



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS ISOLADOS
DE *Swietenia macrophylla* NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

BELÉM - PA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS ISOLADOS
DE *Swietenia macrophylla* NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro

BELÉM - PA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Barreto, Leilane de Holanda, 1986-

Avaliação do potencial biotecnológico de compostos isolados de swietenia macrophylla no tratamento de câncer / Leilane de Holanda Barreto. - 2015.

Orientadora: Raquel Carvalho Montenegro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Câncer - tratamento. 2. Reto - Câncer. I.
Título.

CDD 23. ed. 616.994

LEILANE DE HOLANDA BARRETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS ISOLADOS
DE *Swietenia macrophylla* NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro

Belém, 30 de novembro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Prof^a. Dra. Luciana Pereira Xavier

Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

DEDICATÓRIA

Para Honra e Glória do Senhor Jesus Cristo.

E às duas pessoas mais importantes da minha vida:

Barreto e Emília.

AGRADECIMENTOS

Obrigada Senhor, por Teu imenso amor, por me guiar e me proteger por toda a minha vida. Agradeço-Te por teres permitido que eu contemplasse alguns detalhes da Tua maravilhosa criação. Para sempre serei agradecida!

À **minha família**, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando, sendo pacientes e amigos. Por tudo o que vocês representam em minha vida: AMOR INCONDICIONAL!!!

Ao meu amor, melhor amigo, companheiro de todas as horas, **Jorge Felipe**. Obrigada pelos momentos de paciência, compreensão, atenção, brincadeiras, pelo abraço apertado nos momentos de dificuldade, e principalmente pelo seu imenso carinho e amor. Te amo!

À minha orientadora **Raquel Carvalho Montenegro**, pela confiança, paciência e amizade. Agradeço a oportunidade de aprender e conviver com você!

Aos meus amigos e companheiros **Danielle Feio, Laine Pinto, Bruno Soares e Ingrid Ramos**, pelo carinho, paciência, companhia e grande ajuda na realização desse trabalho. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos!

Ao professor “tio” **Rommel Burbano**, pela valiosa ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor **Milton Silva**, pela confiança para dar continuidade a esse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana, pela força e companheirismo ao longo dessa caminhada.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal do Pará.

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

EPÍGRAFE

“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão, e tudo quanto fizer prosperará.”

Salmos 1:3

RESUMO

Swietenia macrophylla (mogno) é uma espécie de planta amplamente conhecida pelo seu potencial terapêutico. Os principais constituintes de extratos isolados de partes dessa planta são estruturas conhecidas como limonoides. Os limonoides também apresentam várias atividades biológicas, dentre elas, ação antitumoral. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antitumoral do extrato e de limonoide obtido de folhas de *S. macrophylla* em linhagens tumorais. A avaliação da citotoxicidade frente a 5 linhagens tumorais e uma normal, revelou que o extrato teve ação citotóxica em linhagens de câncer colorretal (HCT-116 e HT-29), já os limonoides foram citotóxicos para câncer colorretal (HCT-116) e melanoma (SKMEL-19). Diante desses resultados, foram selecionados o limonoide L3 e a linhagem HCT-116 para avaliação do mecanismo de ação, assim como a linhagem HT-29, que possui o gene *TP53* mutado para comparação do possível mecanismo de ação do composto, haja vista que foi menos sensível a L3. Além disso, L3 se mostrou mais seletiva para células tumorais. Nenhum dos compostos causou hemólise em eritrócitos de camundongos. Para avaliação da ação antiproliferativa de L3, foi realizado o ensaio clonogênico, onde nas duas linhagens houve significativa redução de colônias, no entanto essa redução foi mais expressiva em HCT-116. O composto L3 também causou morte por apoptose de maneira dose-dependente nas linhagens, onde o número de células em processo de apoptose foi maior na HCT-116. Para avaliação de dano ao DNA, foi realizado o ensaio do cometa, o qual demonstrou que L3 causa dano no DNA das duas linhagens, com índice de dano maior na HCT-116. A avaliação da distribuição de células pelo ciclo celular após tratamento com L3 mostrou que houve bloqueio do ciclo na fase G2/M, principalmente na HCT-116 (45% das células). A partir desses dados, foi realizado um estudo de genes implicados nessa fase do ciclo, a partir da análise de suas expressões por PCR-RT. O gene *ATM*, o qual é ativado mediante a danos no DNA, ativa o *CHK-2* que por sua vez fosforila p53. p53 pode ativar a transcrição de p21, o qual desencadeia parado ciclo celular, ou ativar vias de morte celular. Neste trabalho, foi verificado aumento da expressão dos genes *ATM*, *CHK-2*, *TP53*, *ARF* de maneira dose dependente nas duas linhagens, sendo essa expressão foi maior em células da linhagem HCT-116. A expressão de p21 foi aumentada em HCT-116, ao passo que em HT-29 diminuiu, isso se deve ao fato que HT-29 possuir o gene *TP53* mutante, logo sua proteína não funciona corretamente. Quanto a via da apoptose, foi avaliado o gene da caspase-3 e o gene antiapoptótico *BCL-2*. Houve aumento na expressão de caspase-3, principalmente em HCT-116, e diminuição de *BCL-2*. Esses resultados sugerem que L3 possa estar causando danos ao DNA das células, desencadeando uma via de sinalização celular dependente de p53. Para avaliação da toxicidade do extrato de *S. macrophylla*, foi realizado o teste de toxicologia aguda em camundongos, onde o extrato não causou nenhuma alteração nos parâmetros fisiológicos dos animais. Assim como, o teste de clastogenicidade (micronúcleo) também mostrou que o extrato não é mutagênico em células da medula óssea de camundongos.

Palavras-chave: *Swietenia macrophylla*. Limonoides. Câncer colorretal. Antitumoral.

