto, esta dose não mostrou atividade antitumoral em células de carcinoma ascítico de Ehrlich, e por isso, foi realizada a avaliação da atividade com o dobro dessa dose (60 mg/kg), dose esta que mostrou significativo efeito antitumoral *in vivo* no modelo avaliado. Então, os resultados mostram que a atividade antitumoral do O.E.H. é provavelmente atribuída a mistura de seus constituintes como o limoneno, espatulenol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humeleno, todos com ação anticâncer reconhecida (COMPAGNONE et al., 2010; ALCÂNTARA et al., 2010), e não apenas ao componente majoritário isolado.

É bem relatado na literatura que a utilização de drogas antineoplásicas podem produzir inúmeros efeitos adversos. Com isso, a utilização de ensaios que avaliem possíveis alterações da homeostasia do organismo exposto à quimioterapia é imprescindível.

Os tratamentos com 50 mg/kg do O.E.H. ou fenchona (30 e 60 mg/kg) produziram um aumento no consumo de água quando comparados aos controles sadio e transplantado. Os grupos tratados com O.E.H (100 ou 150 mg/kg) não apresentaram efeitos clinicamente importantes em relação ao parâmetro consumo de água. Apenas o tratamento com 150 mg/kg do O.E.H. promoveu alteração no consumo de ração. Por outro lado, os tratamentos com 5-FU e O.E.H. (100 e 150 mg/kg) induziram significativa perda de peso nos animais, em comparação com os grupos controle e sadio. O 5-FU, especificamente, possui muitas reações adversas tais como mielossupressão, diarreia, perda de peso e hemorragias nos pulmões, intestinos e anorexia (HEIDELBERGER et al., 1958; EL-SAYYAD et al., 2009; GOODMAN; GILMAN, 2006). Durante a quimioterapia antineoplásica com outros agentes farmacológicos também é comum a presença de sintomas gastrintestinais como anorexia, vômito, diarreia e náusea (ROQUE; FORONES, 2006; OGATA et al., 2013). Os resultados demonstram que, O.E.H. e fenchona também apresentaram efeitos gastrintestinais indesejáveis, o que é comum para a maioria dos quimioterápicos utilizados na prática clínica (SOUZA et al., 2008).

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis a drogas quimioterápicas (MADDREY, 2005; PORTO,



2005). Como exemplos, pode-se citar disfunções hepáticas induzidas por mitramicina e toxicidade renal causada por docetaxel (SANDELIN; THOMPSON; BONDESON, 1991; TAKIGAWA et al., 2004)

Os hepatócitos (células metabolicamente complexas) contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. A atividade de duas enzimas em especial é de extrema importância para avaliação da função hepática, a aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT). Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento desse tipo de lesão. Apesar de poderem também estar aumentadas em outros órgãos, elas são os principais marcadores de lesão celular, especialmente hepatopatias (HENRY, 2008; BRANCO, 2009). Os tratamentos com O.E.H. ou com 5-FU, não induziram alterações nos níveis plasmáticos das transaminases ALT e AST, sugerindo que O.E.H. possui baixa toxicidade hepática, nas doses avaliadas. Entretanto, os tratamentos com a fenchona (30 ou 60 mg/kg) induziram uma diminuição nesses parâmetros em comparação aos grupos controles sadio e transplantado. Esses dados sugerem que a fenchona pode ter promovido danos hepáticos, pois segundo Miazzi e colaboradores (2005) alterações mais graves e persistentes como fibrose, podem produzir pouco extravasamento hepatocelular, o que resulta em níveis normais ou diminuídos dessas enzimas (FRANCISCATO et al., 2006).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina. A ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática. É filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). Tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da ureia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da ureia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina (HENRY, 2008).

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica em energia. Sob condições fisiológicas, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica, creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. A creatinina

sérica elevada está associada com uma redução da taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008) e, portanto, distúrbios renais.

Apenas o tratamento com O.E.H. na dose de 150 mg/kg provocou aumento nos níveis de ureia quando comparado aos demais grupos. Porém, este mesmo tratamento não induziu alteração na creatinina. Como na avaliação da função renal, a ureia deve ser avaliada conjuntamente com a creatinina, conclui-se que essa elevação urêmica não possui importância clínica.

Dentre os efeitos adversos mais comuns na quimioterapia, estão as alterações hematológicas. Quanto à toxicidade hematológica, as alterações mais frequentes nos pacientes são neutropenia, anemia, leucopenia e plaquetopenia (ROQUE; FORONES, 2006).

Uma diminuição nos níveis de hemoglobina e hemácias é uma complicação comumente observada em pacientes oncológicos. Frequentemente não existem sinais de infiltração neoplásica da medula óssea, perdas sanguíneas, hemólise, distúrbios endócrinos, renais ou hepáticos, nem de deficiências nutritivas que justifiquem a anemia: deve-se, exclusivamente, à presença do próprio tumor. A anemia presente no paciente oncológico pode ter diversas causas: *i*) reações imunológicas, tais como produção de citocinas inflamatórias em resposta à presença das células tumorais (a chamada anemia crônica do câncer); *ii*) supressão da hematopoiese induzida pelo tratamento; *iii*) produção deficiente de eritropoetina pelos rins; e *iv*) supressão intrínseca da medula óssea pelo clone celular maligno (como em neoplasias hematológicas), dentre outras (ZUCKERMAN, 1998).

Os resultados obtidos demonstram que o implante do tumor, por si só, foi capaz de reduzir significativamente o número de hemácias, a quantidade de hemoglobina e o hematócrito como se observa comparando os dados do grupo controle transplantado em relação ao controle sadio, o que corrobora com o quadro descrito anteriormente. Todos esses parâmetros foram significativamente alterados após tratamento com 5-FU, O.E.H. (100 e 150 mg/kg) ou fenchona (60 mg/kg) em relação ao controle transplantado, entretanto, essa alteração foi no sentido de recuperar os valores desses parâmetros para os níveis dos animais do controle sadio. Isso significa que a forte influência do tumor em induzir redução nesse parâmetros, por diversos mecanismos, foi compensada pelo tratamento com O.E.H., especialmente na dose de 150 mg/kg e com fenchona de 60 mg/kg, mostrando que esse produto natural mesmo na presença do tumor não interfere nesses parâmetros e portanto, não induz toxicidade em nível de células sanguíneas, bem como na hematopoiese. O tratamento com O.E.H. (50 mg/kg) e fenchona (30 mg/kg) reverteram as alterações induzidas pela presença do tumor apenas para o parâmetro hematócrito.

Avaliando os índices hematimétricos, observa-se que o grupo tratado com a dose de 50 mg/kg do O.E.H. ou 30 mg/kg da fenchona apresentou aumento no índice VCM e redução de CHCM, quando comparado aos grupos controles sadio e transplantado e no grupo tratado com 30 mg/kg ocorreu ainda uma aumento no índice de HCM. Baseados nos índices hematimétricos, as anemias podem ser classificadas morfológicamente como normocítica (VCM normal), macrocítica (VCM aumentado), microcítica (VCM diminuído), normocrômica (CHCM normal) e hipocrômica (CHCM diminuído). Dessa forma, a não reversão dos efeitos produzidos na contagem de hemácias e hemoglobina pelo implante do tumor, aliado aos dados das alterações nos índices hematimétricos para os tratamentos com 50 mg/kg do O.E.H. e 30 mg/kg da fenchona, podem sugerir o desenvolvimento de uma anemia do tipo macrocítica e hipocrômica nos animais desses grupos.

De acordo com Gad (2007), a anemia é definida clinicamente como a condição caracterizada por uma concentração de hemoglobina abaixo do limite de referência. A contagem de glóbulos vermelhos e o hematócrito podem ou não ser proporcionalmente inferior, dependendo da causa da anemia. Quando há alteração no tamanho das células e na concentração de hemoglobina, estas são refletidas pelos índices VCM e CHCM, conforme foi observado nos tratamentos com O.E.H 50 mg/kg ou fenchona 30 mg/kg.