ABSTRACT

Swietenia macrophylla (mahogany) is a species of plant widely known for its therapeutic potential. The main constituents isolated extracts of this plant are structures known as limonoids. The limonoids also have several biological activities, among them, antitumor activity. The aim of this study was to evaluate the antitumor potential of the extract and limonoid obtained from leaves of *S. macrophylla* in cancer cell lines. Cytotoxicity to 5 cancer cell lines and normal revealed that the extract had cytotoxic effect in colorectal cancer cell lines (HCT-116 and HT-29), as the limonoids were cytotoxic for colorectal cancer (HCT-116) and melanoma (SKMEL-19). Given these results, we selected the limonoid L3 and HCT-116 cell line to evaluate the mechanism of action, as well as the HT-29 lineage, which has the *TP53* gene mutated for comparison as possible of the compound mechanism of action, once it was less sensitive to L3. Moreover, L3 showed more selective for tumor cells. None of the compounds caused hemolysis of erythrocytes in mice. To evaluate the antiproliferative action of L3, the clonogenic assay was performed, where the two lines there was a significant reduction of colonies, however this reduction was more significant in HCT-116. The L3 compound also has caused death by apoptosis in a dose-dependent manner in the lines, where the number of cells in apoptosis was higher in HCT-116. To evaluate DNA damage, it was held the comet assay, which showed that L3 cause damage to the DNA of the two cancer cell lines, with greater damage index in HCT-116. The assessment of cell cycle distribution of cells after treatment with L3 showed that there was blocking the cycle at the G2 / M phase, mainly in HCT-116 (45% of the cells). From these data, it conducted a study of genes involved in this phase of the cycle, from analysis of their expression by RT-PCR. The *ATM* gene, which is activated by DNA damage activates the *CHK-2* which in turn phosphorylates p53 protein. p53 protein can activate the transcription of p21 gene, which triggers cell cycle stopped, or activate cell death pathways. In this study, we found increased expression of genes *ATM*, *CHK-2*, *TP53*, *ARF* in a dose dependent in both cancer cell lines, and this expression was higher in HCT-116 cell line. The expression of *p21* was increased in HCT-116, while in HT-29 decreased, this is due to the fact that HT-29 possess the mutant *TP53* gene, then your protein does not work properly. As the path of apoptosis was evaluated caspase-3 gene and the anti-apoptotic gene *BCL-2*. There was increase in the expression of caspase-3 mainly in HCT-116 and decrease of *BCL-2*. These results suggest that L3 may be causing damage to the DNA of cells, triggering a cellular signaling pathway dependent on p53. To evaluate the toxicity of *S. macrophylla* extract, it was held the acute toxicology testing in mice, where the extract did not cause any changes in the physiological parameters of animals. As the clastogenicidade test (micronucleus) also showed that the extract is not mutagenic in the mouse bone marrow cells.

Keywords: *Swietenia macrophylla*. Limonoids. Colorectal cancer. Antitumor.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes por sexo, estimados para 2014, exceto pele não melanoma.
- Tabela 2:** Estimativas para o ano de 2014/2015 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.
- Tabela 3:** Estadiamento do câncer colorretal baseado no sistema TNM definido pelo AJCC.
- Tabela 4:** Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.
- Tabela 5:** Linhagens celulares utilizadas neste estudo.
- Tabela 6:** Valores da concentração da CI_{50} (concentração inibitória média do crescimento celular em μM), com a realização do teste do MTT, após 72h de incubação, para cinco linhagens tumorais (HCT-116, HT-29, ACP-03, SKMEL19, MDAMB231) e linhagem normal de fibroblasto pulmonar humano (MRC5).
- Tabela 7:** Efeito de L3 sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HCT-116 tratadas por 48 e 72h, avaliado por citometria de fluxo.
- Tabela 8:** Efeito de L3 sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HT-29 tratadas por 48 e 72h, avaliado por citometria de fluxo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** As quatro fases do ciclo celular: G1, S, G2 e M, culminando na divisão citoplasmática, citocinese.
- Figura 2:** Características adquiridas por células tumorais.
- Figura 3:** Classificação visual dos danos, representados em uma escala de 0-4, sugeridos por Collins et al (1997). Imagens de cometas (a partir de linfócitos), coradas com Brometo de Etídio.
- Figura 4:** Estrutura química do limonoide L3, isolado de folhas de *Swietenia macrophylla* (Meliaceae).
- Figura 5:** Efeito de L3 sobre as linhagens HCT-116 (A) e HT-29 (B) no ensaio clonogênico, após 8 dias de incubação.
- Figura 6:** Análise do padrão de morte celular ocasionada pelo limonoide L3 nas linhagens de câncer colorretal HCT-116 e HT-29, através da coloração diferencial de brometo de etídio/laranja de acridina.
- Figura 7:** Níveis de expressão do gene *ATM* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 8:** Níveis de expressão do gene *CHK-2* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 9:** Níveis de expressão do gene *TP53* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 10:** Níveis de expressão do gene *ARF* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 11:** Níveis de expressão do gene *p21* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 12:** Níveis de expressão do gene da caspase-3 nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 13:** Níveis de expressão do gene *BCL-2* nas linhagens HCT-116 e HT-29, após 48 e 72h de tratamento com L3.
- Figura 14:** Índice de dano causado pelo tratamento com L3 nas linhagens de câncer colorretal HCT-116 e HT-29.
- Figura 15:** Número de células com micronúcleos dos animais tratados com SM-EE ou ciclofosfamida (controle positivo) por 24h.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	graus celsius
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia Rad3 related</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BE/LA	Brometo de etídeo / Laranja de Acridina
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Brca1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
CDK	Cinase dependente de ciclina
CE₅₀	Concentração efetiva mediana
CHK-2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CI₅₀	Concentração inibitória média
CKI	Cinases inibidoras de CDK
CO₂	Gás carbônico
CTL	Controle negativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENC	Eritrócitos normocromáticos
EPC	Eritrócitos policromáticos
FASR	<i>Fas Receptor</i>
G	<i>Gap</i>
HCT-116	Carcinoma colorretal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HT-29	Adenocarcinoma colorretal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

IEC	Instituto Evandro Chagas
IGF-BP3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IP	Iodeto de propídeo
Km²	Quilômetro quadrado
L	Limonoide
LABCROL	Laboratório de Cromatografia Líquida
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Sal de tetrazolium
MRC-5	Fibroblasto pulmonar normal
nm	Nanômetro
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute - meio de cultura
S	Síntese
SBF	Soro bovino fetal
SKMEL 19	Melanoma
SMEAF	Fração etilacetato de <i>Swietenia macrophylla</i>
SM-EE	Extrato etanólico de <i>Swietenia macrophylla</i>
TMN	<i>Tumour-node-metastasis</i>
UFPA	Universidade Federal do Pará
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum-complementation 8 group C</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER	16
1.2 CÂNCER COLORRETAL	20
1.3 PRODUTOS NATURAIS E TRATAMENTO DE CÂNCER	23
1.4 LIMONÓIDES ISOLADOS DE <i>Swietenia macrophylla</i>	25
2 OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 EXTRATO ETANÓLICO E LIMONÓIDES DE <i>Swietenia macrophylla</i>	30
3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES	30
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS (<i>Mus musculus</i> , Swiss)	31
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS IN VITRO: MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT	32
3.5 ENSAIO CLONOGÊNICO	34
3.6 ANÁLISE DO PADRÃO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE/NECROSE) ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA.	35
3.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	36
3.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (PCR-RT)	37
3.9 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE IN VITRO: TESTE DO COMETA	39
3.10 TOXICOLOGIA AGUDA (OECD,423, 2001)	42
3.11 TESTE DO MICRONÚCLEO IN VIVO (OECD, 497, 1997)	44
4 RESULTADOS	46
4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS (<i>Mus musculus</i> , Swiss)	46
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS	46

DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS IN VITRO: MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT	
4.3 ENSAIO CLONOGÊNICO	48
4.4 ANÁLISE DO PADRÃO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE/NECROSE) ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA	49
4.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (PCR-RT)	52
4.7 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE IN VITRO: TESTE DO COMETA	60
4.8 TOXICOLOGIA AGUDA (OECD,423, 2001)	60
4.9 TESTE DO MICRONÚCLEO IN VIVO (OECD, 497, 1997)	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O estudo das bases moleculares do desenvolvimento de tumores (tumorigênese) forneceu suporte para o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de alterações moleculares. Este processo confere à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação clonal (HANAHAN, WEINBERG, 2000; HANAHAN, WEINBERG, 2011).

A proliferação anormal de células é um traço comum no câncer humano, e em geral, é resultado da desregulação do ciclo celular associada à instabilidade genômica e cromossômica (CERVEIRA et al., 2012). As células tumorais apresentam perda no controle da proliferação celular (ponto de restrição) e, muitas vezes, tornam-se independentes de sinais mitogênicos para a sua progressão através das diferentes fases do ciclo celular (LOURO et al., 2002; CERVEIRA et al., 2012).

O ciclo celular é o mecanismo pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. Em células eucarióticas, envolve uma rede complexa de proteínas regulatórias, chamado sistema de controle, que governa a progressão do ciclo. Pode-se dividir o ciclo celular em quatro fases: G1/G0, S, G2 e M (Figura 1). A fase M (mitose) propriamente dita inclui quatro subfases distintas: prófase, metáfase, anáfase e telófase, culminando com a citocinese, a divisão do citoplasma que permite a formação de duas novas células, e é precedida pela fase de preparação, ou intérfase, que inclui G0, G1, S e G2 (ALBERTS et al., 2008; WEINBERG, 2008; CERVEIRA et al., 2012).

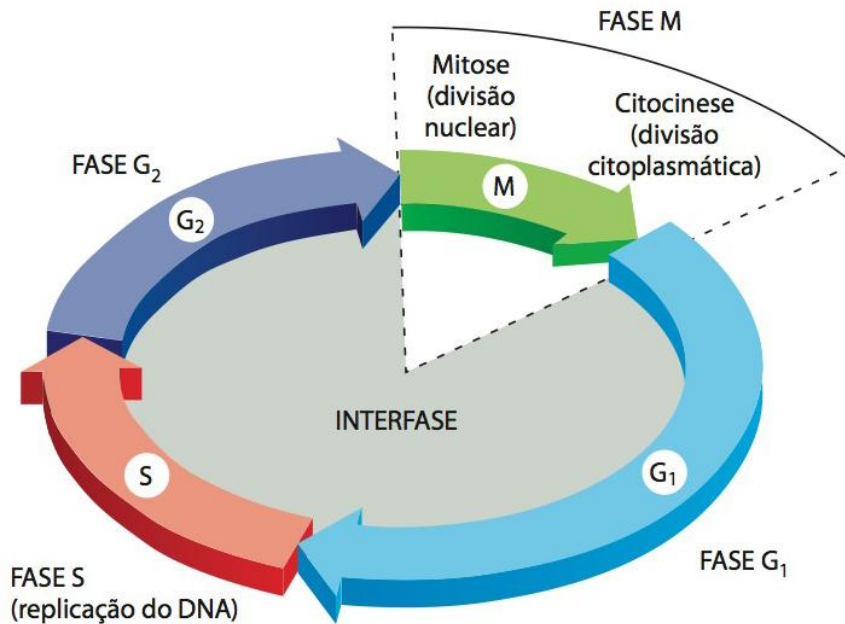


Figura 1: As quatro fases do ciclo celular: G₁, S, G₂ e M, culminando na divisão citoplasmática, citocinese. Fonte: Adaptado de Alberts, B., et al. *Biologia Molecular da Célula*. 2010.

A perda do controle da proliferação celular envolve mutações em genes reguladores do ciclo celular, os proto-oncogenes e genes supressores tumorais (LOURO et al., 2002; FOSTER, 2008; HANAHAAN, WEINBERG, 2000; 2011; CERVEIRA et al., 2012). As alterações nos mecanismos de regulação desse ciclo tornam a célula apta a passar por este sem a devida checagem, o que pode acarretar no acúmulo de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas do tumor, como auto-suficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese e invasão tecidual e metástase, desregulação do metabolismo, evasão do sistema imune, inflamação e instabilidade genômica e mutações (Figura 2) (LOURO et al., 2002; FOSTER, 2008; HANAHAAN, WEINBERG, 2011).

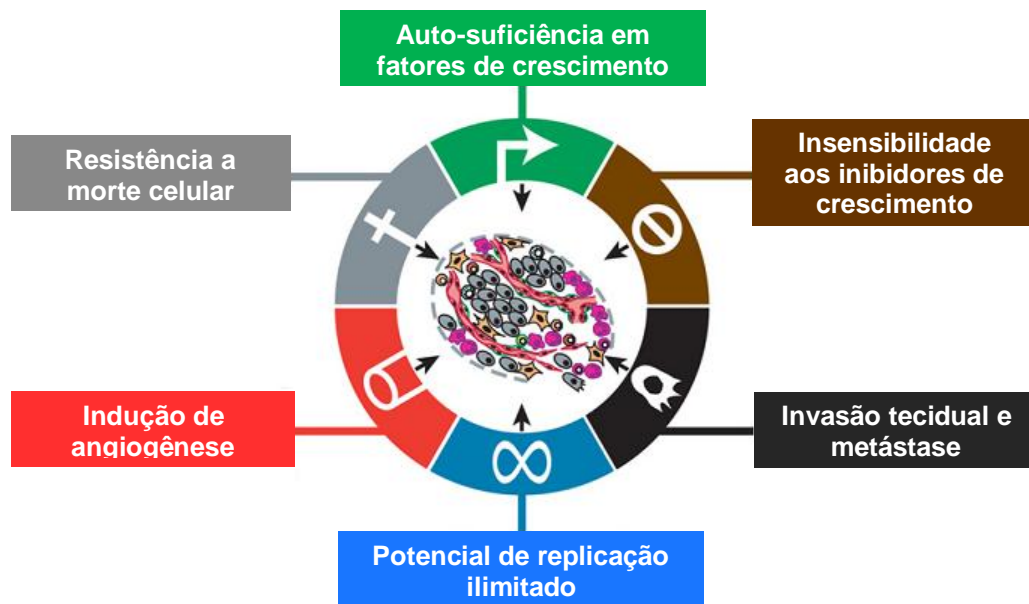


Figura 2: Características adquiridas por células tumorais. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