A inoculação do tumor, por si só, causa uma reação leucemoide nos animais transplantados, o que pode ser observado pelo aumento de leucócitos totais no controle transplantado em comparação com o sadio. Esse aumento também foi observado nos grupos tratados com as menores doses do O.E.H. e fenchona em comparação aos grupos controle transplantado e sadio. Esse dado corrobora com outros dados da literatura que descrevem esse tipo de reação na presença do tumor (KODAMA; SENDO; KOBAYASHI, 1974; OKAWA et al., 1992; SATO et al., 2005; LINS et al., 2009). Um dos riscos da quimioterapia e radioterapia no tratamento de pacientes com câncer é o desenvolvimento de leucopenia, a qual substancialmente aumenta o risco de infecções (TAKIGUCHI et al., 2001; BEZERRA et al., 2008). O tratamento com o quimioterápico 5-FU ou O.E.H ou fenchona nas maiores doses, corroborando com os dados da literatura, induziram uma diminuição dos leucócitos totais quando comparados aos grupos controles sadio e transplantado, causando ainda granulocitopenia.

Os índices dos órgãos são utilizados para avaliar possíveis alterações induzidas por drogas nos tecidos. Essas possíveis alterações podem levar a uma mudança no seu peso, modificando assim, o índice analisado. O tratamento com a fenchona (60 mg/kg) e com o antineoplásico 5-FU levou a um aumento no índice do coração, corroborando com a literatura

que mostra que a cardiotoxicidade, como pericardite aguda, é um dos efeitos colaterais mais bem conhecidos durante o uso desse antineoplásico (INANÇ et al., 2012; DALZELL; ABU-ARAFEH; CAMPBELL, 2013).

O sistema imune é uma rede de células, órgãos e mediadores que trabalham juntos para defender o organismo contra ataques por invasores. A degeneração ou atrofia de órgãos imune podem influenciar na função normal do sistema imune. Por exemplo, o baço serve como reservatório para sangue e filtra ou purifica o sangue e linfa que flui através dele. Quando o baço sofre danos ou é removido, o indivíduo é mais susceptível a infecções (YU et al., 2007). O timo, no neonato, exerce um papel essencial no desenvolvimento de tecidos linfoides e no estabelecimento das funções imune (MILLER, 1962a; MILLER et al., 1962), e a timectomia de animais neonatos levam a sua diminuição (MILLER, 1962b; MILLER, 1964). Em animais adultos, o timo está envolvido no estabelecimento e restauração das funções imunes, em particular a produção e desenvolvimento de linfócitos (YOKOZI, 1973). Assim, o timo fornece resistência contra o desenvolvimento de tumores em animais (OGISO et al., 1976). Diversos agentes antitumorais causam significativa involução do baço e timo (BEZERRA et al., 2008). Os tratamentos não provocaram alterações nesses índices, sugerindo que estes não possuem atividade imunodepressora.

Verçosa-Júnior et al. (2006) observaram metástases de carcinoma de Ehrlich no fígado, com grande quantidade de células neoplásicas depositadas acima da cápsula desse órgão. Corroborando com essa informação, observou-se um aumento no índice de fígado dos animais transplantados com células do carcinoma de Ehrlich e em ambos os grupos tratados com fenchona, quando comparado aos animais do grupo controle sadio. Por outro lado, os tratamentos, seja com O.E.H. ou com o 5-FU, alteraram este parâmetro quando comparado ao grupo controle transplantado, não havendo diferença quando comparado ao grupo controle sadio. Suspeita-se que a ascite, evidenciada no grupo controle transplantado, a qual não estava presente nos grupos expostos aos tratamentos com O.E.H., seja a responsável pela presença da infiltração hepática pelas células do carcinoma de Ehrlich.

A análise histopatológica não evidenciou alterações significativas nos rins dos animais tratados com O.E.H. demonstrando baixa toxicidade do composto sobre esse órgão.

O fígado é o maior e mais complexo dos órgãos internos, envolvido com a síntese de proteínas plasmáticas, lipídios e lipoproteínas, mas também tem função na reserva de energia e síntese de vários hormônios (HENRY, 2008). Dessa forma, assim como os rins, o fígado é um órgão susceptível aos efeitos dos antineoplásicos.

A célula hepática predominante é o hepatócito, responsável, dentre outras funções, pela detoxificação de xenobióticos (SIRICA et al., 2008). Esta célula encontra-se rodeada de capilares sinusoides e de vasos linfáticos. As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusoides e podem ser encontradas em todo o fígado (MATOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

A forma atual de considerar a organização funcional do fígado, aceita uma unidade microcirculatória denominada de ácino hepático. É uma porção do parênquima irrigado por um espaço porta e com uma vênula hepática terminal na periferia (CORMACK, 1996; YOUNG; HEATH, 2000).

A análise histopatológica dos fígados dos animais do grupo controle transplantado mostrou a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor) justificando assim o aumento no índice do fígado nesse grupo. Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático maior que os tratados com as maiores doses do óleo em estudo (50, 100 ou 150 mg/kg), o que é corroborado pela análise do índice do fígado, onde os grupos tratados com o O.E.H não sofreram alteração no fígado quando comparados ao grupo controle sadio. Em relação ao tratamento com O.E.H. foi observada uma portite linfoistiocitária discreta, reacional, com rara e focal atividade hepatocitolítica. Entretanto, alguns estudos demonstram que essas alterações ocorridas em ambos os grupos tratados estão relacionadas à fraca hepatotoxicidade e, ainda, a retirada da droga ou ajuste de dose, geralmente conduz a uma rápida melhora e reversão dos danos (TORTI, et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007). Foi ainda observada a presença de portite neutrocitária e capsulite. Tais aspectos devem estar relacionados com a doença neoplásica sistêmica com repercussão no fígado. Como relatado na literatura, às células tumorais podem escapar como mecanismo de defesa contra o tratamento. Como o implante tumoral foi realizado no mesmo local de administração da droga (intraperitoneal), as células podem ter escapado para o fígado (REBUCCI; MICHIELS, 2013).

O tratamento do câncer tem como principal objetivo a erradicação da doença. Entretanto, nas situações onde a cura é impossível, o foco passa a ser a melhoria dos sintomas e a preservação da qualidade de vida associada a um aumento de sobrevida dos pacientes (INCA, 2011). Novos agentes quimioterápicos estão associados ao aumento de sobrevida em pacientes com alguns tipos de câncer (OLIVEIRA; MELO, 2011).

Nesse contexto, O.E.H. induziu um importante aumento na sobrevida dos animais expostos a todas as doses, quando comparado ao grupo controle.

A maior parte dos quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao DNA e mutações, que podem induzir a formação de outras células neoplásicas (SUBHASHINI, 2005). O teste de micronúcleo está relacionado a investigação de toxicidade genética *in vivo* (MATEUCA et al., 2006). Este teste detecta alterações genômicas e/ou dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. Embora a toxicidade genética não seja medida de carcinogenicidade, está frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (AZEVEDO et al., 2003; REZENDE; PALHAES; CUNHA, 2006).

A ciclofosfamida é um agente alquilante, utilizado no tratamento de neoplasias em geral. Este agente inibe a replicação do DNA e a transcrição do RNA pelo cruzamento inter e intra - cadeias (ROESER et al., 1978; PEREIRA et al., 2004). Como sua mutagenicidade é amplamente conhecida utiliza-se essa substância para realizar ensaios de micronúcleo como droga padrão (JUNIOR, 2012). Os resultados obtidos mostram que a ciclofosfamida, como já era esperado, induziu o aparecimento de eritrócitos micronucleados no sangue periférico, caracterizando-o como um agente antineoplásico genotóxico. O tratamento com O.E.H produziu genotoxicidade apenas na maior dose (300 mg/kg) que é o dobro da dose testada para atividade antitumoral do referido óleo. Esses resultados mostram que O.E.H. apresenta baixo efeito genotóxico *in vivo*, nas condições avaliadas.

Considerando os dados apresentados, podemos inferir que o óleo essencial das partes aéreas de *Hyptis umbrosa* apresenta baixa toxicidade e potente atividade antitumoral *in vivo*, apesar de não apresentar efeitos *in vitro*.

Esse trabalho apresenta dados importantes, tanto do ponto de vista farmacológico como toxicológico, que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais, especialmente de mecanismo de ação, e posteriormente testes clínicos com o referido óleo essencial. Portanto, os dados mostram que o reino vegetal continua sendo uma importante fonte de produtos farmacologicamente ativos, especialmente contra o câncer.

CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o óleo essencial das partes aéreas de *Hyptis umbrosa* e seu componente majoritário, a fenchona, conclui-se que:

- O.E.H. e fenchona apresentaram moderado e baixo efeito citotóxico em eritrócitos de camundongos, respectivamente;
- O.E.H. e fenchona não apresentaram efeito antitumoral *in vitro* em linhagens de células tumorais;
- O.E.H. apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos;
- O.E.H. e fenchona apresentaram potente atividade antitumoral *in vivo* no modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- O mecanismo de ação antitumoral do O.E.H. envolve provavelmente a interferência na progressão do ciclo celular e indução de morte celular por apoptose;
- O.E.H. e fenchona apresentaram baixa toxicidade *in vivo*, em animais transplantados submetidos a doses repetidas (nove dias);
- O.E.H. aumentou a sobrevivência dos animais inoculados com tumor de Ehrlich;
- O.E.H. induziu moderada genotoxicidade nas condições avaliadas.



**ROLIM, T. L.**

**REFERÊNCIAS**

## 7 REFERÊNCIAS

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.

AGGARAL, B. B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v.72, p. 1605-1621, 2006.

AGUILLÓN JC, CONTRERAS J, DOTTE A, CRUZAT A, CATALÁN D, SALAZAR L. New immunological weapons for medicine in the 21st Century: biological therapy based on the use of the latest generation monoclonal antibodies. **Revista Médica de Chile**. v. 131, p. 1445-53, 2003.

AHMAD S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. **Chemical Biodiversity**, v. 7, p. 543–566, 2010.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis: Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 133-138, 1991.

ALONSO-CASTRO, A.J., VILLARREAL, M.L., SALAZAR-OLIVO, L.A. Plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 945–972, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPEZ, 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.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; ARANA-ARGÁEZ, V.; JUÁREZ-VÁZQUEZ, M. C.; CHÁVEZ, M.; CARRANZA-ÁLVAREZ, C.; GASPAR-RAMÍREZ, O.; ESPINOSA-REYES, G.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; ORTIZ-ANDRADE, R.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 888– 894, 2012.

ALTMANN, K. H.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature--natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Natural Products Rep.**, v.24, p.327, 2007.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.23, p.1256, 1983.

ANDRADY C, SHARMA SK, CHESTER KA, Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy. **Immunotherapy**. v. 3, p. 193-211, 2011.

**ROLIM, T. L.**

APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

ARAUJO, R. P., McELWAIN, D. L. S. A history of the study of solid tumor growth: the contribution of mathematical modelling. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 66, p. 1039-1091, 2004.

ARUNG, E. T.; MATSUBARA, E.; KUSUMA, I. W.; SUKATON, E.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. **Fitoterapia**, v. 82, p. 198, 2011.

ARAVINDARAM, K.; YANG, N-S. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy, **Planta Médica**. v. 76, p. 1103–1117, 2010.

ASANAMI, S., SHIMONO, K., SAWAMOTO, O., KURISU, K., AND UEJIMA, M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 347, n. 2, p. 73-78, 1995.

ASSIS, F. A., **Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich**. [Tese de mestrado- Universidade Estadual de Minas Gerais], Belo Horizonte, MG, 2007.

AZEVEDO, L.; GOMES, J.C; STRINGHETA, P.C.; GONTIJO, A.M.; PADOVANI, C.R.; RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chemical and Toxicology**, v. 41, p.1671-1671, 2003.

BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochemical Pharmacology** v. 77, p. 1447, 2009.

BALA, A.; KAR, B.; HALDAR, P.K.; MAZUMDER, U. K.; BERA, S.; Evaluation of anticancer activity of *Cleome gynandra* on Ehrlich's ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 131–134, 2010.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D.; **Life Science**, v.78, p.431, 2005.

BARBOSA, P. P. P.; RAMOS, C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 2, p. 114–115, 1992.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARTAK, J.; LUKAS, J. Are all cancer genes equal? **Nature**, v. 411, n. 6841, p.1001-1002, 2001.

**ROLIM, T. L.**

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BELANGER, J. T. Perillyl alcohol: applications in oncology. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n. 6, p. 448-57, 1998.

BEGUM, G. *In vivo* biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. **Pesticide Biochemical and Physiology**, v. 82, p. 185-196, 2005.

BERNARDI, M. M.; MORAES, R. C.; VAROLI, F. M. F.; OSTI, S. C. Ecotoxicologia. In: SPINOSA, H. de S.; GÓMIAS, S. L.; PALERMO-NETO, **Jornal de Toxicologia aplicada à medicina veterinária**, p. 942, 2008.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE 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. 156-63, 2008.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE 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, p. 156-63, 2008.

BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224-31, 2009.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE 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, p. 156-63, 2008.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI E. M. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81-86, 2001.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v. 31, n. 3, p. 277-281, 2003.

BLAGOSKLONNY, M. V. Drug-resistance enables selective killing of resistant leukemia cells: exploiting of drug resistance instead of reversal. **Leukemia**, v. 13, p. 2031, 1999.

**ROLIM, T. L.**

BORDIGNON, S. A. L. **O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul.** [Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul], Rio Grande do Sul, RS, 1990.

BORGES, A. Changes in hematological and serum biochemical values in Jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cipermethrin. **Chemosphere**, v. 69, p. 920-926, 2007.

BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do *Jundiá rhamdia quelen*.** [Tese Doutorado em Ciências Biológicas -Universidade Federal do Rio Grande do Sul], Porto Alegre, SC, 2005, 175f.

BRAMSON, H. N.; CORONA, J.; DAVIS, S. T.; DICKERSON, S. H.; EDELSTEIN, M.; FRYE, S. V.; GAMPE, R. T., JR.; HARRIS, P. A.; HASSELL, A.; HOLMES, W. D.; HUNTER, R. N.; LACKEY, K. E.; LOVEJOY, B.; LUZZIO, M. J.; MONTANA, V.; ROCQUE, W. J.; RUSNAK, D.; SHEWCHUK, L.; VEAL, J. M.; WALKER, D. H.; KUYPER, L. F.; J. Oxindole-based inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2): design, synthesis, enzymatic activities, and X-ray crystallographic analysis. **Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4339, 2001.

BRANCO, A. C. S. C. **Avaliação da toxicidade pré-clínica crônica de *Foeniculum vulgare* Mill.** [Tese de Doutorado pela Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba], João Pessoa, JP, 2009, f. 136.

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. **Ministério da Saúde.** Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2011.

BRASIL CNS. Resolução CNS 251/97 - Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial da União**. p. 21117, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o "Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos". **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2004.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 269-90, 1999.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 155, 1998.

**ROLIM, T. L.**

BUENO, A. X.; MOREIRA, A. T. S.; SILVA, F. T.; ESTEVAM, C. S.; MARCHIORO, M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 317–323, 2006.

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

CANEL C.; MORAES, R. M.; DAYAN, F. E.; FERREIRA, D. Podophyllotoxin. **Phytochemistry**, v. 54, p. 115, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p.58, 2000.

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

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**. v. 7, n. 1, 2006.

CASTELLO BRANCO, M. V.; ANAZETTI, M. C.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F.; FRUNGILLO, L. ; HAUN, M.; MELO, P. S. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana* inhibit cell growth and induce differentiation in human leukemia cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v. 64, n. 9-10, p. 650-656, 2009.

CASTRO, R. Câncer na Mídia: uma questão de saúde pública. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, p. 41, 2009.

CAVALINI, L. T.; CRUZ, P. S.; SILVA, G. M.; SILVA, I. F. Perfil da Assistência em um Hospital Universitário: Informações do Registro Hospitalar de Câncer, 2000-2009. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 153-161, 2012.

CHANDER S. K.; LANSDOWN, A. G.; LUQMANI, Y. A.; GOMM J. J.; COOPE, R. C.; GOULD, M. N.; COOMBES, R. C. BR. **Journal of Cancer**, v. 69, p. 879, 1994.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal** v. 8, p. 239, 2006.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals**. suppl 1, p. 147-175, 2005.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pp: 270-285, 1996.