O gene *TP53*, chamado de guardião do genoma, é um gene regulador de uma extensa rede que controla a integridade do genoma frente a danos celulares, como alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais e ativação de oncogenes celulares (MENENDEZ et al., 2007; MAXIMOV, MAXIMOV, 2008; ELIAS et al., 2014). Tais danos ocorrem durante o desenvolvimento do câncer e resultam em mudanças biológicas, como o equilíbrio entre a apoptose e a sobrevivência celular (MENENDEZ et al., 2007; PETITJEAN et al., 2007; CERVEIRA et al., 2012).

A proteína p53 está diretamente relacionada ao bloqueio do ciclo celular, no caso de dano ao DNA. Esta proteína sinaliza o bloqueio do ciclo celular no ponto de checagem na fase G1/S (*Gap* – intervalo / *Synthesis* - síntese). O ponto de checagem corresponde a um mecanismo para impedir a formação de células anômalas. A p53 possui vários mecanismos para efetuar o reparo ou induzir a apoptose, e diferentes fatores induzem essa proteína a gerar resposta celular mais adequada (WU et al., 2006; MAXIMOV, MAXIMOV, 2008; ELIAS et al., 2014).

Várias vias de sinalização, no ciclo celular, são dependentes da ação da p53. A sequência específica do fator de transcrição dessa proteína coordena a expressão de grande número de genes alvo que participam em diferentes respostas celulares a condições de estresse (MENENDEZ et al., 2009).

Através da ativação da p21, proteína reguladora da transmissão da fase G1 para S no ciclo celular, p53 controla a fosforilação do complexo molecular ativo ciclina-CDK (cinase dependente de ciclina), interrompendo o ciclo celular (SOLOMON et al., 2011). Pela conjugação da p21 à proteína PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), p53 promove o reparo ao DNA. Este também ocorre pelo estímulo direto à proteína codificada pelo gene XPC (*Xeroderma pigmentosum-complementation 8 group C*), que está envolvido com o reparo por excisão de nucleotídeos (SOLOMON et al., 2011).


p53, também, induz a apoptose ao regular a expressão de mediadores anti ou pró-apoptóticos, envolvidos em atividades celulares, como os membros da família de proteínas Bcl-2: NOXA (gene pro-apoptótico), PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), BAX (*Bcl-2 associated X protein*), proteína FASR (*Fas Receptor*) e a proteína IGF-BP3 (*Insulin-like growth factor binding protein 3*) (SOLOMON et al., 2011).

Apesar dos importantes avanços no entendimento das neoplasias, sobretudo nos últimos 25 anos, o câncer apresenta-se como grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos, nos quais ele é a segunda principal causa de morte, como nos países em desenvolvimento, onde ele é a principal causa de morte (JEMAL et al., 2011; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 21,4 milhões de casos incidentes de câncer, 13,2 milhões de mortes por câncer em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

De acordo com estimativas mundiais da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Nos países desenvolvidos, os tipos de cânceres mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (JEMAL et al., 2011; INCA, 2014).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014/2015 apontam que ocorrerão cerca de 576 mil novos casos de câncer (INCA, 2014). Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, colorretal e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, colorretal e glândula tireoide para o sexo feminino (Tabela 1). Tirando os cânceres de pele não melanoma, de mama na mulher e próstata no homem, o câncer colorretal será o mais prevalente (INCA, 2014).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes por sexo, estimados para 2014, exceto pele não melanoma*.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, 2014.

1.2 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal está entre os tumores malignos mais comuns. É o terceiro câncer mais frequente no mundo, sendo o quarto tipo de neoplasia mais frequente em nosso país (INCA, 2014). O câncer colorretal configura-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens, com uma estimativa de 746 mil novos casos no mundo para o ano de 2012. Já para o sexo feminino, essa neoplasia é a segunda, com 614 mil casos novos no mundo. Cerca de 60% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas (INCA, 2014).

No Brasil, em 2014/2015, esperam-se 15.070 casos novos de câncer colorretal em homens e 17.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres (Tabela 2) (INCA, 2014).

Tabela 2: Estimativas para o ano de 2014/2015 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária*.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, 2014.

Essa neoplasia é considerada de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais (SAGAERT, 2014). A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon podem ser ambientais e genéticos (INCA, 2014).

Entre os fatores ambientais, a dieta com alto teor calórico e o índice de massa corporal elevado têm sido implicados como fatores predisponentes, assim como o consumo de carnes vermelhas e de gordura em geral. O sedentarismo, tabagismo e ingestão de álcool também são considerados fatores de risco (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2011; INCA, 2014). No entanto, os fatores de risco mais relevantes são a história familiar de câncer colorretal e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (BALMAÑA et al., 2013). A idade também é considerada um fator de risco, uma vez

que tanto a incidência como a mortalidade aumenta com a idade (INCA, 2014; BRENNER et al., 2014).

Em geral, os sinais e sintomas surgem em estádios avançados da doença e são dependentes da localização e tamanho do tumor. São sintomas possíveis: alterações do trânsito intestinal, perdas hemáticas, dor abdominal e sintomas gerais como emagrecimento, anorexia e astenia (SCHWARTZ et al., 2004; LESLIE et al., 2002). Após o estabelecimento do diagnóstico, é importante determinar a extensão da doença quer localmente quer à distância (LESLIE et al., 2002). Apesar de existirem vários sistemas, o *Tumour-Node-Metastasis* (TNM), definido pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), é o mais utilizado para o estadiamento do câncer colorretal (SCHWARTZ et al., 2004; WOLPIN; MAYER, 2008; WOLPIN et al., 2007). T representa a profundidade da penetração do tumor, N define o atingimento de gânglios linfáticos e M a presença de metástases à distância (Tabela 3) (WOLPIN, MAYER, 2008).