**ROLIM, T. L.**

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

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A.; **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1321, 2009.

CHIANG, L. C.; LIN, I. C.; KUO, P. L.; LIN, C. C. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. **Cancer Lett**, v. 237, p. 207-214, 2006.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: Choy WN (ed) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York, Marcel Dekker, p. 93-113, 2001.

CORDELL, C. E.; FARNSWORTH, N. R.; BEECHER, C. W. W.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; BROWN, D. M.; O'NEILL, M. J.; LEWIS, J. A.; TAIT, R. M.; HARRIS, T. J. R. In Human Medicinal Agents from Plants; Kinghorn, A. D.; Balandrin, M. F., eds.; **American Chemical Society-ACS Symposium Series 534**: Washington - DC., p. 191-204, 1993.

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 Química**, v.2, n. 1, p.47-58, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R. PESSOA, C. In **Botanical Medicine in Clinical Practice**; Watson, R. R.; Preedy, V. R., eds.; CAB International: Cambridge, cap. 29, 2008.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304–309, 2005.

COSTA, R.M.A.; MENK, C.F.M. Biomonitoramento de Mutagênese Ambiental. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, p. 24-26, 2000.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 232–244, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug Development. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 313–331, 2009.

CSGMT (Colaborative Study Group for the Micronucleus Tests). **Mutagenesis**, Oxford; Washington, v. 10, p. 153-159, 1995.

**ROLIM, T. L.**

CURTI, J. F.; COTTER, T. G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, **Cellular Signalling**, v. 15, n. 11, p. 983-92, 2003.

CHAIIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 501, 2007.

CSEKE, L. J.; LU, R.C.; KORNFELD, A.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A. How and why these compounds are synthesized by plants. In: KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**, 2 ed., p. 81-83, 2006.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo experimental**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP], São Paulo, SP, 1989, 148 f.

DALZELL, J. R.; ABU-ARAFEH, A.; CAMPBELL, R. T. Cardiotoxicity with 5-fluorouracil based agents: rechallenge cannot currently be safely advised. **American Journal of Cardiology**, v.111, n.3, p. 454, 2013.

DANIEL, P. T.; WIEDER T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss os death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, p. 1022-32, 2001.

DARZYNKIEWICZ', S.; DEL BINO, B. G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F.. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. **Cytometry**, v.13, p. 795-808, 1992.

DAVIS, P.; Aromaterapia, Ed. Martins Fontes: São Paulo, 1996.

DAVIS, S. T.; BENSON, B. G.; BRAMSON, H. N.; CHAPMAN, D. E.; DICKERSON, S. H.; DOLD, K. M.; EBERWEIN, D. J.; EDELSTEIN, M.; FRYE, S. V.; GAMPE JR., R. T.; GRIFFIN, R. J.; HARRIS, P. A.; HASSELL, A. M.; HOLMES, W. D.; HUNTER, R. N.; KNICK, V. B.; LACKEY, K.; LOVEJOY, B.; LUZZIO, M. J.; MURRAY, D.; PARKER, P.; ROCQUE, W. J.; SHEWCHUK, L.; VEAL, J. M.; WALKER, D. H.; KUYPER, L. F. Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. **Science**, v. 291, p. 134, 2001.

DEANGELIS, L. M. Brain tumors. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 2, p. 114-123, 2001.

DERTINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; MCNAMEE, J. P.; HAYASHI, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.

DE OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. D. R. R.; KATO, L.; DA SILVA, C. C.; FERREIRA, H. D.; SOUZA, L. K. H.; Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of



**ROLIM, T. L.**

*Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 756–759, 2004.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Opinion in Oncology**, v. 16, p. 36–43, 2009.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal Plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69 – 91, 2003.

DIWANAY, S.; CHITRE, D.; PATWARDHAN, B. Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 49-55, 2004.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DUDAI, N.; WEINSTEIN, Y.; KRUP, M.; RABINSKI, T.; OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Medica**, New York, v. 71, p. 484-488, 2005.

ECCLES S. A. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, p. 393-406, 2001.

EDMONSON, J. H.; PETERSEN, I. A.; SHIVES, T. C.; MAHONEY, M. R.; ROCK, M. G.; HADDOCK, M. G.; SIM, F. H.; MAPLES, W. J.; O'CONNOR, M. I.; GUNDERSON, L. L.; FOO, M. L.; PRITCHARD, D. J.; BUCKNER, J. C.; STAFFORD, S.; **Cancer**, v. 94, p. 786, 2002.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EFFERTH, T.; LI, P. C. H.; KONKIMALLA, V. S. B.; KAINA, B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, p. 353, 2007.

EGGERT, U. S.; MITCHISON, T. J.; FIELD, C. M. Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 543-66, 2006.

EHRLICH, P. Experimentelle carcinomstudien na Mäusen. **Arb Inst Exp Ther Frankfurt**, v. 1, p. 78-80, 1906.

EKHOLM, S. V.; ZICKERT, P.; REED, S. I.; ZETTERBERG, A. Accumulation of cuclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 3256-3265, 2001.

ESEQUIVEL, B.; CALDERÓN, J. S.; SÁNCHEZ, A. A.; RAMAMOORTHY, T. P.; FLORES, E. A.; DOMÍNGUEZ, R. M.; **Revista Latinoamericana de Química**, v. 24, p. 44, 1996.

**ROLIM, T. L.**

EXTERMANN, M.; CHEN, H.; CANTOR, A. B.; CORCORAN, M. B.; MEYER, J.; GRENDYS, E.; CAVANAUGH, D.; ANTONEK, S.; CAMARATA, A.; HALEY, W. E.; BALDUCCI, L.; **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1466, 2002.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 381–391, 2005.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. Pathogenesis of Ascites in Mice with Peritoneal Carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, p. 547-549, 1976.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, p. 125-131, 1990.

FERLAY, J; AUTIER, P.; BONIOL, M.; HEANUE, M.; COLOMBET, M.; BOYLE, P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Annals of Oncology**, n. 18, p. 581-92, 2007.

FERNANDES, A. **Fitogeografia brasileira**. Fortaleza: Multigraf editora, 1998.

FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p.1-3, 2003.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20 (Supl. 2), 2005.

FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K., New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 187-215, 2005.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales: el diocórides renovado**. 12ª ed., Barcelona: Editorial Labor, p. 640, 1990.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

FRACASSO, P. M.; WESTERVELDT, P.; FEARS, C. A.; ROSEN, D. M.; ZUHOWSKI, E. G.; CAZENAVE, L. A.; LITCHMAN, M.; EGORIN, M. J. Phase I study of paclitaxel in combination with a multidrug resistance modulator, PSC 833 (Valspodar), in refractory malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 1124, 2000.

FRANÇA, E. L.; ROSA, D. E.; FERRARI, C. K. B.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Cancer epidemiology in the municipality of Catalao, Goias, Brazil. **Journal of Management and Primary Health Care**, v.3, n.1, p. 34-42, 2012.

FRAZÍLIO, F. O. **Avaliação dos precursores da apoptose neuronal em preparados citosólicos, mitocondriais e nucleares do córtex cerebral frontal e hipocampo de porcos**

**ROLIM, T. L.**

**submetidos a hemodiluição normovolêmica aguda.**[Tese de doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo], São Paulo, SP, 2011.

FREIRE, I. S. **Avaliação da genotoxicidade, citotoxicidade e da hematotoxicidade do complexo esporo-cristal de estirpes recombinantes de *Bacillus thuringiensis* em organismos não-alvo** (Tese de mestrado, Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2012, 112f.

FRESHNEY, R. I. In: **Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, p. 486, 1994.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology in vitro**. v. 14, p. 513-516, 2000.

GARCELL, H. G.; ARZOLA, E. G.; ISLA, J. G.; ZALDÍVAR, E. S., MONTERO, P. P. Tendencias de la morbilidad y letalidad hospitalaria por cáncer. **Anales de Medicina Interna**, v. 24, n.1, p. 12-16, 2007.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J. P.; DE BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, E. L.; COSSARIZZA, A. Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 591356, 2011.

GILL, P. S.; TATTERSALL, M. H. N. Rastreamento e detecção precoce. In: LOVE, R. R. (Ed.). **Manual de oncologia clínica**. 6. ed. Berlin: Springer–Veilag São Paulo: Fundação Oncocentro, cap. 07, p. 117-138, 1999.

GILL, R.; SORIANO, M.; BLOMGREN, K.; HAGBERG, H.; WYBRECHT, R.; MISS M. T.; HOEFER, S.; ADAM, G.; NIEDERHAUSER, O.; KEMP, J. A.; LOETSCHER, H. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. **Journal of Cerebral Blood & Flow & Metabolism**, v. 22, p. 420-30, 2002.

GILMAN, A.; PHILLIPS, F. S. **Science**, v.103, p. 409, 1946.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, p. 1-10, 2013.

GOODSELL, D.; DICKERSON, R. E. Isohelical analysis of DNA groove-binding drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 727, 1986.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GU, S.; TIAN, Y.; CHLENSKI, A.; SALWEN, H. R.; LU, Z.; RAJ, J. U.; YANG, Q. Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. **Anticancer Drugs**. v. 23, n. 10, p. 1054-66, 2012.

GUARRERA, M. P. Traditional phythotherapy in central Italia. **Fitoterapia**, v. 76, p. 1-25, 2005.

GUILHOT, F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. **The**

**ROLIM, T. L.**

**Oncologist**, v.9, p. 271-281, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, n. 8, p. 313–331, 2009.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273-6, 1996.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 3, p.51, 2005.

GUIL, J. L.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; TORIJA, E. Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 99, 1997.

GUPTA S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 22, p.15-20, 2003.

HAAG, J. D.; LINDSTROM, M. J.; GOULD, M. N. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. **Cancer Res.** v. 52, n. 14, p. 4021-6, 1992.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 331, 2002.

HAIL, N. Jr.; Cortes, M.; Drake, E. N.; Spallholz, J. E. Cancer chemoprevention: a radical perspective. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n. 2, p. 97-110, 2008.

HALDAR, P. K.; KAR, B.; BALA, A.; BHATTACHARYA, S.; MAZUMDER, U. K. Antitumor activity of Sansevieria roxburghiana rhizome against Ehrlich's ascites carcinoma in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1337–1343, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, n. 100, p. 57–70, 2000.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. **Current Opinion Biology**, v.13, n. 6, p. 778-784, 2001.

HARBELL, J. W.; KOONTZ, S. W.; LEWIS, R. W.; Lovell, D. Acosta, D. Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 79-126, 1997.

HARPER, J.; BROOKS, G. The mammalian cell cycle. In: Humphrey, T.; Brooks, G. **Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols**. New York: Springer Verlag, p 113-153, 2004.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discover Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HARVEY, A. L., CREE, I. A. High-throughput screening of natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, p. 1080-1086, 2010.

HASKEL, C. M.; **Cancer Treatment**, Saunders: Philadelphia, 1990.

**ROLIM, T. L.**

HE, L.; MO, H.; HADISUSILO, S.; OURESHI, A. A.; ELSON, C. E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 668-74, 1997.

HEDDLE J. A. A rapid *in vitro* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 239-249, 2006.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, A.C. Antinociceptive Activity of Alpha-Pinene And Fenchone. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 363-369, 2008.

HIRSCHI, A.; Cecchini, M.; Steinhardt, R. C.; Schamber, M. R.; Dick, F. A.; Rubin, S. M. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 17, p. 1051-1057, 2010.

HOENE, F. C.; **Plantas e substância vegetais tóxicas e medicinais**, Graphicars: São Paulo, 1939.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. **Mol. Oncol.** v. 6, p. 155, 2012.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n.4, 2002.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, p. 188, 2002.

HUST, M.; FRENZEL, A.; MEYER, T.; SCHIRRMANN, T.; DÜBEL, S. Construction of human naive antibody gene libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 907, p. 85-107, 2012.

INANÇ, M.; AKPEK, M.; INANÇ, M. T.; KAYA, M. G. Acute pericarditis during 5-fluorouracil, docetaxel and cisplatin therapy. **Turk Kardiyol Dern Ars**, v. 40, n. 6, p. 532-537, 2012.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; p.118, 2011.

ISHIKAWA, H.; COLBY, D. A.; SETO, S.; VA, P.; TAM, A.; KAKEI, H.; RAYL, T. J.; HWANG, I.; BOGER, D. L.; **J. Am. Chem. Soc.** v. 131, p. 4904, 2009.

ISMAN, M. B.; MIRESMAILLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 197-204, 2011.

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

**ROLIM, T. L.**

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP.** [Dissertação de Mestrado em Ecologia de Agossismtemas - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo], Piracicaba, SP, 2004.

JEFFERS, L.; CHURCH, D.; GOULD, M.; WILDING, G. The effect of perillyl alcohol on the proliferation of human prostatic cell lines. **Proc Am Assoc Cancer Res.** v. 36, p. 303, 1995.

JORDAN, M. A.; WILSON, L.; **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, p. 253, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N Engl J Med**, v. 346, n. 9, p. 645-652, 2002.

KAPOOR, S. Combretastatin A4 and its emerging antineoplastic effects. **Surgery.** v. 153, n. 6, p. 881, 2013.

KARCHER, D.; PHERSON, M. **Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens.** In: McPherson R, Pincus M, editores. *Henry's - Clinical diagnosis and management by laboratory methods.* Philadelphia: Elsevier Saunders; p.502–507, 2011.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry.** v. 57, n. 5, p. 621–623, 2001.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica.** 9 ed. McGraw-Hill Medical: USA, 1088, 2003.

KAWAMORI, T.; TANAKA, T.; HIROSE, Y.; OHNISHI, M.; MORI, H. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 369, 1996.

KELLOFF, G. J., KELLOFF, G. J.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; MALONE, W. A.; BOONE, C. W.; KOPELOVICH, L.; HAWK, E. T.; LIEBERMAN, R.; LAWRENCE, J. A.; ALI, I.; VINER, J. L.; SIGMAN, C. C. Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 467s-71s, 2000.

KERBEL, R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n.1, p. 134-143, 2003.

**ROLIM, T. L.**

KLEIN, G.; KLEIN, E. Conversion of solid neoplasm into ascites tumors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 63, p. 640-661, 1956.

KOBUNAI, T., WATANABE., FUKUSATO, T. Antitumour activity of S-1 in combination with cetuximab on human gastric cancer cell lines *in vivo*. **Anticancer Research**, v. 31, n. 11, p. 3691-6, 2011.

KRISHNA R.; MAYER D. L. Liposomal doxorubicin circumvents PSC 833-free drug interactions, resulting in effective therapy of multidrug-resistant solid tumors. **Cancer Research**, v. 57, p. 5246, 1997.

KHUNT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 485-494, 1994.

KODAMA, T.; SENDO, F.; KOBAYASHI, H. Leukemoid reaction in BALB/c mice bearing transplanted tumors. **Cancer Research**, v. 34, p. 176–180, 1974.

KORNBERG, R.D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome fundamental particle of the eukaryotic chromosome. **Cell**, v. 98, p. 285–294, 1999.

KRYSKO, D.V.; VANDEN, B. T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, 8: 547-566, 2009.

LEAL J. H. S.; CUBERO D.; DEL GIGLIO A.; Palliative hormonal therapy for breast cancer: a practical review literature; **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 8, n. 4, p.338-43, 2010.

LEE, S. T.; STEGELMEIER, B.L.; GARDNER, D. R.; VOGEL, K. P. The isolation and identification of steroidal sapogenins in switchgrass. **Natural Toxins**. v. 10, p. 273-281, 2001.

LI, H.; WANG, P.; LIU, Q.; CHENG, X.; ZHOU, Y.; XIAO, Y. Cell cycle arrest and cell apoptosis induced by Equisetum hyemale extract in murine leukemia L1210 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 322-329, 2012.

LIMA, G.,F.,C.; AGUIAR, E. M.; MACIEL, F.C.; LIMA, C. A. C.; PEREIRA, G. F.; GUEDES, F. X.; GARCIA, L. R. U. C. **Flor-de-seda - fonte de feno de qualidade para os sertões**. In: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. (Ed). Armazenamento de Forragens para a Agricultura Familiar. Natal: EMPARN, pp.14-18, 2004.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, p. 20-6, 2009.