Em 85% dos casos, o câncer colorretal é precedido por uma lesão benigna conhecida por pólipos. Dependendo da característica deste pólipo, ele pode se tornar maligno e iniciar o câncer. Devido a este processo é que se faz a prevenção deste tipo de tumor com a colonoscopia, já que este exame permite o diagnóstico e a retirada do pólipo. Nos outros 15% dos casos, o tumor ocorre devido a uma doença genética, e se caracteriza por acometer pacientes mais jovens e por não apresentar o pólipo como lesão pré-maligna, ou seja, surge diretamente na parede do intestino (POWEL, 1995; LASSANCE et al., 2012). As síndromes hereditárias incluem a polipose adenomatosa familiar, a síndrome do tumor colorretal hereditário não polipoide e as síndromes com pólipos hamartomatosos (Peutz-Jeghers, Síndrome da Polipose Juvenil, Cowden) (POWEL, 1995; LASSANCE et al., 2012; Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2011; BALMAÑA et al., 2013).

Tabela 3: Estadiamento do câncer colorretal baseado no sistema TNM definido pelo AJCC.

Tumor Primário (T)

TX: Tumor primário não pode ser avaliado

T0: Sem evidência de tumor primário

Tis: Carcinoma in situ: tumor intraepitelial da lâmina própria

T1: Tumor invade a submucosa

T2: Tumor invade a musculatura própria

T3: Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos peri-cólicos ou peri-retais, não peritonizados

T4: Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral

Linfonodos (N)

Nx: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1: Metástase em um a três linfonodos regionais

N2: Metástase em quatro ou mais linfonodos regionais

Metástase (M)

Mx: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0: Ausência de metástase à distância

M1: Metástase à distância

Fonte: Adaptado de TNM: classificação de tumores malignos. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (2004).

1.3 PRODUTOS NATURAIS E TRATAMENTO DE CÂNCER

O tratamento da maioria dos cânceres consiste na combinação de diferentes abordagens terapêuticas e não apenas de uma. A quimioterapia, aliada à cirurgia e à radioterapia, constituem as principais modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer (KUMMAR et al., 2004).

As terapias anticâncer mais usadas, após a cirurgia, são a radiação ionizante, quimioterapia, a imunoterapia e mais recentemente, a terapia-alvo (KUMAR et al., 2004; ROSA et al., 2008). Porém, esses tratamentos são caros e causam muitos efeitos colaterais, como vômitos, alopecia, diarreia, prisão de ventre,

mielossupressão, toxicidades neurológica, cardíaca, pulmonar e renal. Todos estes efeitos secundários reduzem a qualidade de vida e desencoraja o paciente a obdecer os protocolos de tratamento, o que resulta em progressão da doença e complicações associadas (MANS et al., 2000; ALONSO-CASTRO et al., 2011).

Mesmo com todos os avanços na compreensão da biologia do câncer e do grande volume de moléculas novas em fase clínica para seu tratamento, o número de drogas que são aprovadas pelas agências reguladoras ainda é baixo (MUNÕZ, 2009; CAPONIGRO, SELLERS, 2011; SWINNEY, ANTHONY, 2011). Além disso, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas, redução da sobrevida dos pacientes e dos efeitos adversos, o que leva a uma contínua busca por novos fármacos (SALGALLER, LODGER, 1998; SWANTON et al., 2007; BORST, 2012).

Nesse contexto, os produtos naturais, principalmente as plantas, se apresentam como fonte de novas drogas para o tratamento do câncer. Produtos naturais frequentemente possuem atividades biológicas altamente seletivas e específicas (CRAGG et al., 2009).

As plantas têm uma longa história de utilização no tratamento do câncer. Hartwell (1982) na sua revisão de plantas utilizadas contra o câncer, lista mais de 3000 espécies utilizadas no tratamento do câncer. Mais recentemente, Newman e Cragg (2012) relataram que de 206 drogas aprovadas para uso clínico, 131 são de origem natural ou inspiradas em produtos naturais. A descoberta de agentes usados na clínica pode ser atribuída, direta ou indiretamente, a uma história relevante de utilização da planta na medicina popular.

Cerca de 60% dos medicamentos atualmente utilizados para o tratamento do câncer têm sido isolados a partir de produtos naturais (GORDALIZA, 2007; CRAGG et al., 2009; NEWMAN, CRAGG, 2012; CRAGG, NEWMAN 2013). Estes incluem os alcalóides da vinca (vinblastina, vincristina e vindesina); o paclitaxel (diterpeno isolados do gênero *Taxus*) e o análogo docetaxel; a camptotecina (alcalóide isolado do gênero *Camptotheca*) e os análogos topotecano e irinotecano; e a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo e teniposídeo (Tabela 4) (CRAGG et al., 2009; NEWMAN, CRAGG, 2012; CRAGG, NEWMAN 2013).

Tabela 4: Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

FÁRMACO	FONTE	ALVO MOLECULAR	INDICAÇÃO TERAPÊUTICA
Vinblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	<i>Catharantus roseus</i>	Tubulina e microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking; Câncer de mama
Paclitaxel Docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina e microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina Etoposídeo Teniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de pulmão, ovário e testículo, leucemia linfocítica aguda
Camptotecina Topotecano Irinotecano	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de cólon

Fonte: Adaptados de Costa-Lotufo, et al., 2010.

1.4 LIMONÓIDES ISOLADOS DE *Swietenia macrophylla*

A floresta amazônica compreende mais de 5 milhões de Km², onde 60% desta encontra-se na região Norte do Brasil. A diversidade de espécies de plantas na Amazônia é uma das maiores do mundo, sendo relatado que em um hectare pode conter 280 espécies de árvores (VALENCIA et al., 1994; OLIVEIRA, MORI, 1999; CALDERON et al., 2009). Mais de 400 mil espécies de plantas de interesse econômico e social têm sido registradas na região. Essa vasta diversidade de espécies de plantas e o grande potencial terapêutico destas têm atraído a atenção da comunidade científica. Das 80.000 espécies de plantas mais altas dentro da Amazônia, menos de 2%, foram testados quanto à atividade farmacológica (GOTTLIEB, KAPLAN, 1990; EISNER, 1992).

Alguns trabalhos relatam o potencial terapêutico contra o câncer de algumas espécies de plantas de ocorrência na Amazônia, como *Pfaffia paniculata* (Amaranthaceae) (OLIVEIRA et al., 1980; MATSUZAKI et al., 2006; NAGAMINI et al., 2009), *Himatanthus articulatus* (Apocynaceae) (MOUSINHO et al., 2011;

REBOUÇAS et al., 2011), e o gênero *Croton* (Euphorbiaceae) (SANDOVAL et al., 2002; ALONSO-CASTRO et al., 2012; MONTOPOLI et al., 2012).