LIU, Y-Q.; MU, Z-Q.; YOU, S.; TASHIRO, S-I.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Fas/FasL Signaling Allows Extracellular-Signal Regulated Kinase to Regulate Cytochrome c Release in

**ROLIM, T. L.**

Oridonin-Induced Apoptotic U937 Cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1873- 1879, 2006.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, p. 275, 2005.

LOPES, I. S.; SILVA J. E. R. DA; MACHADO, I. A.; SILVA, C. E. M. R. DA; MARINHO, M. G. V.; RANGEL, J. A. F. Levantamento de plantas medicinais utilizadas na cidade de Itapetim, Pernambuco, **Revista de Biologia e Farmácia**, v.7, n. 1, p. 115-121, 2012.

LOPES, M.C.P., **Conjugação de anticorpos anti-antígenos carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer**. (Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012).

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

MA, B.; YEO, W.; HUI, P.; WO, W. M.; JONSON, P. J. Acute toxicity of adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide for early breast cancer - a retrospective review of Chinese patients and comparison with an historic Western series. **Radiotherapy Oncology**, v.62, p. 185, 2002.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; Tice, R.R.; Wild, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v.189, p. 103-1012, 1987.

MACHADO, A. E. D. Photodynamic therapy: Principles, potential of application and perspectives. **Química Nova**. v. 23, p. 237, 2000.

MADDREY, W.C. Drug-Induced Hepatotoxicity. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 83-89, 2005.

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M.; 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.

MAHMOOD, Z.; SHUKLA, Y. Death receptors: targets for cancer therapy. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 6, p. 887-99, 2010.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Reviews Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MANESS, L.; GOKTEPE, I.; AHMEDNA, M. *In vitro* Cancer Research on Ancient Herbal Remedies: A Changing Trend. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 8, p. 13-20, 2012.

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



**ROLIM, T. L.**

MENDITI, K. B. C.; KANG, H. C. The Role of Histones Proteins in Hematological Neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2007.

MANS, D. R. A.; 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. **Oncologist**, v.5, p. 185, 2000.

MARONI, L. C.; SILVEIRA, A. C. O.; LEITE, E. A.; MELO, M. M.; RIBEIRO, A. F. C.; CASSALI, G. D.; SOUZA, C. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M; CALDAS, I. R.; ARAÚJO, M. S. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; OLIVEIRA, M. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 973-984, 2012.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MARTINS, R. T. et al. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75-84, 2012.

MASSARO, F. C. **Estudos ecotoxicológicos com Hydra viridissima (Cnidaria: Hydrozoa)**. [Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo], São Carlos, SP, 108f, 2006.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 515-531, 2006.

MATIDA, A. K.; ZELNIK, R.; PANIZZA, S. Presença dos ácidos ursólicos e 2 $\alpha$ -hidroxi-ursólico Hyptis umbrosa Salzmänn e Eriope crassipes Benthām (Labiatae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.2, 1986.

MATTOS, A. A., DANTAS-CORRÊA, E. B., **Tratado de hepatologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MCCARRON, P. A., OLWILL, S. A., MAROUF, W. M., BUICK, R. J., WALKER, B., SCOTT, C. J., Antibody conjugates and therapeutic strategies. **Molecular Interventions**, v. 5, p. 368-80, 2005.

MEIRELES, J. R. C. **Avaliação genotóxica de esteróides anabolizantes sintéticos com uso do teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos (Mus musculus)** (Tese de doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2012, 65f.

MELO, P. S. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from Cissampelos sympodialis Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology letters**, v. 142, n. 1-2, p. 143-151, 2003.

**ROLIM, T. L.**

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae.**[Tese de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro], Rio de Janeiro, RJ, 1994, 94f.

MENG, L.-H.; DING, J. Induction of bulk and c-myc P2 promoter-specific DNA damage by an anti-topoisomerase II agent salvicine is an early event leading to apoptosis in HL-60 cells. **FEBS Letters**, v. 501, p. 50, 2001.

MENG, L. H.; ZHANG, J. S.; DING, J.; **Biochemistry Pharmacology**, v. 62, p. 733, 2001.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 143–151, 2003.

MESSANA, I.; FERRARI, F.; SOUZA, M. A. de M.; GACS-BAITZ, E. (-)-Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 329-32. 1990.

MICHIELIN, E. M.; [Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina], Santa Catarina, SC, 2009.

MILLER, J. F. A. P. The thymus and the development of immunologic responsiveness. **Science**, v. 144, p. 1544-51, 1964.

MILLER, J. F. A. P.; MARSHALL, A. H. E.; WHITE, R. G. The immunological significance of the thymus. **Advances in Immunology**, v. 2, p. 111-162, 1962.

MILLER, J. F. A. P. Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. **Proceedings of the Royal Society**, v. 156, p. 410–428, 1962 b.

MILLER, J. F. A. P. Role of the thymus in transplantation immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 99, p. 340–354, 1962a.

MILLS, J. J.; CHARI, R. S.; BOYER, I. J.; GOULD, M. N.; JIRTLE, R. L. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Research**, v.55, p. 979, 1995.

MILOT, E.,; FOTOUHI-ARDAKANI, N.; FILEP, J.G. **Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis.** v. 3, n, 397, 2012.

MINAMI, J.; SUZUKI, R.; MAZITSCHKE, R.; GORGUN, G.; GHOSH, B.; CIRSTEAN, D.; HU, Y.; MIMURA, N.; OHGUCHI, H.; COTTINI, F.; JAKUBIKOVA, J.; MUNSHI, N. C.; HAGGARTY, S. J.; RICHARDSON, P. G.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Histone deacetylase 3 (HDAC3) as a novel therapeutic target in multiple myeloma. **Leukemia**, doi: 10.1038/leu.2013.231. [Epub ahead of print], 2013

MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; GACS-BAITZ, E.; COELHO, J. S. B.; DE ALBUQUERQUE, I. L.; CHIAPPETA, A. A.; MELLON, J. F. Umbrosone, an ortho-quinone from *Hyptis umbrosa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 12, p. 3971-3972, 1990.

**ROLIM, T. L.**

MONTENEGRO, R. C.; FARIAS, R. A. F.; PEREIRA, M. R. P.; ALVES, A. P. N. N.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-7, 2008.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drugscreen utilizing a diverse panel of human tumor cell lines in culture. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p.757-766, 1991.

MORAI, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169–177, 2005.

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

MULLER, H. R.; PRADO, K. B.; RUBS, **Epigenetics: a new genetic field**, v.1, n.3, p.61-69, 2008

NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochemistry Science**, v. 23, p. 74-9, 1998.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650-2653, 2006.

NASCIMENTO, P. P.; FONSECA, C. A.; RODRIGUES, A. J. L. Fatores de risco e prevenção contra câncer: abordagem entre alunos de Ciências biológicas (ueg-unucet). **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 1, n. 1, p. 61 – 71, 2012.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1215, p. 60–71, 2011.

NECKEL, G. L. **Atividade Antineoplásica *in vitro* e *in vivo* da chalcona N9 E seu possível mecanismo de ação**. [Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia], Florianópolis, SC, 2011. Número de folhas

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.9, n.1, p.80-92, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v.17, p.215, 2000.

**ROLIM, T. L.**

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v.407, p.810-16, 2000.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacology Research**, v. 59, p. 365, 2009.

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

OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guideline for testing of chemicals** n. 474, 1997.

OGATA, Y.; TANAKA, T.; AKAGI, Y.; ISHIBASHI, N.; TSUJI, Y.; MATONO, K.; ISOBE, M.; SUEYOSHI, S.; KAIBARA, A.; SHIROUZU, K. Multicenter Phase II Study of a New Effective S-1 and Irinotecan Combination Schedule in Patients with Unresectable Metastatic or Recurrent Colorectal Cancer. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 7, p. 21–30, 2013.

OGINO, A.; YOSHINO, A.; KATAYAMA, Y.; WATANABE, T.; OTA, T.; KOMINE, E.; et al. The p15INK4b/p16INK4a/RB1 Pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 64, p. 398-403, 2005.