Outra espécie de planta de ocorrência na floresta amazônica também se apresenta como fonte de substâncias com potencial terapêutico, a *Swietenia macrophylla* (Família Meliaceae). O gênero *Swietenia* compreende três espécimes: *S. macrophylla*, *S. mahogany* e *S. humillis* e, um híbrido de *S. macrophylla* e *S. mahogany* - *S. aubrevilleana* (MOOTOO, 1999), sendo que *S. macrophylla* tem predominância absoluta nas áreas de ocorrência.

Swietenia macrophylla (Meliaceae), também conhecida como Mogno de folha larga, é uma árvore de madeira tropical que pode crescer até 40-60 metros de altura. A árvore é nativa das regiões tropicais das Américas, incluindo o sul do México, América Central e Bolívia (TAN et al., 2009). Na Amazônia, encontra-se distribuída numa faixa que passa pelos estados do Acre, Rondônia, Amazonas, Pará, Mato Grosso e Maranhão. Sua população é superior ao conjunto das populações de todos os outros países onde ocorre, o que equivale a 74% da população mundial (FIGUEROA, 1994; VERÍSSIMO et al., 1995; GROGAN et al., 2002).

Várias atividades biológicas apresentadas pelos extratos e constituintes das sementes de *S. Macrophylla* já foram descritas, principalmente atividade anti-inflamatória, anti-mutagênica e anti-tumoral (GUEVERA et al., 1996; GOH, ABDUL KADIR, 2011), anti-malárico (SOEDIRO et al., 1990; MUNÕZ et al., 2000; MURNIGSIH et al., 2005), inseticida (NAKATANI, 2004), antiparasitário (ENDRIGA et al., 2005), antimicrobiano (DEWANJEE et al., 2007), anti-diarréico (MAITI et al., 2007), anti-nocieptiva (DAS et al., 2009), hipoglicemiante (MAITI et al., 2009; DEWANJEE et al., 2009), acaricida (EL ZALABANI et al., 2012) o que torna esta família bastante interessante quimicamente.

Vários trabalhos demonstram que em muitas espécies da família Meliaceae há a presença de substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou limonóides que apresentam um esqueleto básico de 26 átomos de carbono que também são encontradas, nas famílias Rutaceae e Cneuraceae (CHAMPAGNE et al., 1992; POULOSE et al., 2005; EL-READI et al., 2010; KIKUCHI et al., 2011; NAGOOR et al., 2011). Alguns trabalhos identificaram os limonóides e seus derivados como constituintes majoritários de *S. macrophylla* (DA SILVA et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com limonóides isolados de diferentes famílias de plantas, sendo demonstrado apenas as atividades larvicida (LIU et al., 2012) e citotóxica (KIKUSHI et al., 2011; NAGOOR et al., 2011). Nimbolida, um limonóide isolado de *Azadirachta indica*, exibiu atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais de mama, pulmão, neuroblastoma, osteossarcoma e melanoma (GUPTA et al., 2010a; GUPTA et al., 2010b; HARISH KUMAR et al., 2009). Outro estudo demonstrou que a eritrocarpina E, limonoide isolado de *Chisocheton erythrocarpus*, apresentou atividade citotóxica contra células de carcinoma escamoso oral, carcinoma cervical, hepatocarcinoma e adenocarcinoma de mama humana (NAGOOR et al., 2011).

O uso de medicamentos baseados em plantas ainda hoje é bastante utilizado por diferentes populações (MOERMAN, 1986; JOHNSON, 1999). A OMS estima que aproximadamente 65% da população mundial utiliza plantas e seus derivados para cuidados primários em saúde, sendo importante nos sistemas de saúde, principalmente em países em desenvolvimento (NEWMANN, CRAGG, 2012). A análise do índice de novos fármacos aprovados para uso terapêutico entre os anos 2000 e 2010 demonstrou que cerca de 50% destes são de origem natural (NEWMANN, CRAGG, 2012).

Estima-se que mais de 50% dos medicamentos prescritos nos Estados Unidos contenham princípios ativos de origem natural, sendo que pelo menos 25% contem substâncias ativas isoladas de plantas, ou são formas modificadas de compostos isoladas de plantas (BALUNAS, KINGHORN, 2005). Fitoterápicos são responsáveis por 25% do receituário médico em países desenvolvidos e cerca de 80% em países em desenvolvimento (SIMÕES et al., 2007).

No entanto, grande parte das plantas ainda não tem estudos químicos, analíticos e farmacológicos. Muitas espécies são usadas de forma empírica, sem comprovação científica quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (NODARI, GUERRA, 1999; HOSTETTMANN et al., 2003; NEWMANN, CRAGG, 2012).

Cabe ressaltar que existe a necessidade de uma atuação multidisciplinar para ampliar o estudo de plantas, incluindo os pontos de vista

fitoquímico, farmacológico, biotecnológico, de tal forma que esta integração possa propiciar uma ampliação nas possibilidades de busca de novas moléculas ativas.

Diante deste cenário, *Swietenia macrophylla* se apresenta como uma espécie de planta com grande potencial biotecnológico para pesquisa de novas moléculas ativas para uso terapêutico. Essa espécie de planta é largamente explorada pela indústria madeireira no Estado do Pará. Logo, se faz importante o desenvolvimento do estudo com extrato e com limonóides isolados das suas folhas quanto à sua atividade antitumoral, haja vista que as folhas do mogno são consideradas “lixo” da indústria madeireira.