OGISO, T.; NODA, N.; ASAI, N.; KATO, Y. Antitumor agents. I. Effect of 5-fluorouracil and cyclophosphamide on liver microsomes and thymus of rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 26, p. 445-453, 1976.

OKAWA, Y.; MURATA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, M.; SUZUKI, S. Augmentation of host resistance to *Candida albicans* infection in ascites tumor-bearing mice. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 517–521, 1992.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976, 2002.

OLIVEIRA, M. L. L.; MELO, A. C. Hipertensão Portal não Cirrótica Associada à Oxaliplatina em Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n.1, p. 57-61, 2011.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.

**ROLIM, T. L.**

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeborg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, L.M.; NEPOMUCENO, C.F.; FREITAS, N.P.1; PEREIRA, D.M.S.; SILVA, G.C.; LUCCHESI, A.M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.73-78, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976-984, 2002.

OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer. Novos alvos para tratamento. **Ciência hoje**, v. 38, n. 223, p. 28-33, 2006.

OTTO, S. E. **Enfermagem Prática: oncologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores, 2002.

OTT, M.; NORBERG, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? **Cell Death Differ**. v. 16, p. 1075-82, 2009.

PAL, D.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, S.; ROY, A.; PANDA, C. K.; DAS, S. J. Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway. **Dermatology Science**. 2010, v. 59, p.31, 2010.

PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p.1, 2010.

PAN, L.; CHAI, H-B.; KINGHORN, A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Front Biosci** (Schol Ed). v. 4, p. 142–156, 2013.

PARDEE, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, p. 1286-1290, 1974.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O **genoma humano e o câncer**. In *Oncologia Molecular*. Ferreira, C.G; Rocha, J.C. (Eds) São Paulo, Brasil, Editora Atheneu. P 3-11, 2004.

PECQUEUR, C.; OLIVER, L.; OIZEL, K.; LALIER, L.; VALLETTE, F. M. Targeting Metabolism to Induce Cell Death in Cancer Cells and Cancer Stem Cells. **International Journal of Cell Biology**, Article ID 805975, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/805975>, 2013.

PEDERSEN, J. A. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, n.3, p. 229-253, 2000.

**ROLIM, T. L.**

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Em Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends. Khan, M.; Ather, A., eds.; Elsevier: Amsterdam, cap. 12, 2006.

PHILANDER LA. An ethnobotany of Western Cape Rasta bush medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 578 – 594, 2011.

PISCITELLI, S. C.; BURSTEIN, A. H.; WELDEN, N.; GALLICANO, K. D.; FALLOON, J. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 234, 2002.

PUSZTAI, L.; SIDDIK, Z. H.; MILLS, G. B.; BAST, R. C. J. Physiologic and pathologic drug resistance in ovarian carcinoma--a hypothesis based on a clonal progression model. **Acta Oncologica Stockholm**, v. 37, p. 629, 1998.

POLLIO, A.; DE NATALE, A.; APPETITI, E.; ALIOTTA, G.; TOUWAIDE, A. Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: Ruta spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 469 – 482, 2008.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. [Tese de doutorado, Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde ], Belo Horizonte, MG, 2012.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T.; HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity *in vitro*: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, 2007.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

PURVES, D.; HARVEY, C.; TWEATS, D.; LUMLEY, C.E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, v.10, p. 297-312, 1995.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; SHIVANANDA, T. N. Studies on antimutagenic effects of citral in mice. **Food, Agriculture & Environment**, v. 2, n. 2, p. 62-64, 2004.

RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2723, 1998.

**ROLIM, T. L.**

RAMOS, U. F.; SOLEDADE, S. C.; BAPTISTA, E. R. Utilização de plantas medicinais pela comunidade atendida no programa saúde da família da Pirajá, Belém, PA. **Infarma**, v. 24, n. 5/6, p. 10-18, 2011.

RATHER, M. A.; DAR, B. A.; SOFI, S. N.; BHAT, B. A.; QURISHI, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 1219–1226, 2013.

REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 1, p. 111-21, 2002.

REDDY, B. S.; WANG, C. X.; SAMAHA, H.; LUBET, T.; STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. RAO, C. V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Research**, v. 57, n 3, p. 420-5, 1997.

REZENDE, O. S. J.; PALHAES, L. B.; CUNHA, L. C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT - Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005**. [Monografia de Especialização - Universidade Federal de Goiás], Goiania, GO, 2006, f. 72.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RHIOUANI, H.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, n.3, p. 378-86, 2008.

ROTHHAMMER, T.; BOSSERHOFF, A. K. Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 20, p. 92-111, 2007.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

RIZZO, L. Y. **Atividade anticancer *in vivo* e *in vitro* de *Psidium guajava* L.** (nome popular goiabeira) [Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas] Campinas, SP, 2011.

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

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae)**. [Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo], São Carlos, SP, 2007, 138f.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como

**ROLIM, T. L.**

potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

ROESER, H. P.; STOCKS, A.; SMITH, A. Testicular damage due to cytotoxic drugs and recovery after cassation of therapy. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 8, p. 250-254; 1978.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Archives of Gastroenterology**, v. 43, n. 2, 2006.

RUBINSTEIN, L. V., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., SIMON, R. M., TOSINI, S., SKEHAN, P., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., BOYD, M. R. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal Natural Cancer Institute**. v. 82, p. 1113-119, 1990.

RUFINO, M.S.M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S. Açaí (Euterpe oleraceae) BRS Pará A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. Article in press. **Food Research International**, v. 44, p. 2100-2106, 2010.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biological Chemistry**, v. 385, p.449-64, 2004.

SAKAI, M.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RONE, M. B.; MARTINEZ-ARGUELLES, D. B.; DAGLI, M. L.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Translocator protein (18 kDa) mediates the progrowth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, p. 131–138, 2010.

SALMONM, S. E. **Em Farmacología Básica & Clínica**, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

SANDELIN K, THOMPSON NW, BONDESON L. Metastatic parathyroid carcinoma: Dilemmas in management. **Surgery**. v. 110, p. 978-88, 1991.

SANTOS, E. O.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M., MARTINS, L. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J.P.; **Natural Products Research** 2010, 16, doi 10.1080/14786410902809500

SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

SANTOS, R. A.; PORTUGAL, F. B.; FELIX, J. D.; SANTOS, P. M.O.; SIQUEIRA, M. M.; Avaliação Epidemiológica de Pacientes com Câncer no Trato Aerodigestivo Superior: Relevância dos Fatores de Risco Álcool e Tabaco. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 58, n. 1, p. 21-29, 2012.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v.45, p. 528-37, 2000.



**ROLIM, T. L.**

SARTO F., FINNOTO S., GIACOMELLI L., Mazzotti, D.; Tomanin, R.; Levis, A. G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-17, 1987.

SATO, D. Y. O.; WAL, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; CATTANEO, R. I. I.; MALVEZZI, M.; GABARDO, J.; BUCHI, D. F. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, p. 26-32, 2005.

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

SEDLACEK, H. H. Mechanisms of action of flavopiridol. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 38, n. 2, p. 139-170, 2001.

SEVERIANO, M. V. N.; DANTAS, I. C.; SILVA, J. C. DA; FELISMINO, D. C. Levantamento das plantas medicinais cultivadas no centro de estudo e pesquisa Malaquias da Silva Amorim. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**, v.4, n.1. p. 93-101, 2010

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacol**, 74: 239-243, 2001.

SHERR, C. J. The pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.

SHI, W.; GOULD, M. N. Induction of differentiation in neuro-2A cells by the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Letter**, v. 95, p. 1-6, 1995.

SHIMIZU, M.; SHOGAWA, H.; MATSUZAWA, T.; YONEZAWA, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N.; FERRO, S.; BASUALDO, I.; BERGANZA, L. H. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 2283, 1990.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 962-978, 2010.

SILVA, L. C. **O sentido do cuidado na vivência da pessoa com câncer: uma compreensão fenomenológica**. 2006. 187f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

SILVA, L. L.; DONNICI, C. L.; LOPES, J. C. D.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C.; PAUL, F. S.; BRAVO, C. E. S.; SANTORO, M. M.; DENADAI, A. M. L.; SANTOS, A. M. C.; MONTANARI, C. A. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1318-1324, 2012.