O presente trabalho gerou o depósito de uma patente junto aos órgãos competentes (INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial), a respeito uso de extratos e limonóides isolados de *Swietenia macrophylla* na inibição da proliferação celular (Anexo A).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral de extrato e limonóide isolados de *Switenia macrophylla* em linhagens tumorais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade hemolítica do limonóide em estudo em eritrócitos de camundongos;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do limonóide em estudo em linhagens tumorais e normal humanas;
- ✓ Avaliar o potencial anticlonogênico do limonóide em estudo em linhagens tumorais HCT-116 e HT-29;
- ✓ Avaliar o padrão de morte celular em células HCT-116, HT-29 e MRC5, causado pelo limonóide em estudo;
- ✓ Analisar o ciclo celular das linhagens tumorais HCT-116 e HT-29, após tratamento com o limonóide em estudo;
- ✓ Estudar a via de sinalização do *TP53* e seu envolvimento na citotoxicidade do composto selecionado na indução de morte celular;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico do limonóide em estudo em linhagens tumorais de câncer colorretal;
- ✓ Avaliar a toxicologia aguda causada pelo extrato etanólico em camundongos albino suíço (*Mus musculus*);
- ✓ Avaliar a mutagenicidade causada pelo extrato etanólico em camundongos albino suíço (*Mus musculus*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXTRATO ETANÓLICO E LIMONÓIDES DE *Swietenia macrophylla*

O extrato etanólico (SM-EE) e os limonóides (L0, L2, L3, L4, L7) isolados de folhas de *Swietenia macrophylla* foram cedidos pelo professor Dr. Milton Silva, responsável pelo Laboratório de Cromatografia Líquida da Universidade Federal do Pará (LABCROL-UFPa). O extrato foi obtido por maceração e os limonóides foram isolados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

O extrato etanólico (SM-EE) e os limonóides (L0, L2, L3, L4, L7) foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) para compor soluções estoque a 10mg/mL e 10mM, respectivamente, as quais foram mantidas em refrigerador a -20°C.

3.2 CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES

As linhagens utilizadas neste trabalho foram: melanoma (SKMEL-19), adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), adenocarcinoma gástrico primário (ACP-03), carcinoma corretal (HCT-116), adenocarcinoma colorretal (HT-29) e fibroblasto pulmonar normal (MRC-5), todas de origem humana (Tabela 5).

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células em meio RPMI, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL), mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente, o crescimento celular foi acompanhado com a utilização do microscópio invertido. O meio de cultura foi trocado sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária para a renovação dos nutrientes ou para realização dos experimentos. Para a manutenção das células, o meio contido na garrafa foi desprezado, as células foram lavadas com PBS 1X (*Phosphate buffered saline*) e adicionado tripsina-EDTA (0,25%) durante 5 minutos para que as células que formam uma monocamada soltem da parede da garrafa, em seguida a tripsina foi inativada com o meio de cultura, as células foram removidas e então adicionado o novo meio a garrafa.

Tabela 5: Linhagens celulares utilizadas neste estudo.

LINHAGEM	TIPO HISTOLÓGICO	ORIGEM
SKMEL19	Melanoma maligno	Humana
MDA-MB-231	Adenocarcinoma Mamário	Humana
ACP-03	Adenocarcinoma Gástrico Primário	Humana
HCT-116	Carcinoma Colorretal	Humana
HT-29	Adenocarcinoma Colorretal	Humana
MRC-5	Fibroblasto Pulmonar Normal	Humana

Fonte: ATCC - www.atcc.org

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*, Swiss)

Princípio do teste

Esta metodologia permitiu avaliar o potencial dos compostos em estudo em causar danos na membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, através da presença de hemoglobina em solução. Quando o composto testado causa hemólise em até 1 hora de incubação, o mecanismo de ação citotóxico é considerado inespecífico por causar dano direto à membrana plasmática.

Procedimento experimental

O sangue foi coletado em camundongos (*Mus musculus*, Swiss) pela via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (8,5 g de NaCl (0,85%), 1,11 g de CaCl₂ 10mM, q.s.p. H₂O 1000mL de solução). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes por centrifugação (1500 rpm/3min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de solução de eritrócitos (SE) a 2%. Em placa de 96 poços, adicionou-se 100 µL de solução salina na primeira fileira, na segunda fileira cada poço recebeu 50 µL de solução salina e 50 µL de DMSO

10% (veículo de diluição da substância teste). Na terceira fileira em diante, foram adicionadas 100 µL da solução salina e 100 µL das substâncias teste em triplicata, na concentração de 5 mg/mL (dose máxima: 200 µg/mL), exceto a última fileira, que recebeu 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1%.

Em seguida, 100 µL da SE 2% foi adicionada, seguida de incubação por 1 hora sob agitação e posterior centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para outra placa e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (SYNERGY/HT *microplate reader*) no comprimento de onda de 450 nm. Triton X-100 (0,5%) e DMSO foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente.

Análise dos dados

O experimento foi analisado segundo suas médias e desvios padrão. A concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE_{50}) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) para cada amostra foi obtido a partir da regressão não - linear no programa GraphPad Prism versão 5.0.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da Universidade Federal do Pará (parecer de aprovação – Anexo B).

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS IN VITRO: MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT

Princípio do teste

Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann (1983) para estimar a proliferação e sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA et al., 2000; BEZERRA et al., 2005) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-defenitetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazana, que são de cor

púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para a citotoxicidade (BERRIDGE et al., 1993).

Procedimento experimental

As células foram cultivadas em placas de 96 poços com 3000 células/poço (100 μ L/poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Os limonóides estavam em solução estoque a 10mM, diluídos em DMSO. A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas em triplicata para obtenção da concentração final de 20 μ M (0,312-20 μ M) para os limonóides e foram adicionadas na placa de 96 poços (100 μ L/poço). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o DMSO como controle negativo. Após um período de incubação de 72h, o sobrenadante das células foi aspirado, adicionado 100 μ L de solução de MTT (0,5 mg/mL diluído em meio RPMI 1640) e a placa foi reincubada em estufa a 37° C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente protegida da luz por 24 horas. Então, foi adicionado 100 μ L/poço de DMSO e agitado por 10 minutos até a completa dissolução dos cristais de formazana. As placas foram lidas no espectrofotômetro (SYNERGY/HT *microplate reader*) no comprimento de onda de 570 nm.

Análise dos dados

A análise foi realizada através do percentual de inibição x log da concentração, determinadas suas CI₅₀ e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

3.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

Princípio do teste

É um ensaio baseado na capacidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia (FRANKEN et al., 2006). Além disso, neste ensaio também é possível distinguir os efeitos de proliferação celular incluindo o tamanho da colônia como um parâmetro adicional.

Procedimento experimental

As células da linhagem HCT 116 e HT-29 foram plaqueadas na densidade de 500 células/2mL em placas de 6 poços e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas nas concentrações 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 µM de L3.Doxorrubicina a 0,1 µM e DMSO 0,01% foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O crescimento das colônias foi observado durante oito dias, período no qual a placa permaneceu sob condições de cultivo ideais. Após esse período, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com cristal violeta (0,2%), lavadas com água destilada.

Análise dos dados

Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. O número de colônias, com no mínimo 50 células cada, foi quantificado em microscópio óptico. O efeito anticlonogênico foi observado pela redução no número de colônias. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA: *one way*), seguida por Teste de Turkey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.6 ANÁLISE DO PADRÃO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE/NECROSE) ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA.