SILVA, J. F. S. Padrão de distribuição do câncer em cidade da zona de fronteira: tendência da mortalidade por câncer em Corumbá, Mato Grosso do Sul, no período 1980-2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 65-74, 2011.

**ROLIM, T. L.**

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 Amazônica**, v. 38, n. 1, 2008.

SILVA, V. A.; ANDRADE, L. H. C.; O significado cultural das espécies botânicas entre indígenas de Pernambuco: o caso Xucuru. **Biotemas**, v. 17, n. 1, p. 79 - 94, 2004.

SILVEIRA, R. M. **Bioensaios de toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento para a caracterização ambiental do Rio Itajaí-Mirim, SC.**[Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental - Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí], Itajaí, SC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. E.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R.; **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**, Eduni-Sul: Porto Alegre, 1986.

SINITOX, **Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região.** Brasil, 2009. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo/media/b3.pdf](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2013.

SONI, R.; FRETZ, H.; MULLER, L.; SCHOEPPFER, J.; CHAUDHURI, B. Novel Cdk inhibitors restore TGF-beta sensitivity in cdk4 overexpressing epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 794, 2000.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 175-184, 2003.

SOUZA, L. K. H.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI P. H. et al.. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 963–965, 2003.

SPADACIO, C.; BARROS, N. F. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com cancer: revisao sistematica. **Revista de Saúde Pública**, p.7- 13, 2008.

STARK, M. J.; BURKE, Y. D.; MCKINZIE, J. H.; AYUOBI, A. S.; CROWELL, P. L.; Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Letter**. v. 96, n. 1, p. 15-21, 1995.

STICH, H. F. Micronucleated exfoliated cells as indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials. **Journal of Nutrition, Growth and Cancer**, v. 4, p. 9-18, 1987.

STRASSER, A.; CORY, S. ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO Journal**. vol. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, v. 224, p. 31-43, 2005.

**ROLIM, T. L.**

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., McMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1118, 1990.

SUGARBAKER, P. H.; LANDY, D.; JAFFE, G.; PASCAL, R. Histologic changes induced by intraperitoneal chemotherapy with 5-fluorouracil and mitomycin C in patients with peritoneal carcinomatosis from cystadenocarcinoma of the colon or appendix. **Cancer**, v. 65, n.7, p.1495-501, 1990.

SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v.11, p. 971-981, 2005.

SUZUKI, Y.; TAKAGI, R.; KAWASAKI, I.; MATSUDAIRA, T.; YANAGISAWA, H.; SHIMIZU, H. The micronucleus test and erythropoiesis: Effects of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) on micronucleus formation. **Mutation Research**, v. 655, p. 47-51, 2008.

TAKIGUCHI, N.; SAITO, N.; NUNOMURA, M.; KOUDA, K.; ODA, K.; FURUYAMA, N.; NAKAJIMA, N. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, p. 11–14, 2001.

TAMURA, T.; IMAI, J.; MATSUMOTO, A.; TANIMOTO, M.; SUZUKI, A. Organ distribution of cisplatin after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p.1–7, 2002.

TAKIGAWA N, SEGAWA Y, KISHINO D, et al. Clinical and pharmacokinetic study of docetaxel in elderly non-small cell lung cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 54, p. 230-6, 2004.

TAVARES, J. F. ; QUEIROGA, K. F. ; SILVA, M. V.; DINIZ, M. F.; FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V.; DE SIMONE, C. A.; JUNIOR, J. X.; MELO, P. S.; HAUN, M.; DA SILVA, M. S. Ent-Trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.

TEIXEIRA, C. **O futuro da prevenção**. Salvador: Casa da Qualidade Editora, 2001.

TORTI, V. R.; COBB, A. J.; EVERITT, J. L.; MARSHALL, M. W.; BOORMAN, G. A.; BUTERWORTH, B. E. Nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by inhaled bromodichloromethane in wild-type and p53-heterozygous mice. **Toxicological Sciences**, v. 64, n. 2, p. 269, 2001.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

TSALIC, M.; BAR, S. G.; BENY, A.; VISEL, B.; HAIM, N. Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 103, 2003.

**ROLIM, T. L.**

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

VALADARES, M. C.; DE CASTRO, N. C.; DA CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p. 631-638, 2007.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VERÇOSA JÚNIOR, D.; SOUZA-FAGUNDES, E.; CASSALI, G.; RIBEIRO, E.; ZANI, C.; MELO, M. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Ehrlich ascítico no camundongo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p.788-98, 2006.

VICENT, P.C.; NICHOLLS, A. Comparison of the Growth of the Ehrlich Ascites Tumor in Male and Female Mice. **Cancer Research**, v.27, p. 1058-1065, 1967.

VICHAJ, V., KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, n. 1, p. 1112, 2006.

VIEIRA, J.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, GORNIK, G.; S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibition of Ascitic Ehrlich Tumor Cell Growth by Intraperitoneal Injection of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) Butanolic Residue. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 3, p. 609-613, 2010.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais E A Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera*. **Química Nova**, n.25, p. 273, 2002.

WANG, J.; WU, A.; XU, Y. F.; LIU, J. W.; QIAN, X .H . M. A induces apoptosis and G2-M arrest via inhibiting PI3K/Akt pathway in HL60 cells. **Cancer Letters**, v. 283, p. 193-202, 2009.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of Cancer, **Preventive Medicine**, v. 25, n. 1, p. 44-45, 1996.

World Health Organization. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2nd ed. Geneva: **World Health Organization**; 180 p, 2002..

WELLS, C. E.; BHASKARA, S.; STENGEL, K. R.; ZHAO, Y.; SIRBU, B.; CHAGOT, B.; CORTEZ, D.; KHABELE, D.; CHAZIN, W. J.; COOPER, A.; JACQUES, V.; RUSCHE, J.; EISCHEN, C. M.; MCGIRT, L. Y.; HIEBERT, S. W. Inhibition of histone deacetylase 3

**ROLIM, T. L.**

causes replication stress in cutaneous T cell lymphoma. **PLoS One**. v. 22, n. 8, sup 7: e68915. doi: 10.1371/journal.pone.0068915. Print 2013.

WEISS, B.; SHANNON K. Mouse cancer models as a platform for performing preclinical therapeutic trials. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.13, p. 84-89, 2003.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.30, p. 87, 2011.

XIAO, X. Y.; HAO, M.; YANG, X. Y.; BA, Q.; LI, M.; NI, S. J.; WANG, L. S.; DU, X. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**, v. 302, p. 69–75, 2011.

YANG, C. S.; LAMBERT, J. D.; JU, J.; LU, G.; SANG, S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 265, 2007.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. Wheater. **Histologia Funcional**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. pp: 274-282, 2000.

YOULE, R. J., STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 47-59, 2008.

YOKOZI, K.: Men-eki No Byori, Edited. by MIHASHI, S.; AIZAWA, M.; HANAOKA, M., Asakura, Tokyo, 1973.

YU, F.; YU, F.; MCGUIRE, P. M.; LI, R.; WANG, R. Effects of Hydrocotyle sibthorpioides extract on transplanted tumors and immune function in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 166-71, 2007.

XIMENES, R. M.; MELO, A. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SOUZA, I. A.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antitumor Activity of Leaves from *Hyptis mutabilis* (A. Rich.) Briq. (Lamiaceae) in Mice Bearing Tumor. **Dataset Papers in Pharmacology**, v. 2013, Article ID 169357, 3 pages <http://dx.doi.org/10.7167/2013/169357>

ZAFRA-GOMES, A. et al. ; Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods; **Food Chemistry**, v. 123, p. 872-877, 2010.

ZHANG, J.-S.; DING, J.; TANG, Q.-M; ZHAO, M. L.-H.; CHEN, L.-J.; YUAN, S.- T. Synthesis and antitumour activity of novel diterpenequinone salvicine and the analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 2731, 1999.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal Natural Products**, v.55, p. 999, 1992.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p.124-28, 2004.

**ROLIM, T. L.**

ZIEGLER, R. G., Phytoestrogens and breast cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 183-184, 2003.

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

ZUCKERMAN, K. S. Hematopoietic abnormalities in patients with cancer. **Cancer Control**, v. 5, p. 6-11, 1998.

# Anexo 1