Princípio do teste

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA) permitiu diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose. Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência. A LA é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. Enquanto, o BE, por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Dessa maneira, as células viáveis que tem membrana íntegra apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA.

As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes que caracterizam morte celular por apoptose (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e são marcada por BE apenas na apoptose tardia ou secundária, em que ocorre o afrouxamento da membrana permitindo que o corante atravessasse a célula (MCGAHON et al., 1995). Na apoptose, observam-se ainda alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos apoptóticos (BASKIC et al., 2006). O BE é incorporado majoritariamente por células necróticas (membrana danificada) e apresentam, portanto, núcleo corado em vermelho (BASKIC et al., 2006).

Procedimento experimental

As células foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de 40000 células/poço e foram mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C. Após esse período, foi realizado o tratamento com L3 nas concentrações 0,5 µM; 1,0 µM; 2,0µM e 5,0 µM em duplicata por 72 horas. A doxorrubicina na concentração 0,5 µM foi utilizada como controle positivo de citotoxicidade e DMSO 0,01% como controle negativo. Após a incubação, as células foram lavadas e tripsinizadas para obtenção das células aderidas, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi

descartado e as células foram ressuspensas em 20 μ L de PBS 1X. Em seguida, foi adicionado 1 μ L da solução de BE:LA ao tubo e uma alíquota dessas células foi transferida para lâmina. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX41).

Análise dos dados

Foram contadas 300 células, em triplicata, para quantificar o percentual de eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas). Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA: *one way*), seguida por Teste de Turkey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar o conteúdo e a integridade do DNA nuclear. Com o núcleo íntegro e com a determinação da quantidade de DNA - se 2n, 4n ou um ponto intermediário -, pode-se supor quanto à fase do ciclo celular em que a célula se encontra (G1, G2/M ou S). A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear são características marcantes de células em processo apoptótico enquanto que as células necróticas geralmente mantêm seus núcleos íntegros e picnóticos. Este teste, utiliza-se da capacidade do iodeto de propídeo (IP) se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células é lisada para que o PI possa se ligar ao núcleo. A fluorescência emitida é proporcional ao conteúdo de DNA e seu estado de integridade e condensação. Células com mais DNA e núcleo íntegro emitem fluorescência mais alta; já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menor quantidade de IP, emitindo, assim, menor fluorescência.

Procedimento experimental

As células HCT-116 e HT-29 foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 40000 células/poço e foram mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizado o tratamento com L3 nas concentrações 0,5 µM; 1,0 µM; 2,0µM e 5,0 µM em triplicata por 48 e 72 horas. A doxorrubicina na concentração 0,5 µM foi utilizada como controle positivo de citotoxicidade, e DMSO 0,01% como controle negativo. Após a incubação, as células foram lavadas e tripsinizadas para obtenção das células aderidas, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em aproximadamente 300 µL de solução contendo iodeto de propídeo (10µg/mL). Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente e protegidas da luz, as células foram levadas ao citômetro de fluxo (BD FACSCALIBUR) para avaliação do conteúdo de DNA.

3.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (PCR-RT)

Princípio do teste

A PCR-RT baseia-se na detecção na fluorescência detectada por uma molécula fluorescente que aumenta enquanto a reação ocorre. Isso acontece devido ao cúmulo dos produtos da PCR em cada ciclo de amplificação. A fluorescência detectada é gerada pelo emprego de marcadores fluorescente com modos de ação específicos (WONG; MEDRANO, 2005).

Procedimento experimental

As células HCT-116 e HT-29 foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 40000 células/poço e foram mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizado o tratamento com L3 nas concentrações 0,5 µM; 1,0 µM; 2,0µM e 5,0 µM em triplicata por 48 e 72 horas. A doxorrubicina na concentração 0,5 µM foi utilizada como controle positivo

de citotoxicidade, e DMSO 0,01% como controle negativo. Após a incubação, as células foram lavadas e tripsinizadas para obtenção das células aderidas, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm e ressuspendidas em reagente *Allprotect Tissue Reagent* (1g/100mL), diluído em DMSO (QIAGEN, ALEMANHA).

Após, foi realizada a extração do RNA das amostras coletadas utilizando o kit *AllPrep DNA/RNA/Protein* (QIAGEN, ALEMANHA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas utilizando espectrofotômetro Nano-drop (KISKER, ALEMANHA) e 1% de gel de agarose, respectivamente. As amostras foram armazenadas em refrigerador a -80°C até o momento de uso.

Transcrição Reversa

A partir de 25µg de RNA extraído foi sintetizado o cDNA de acordo as instruções do fabricante com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Life Technologies), usando o termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

PCR em tempo real quantitativa (qPCR)

Foi avaliada a expressão dos genes selecionados: *ATM*, *CHK-2*, *TP53*, *ARF*, *p21*, *Caspase-3*, *BCL-2* e para o controle endógeno da reação foi utilizado o gene constitutivo β -actina. Tais genes estão disponíveis comercialmente como *TaqMan® Gene expression assays* (Life Technologies, EUA), o qual possui sondas e iniciadores específicos para cada gene.

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada para cada um dos genes, no aparelho *ABI 7500 Real-Time PCR* (Life Technologies, USA). Para cada amostra e genes testados foram usadas as seguintes concentrações: 3µL de cDNA, 1µL de cada iniciador/sonda, 12,5µL de *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Life Technologies, EUA) e 8,5µL de H₂O ultra-pura. Todas as reações de qPCR foram realizadas em triplicata, segundo normas estabelecidas no *Minimum*

Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines (BUSTIN et al., 2009).

O cálculo do nível de expressão de cada um dos genes testados foi realizado através do Método CT comparativo ou Método $2^{-\Delta\Delta CT}$, dessa forma, o nível de expressão do gene de interesse é relatado em relação ao do gene de referência para cada amostra (SCHMITTGEN, LIVAK, 2008).

Análise dos dados

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Correlação Linear de Pearson (R^2), onde foram correlacionadas as concentrações de L3 e a variação de expressão gênica para cada um dos genes testados. Os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 5.0.

3.9 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE IN VITRO: TESTE DO COMETA

Princípio do teste

Desenvolvido por Singh et al. (1988) e, posteriormente, modificado por Anderson et al. (1994) é uma importante ferramenta utilizada nos estudos de biomonitoramento populacional. É um teste muito sensível para a detecção de vários tipos de danos causados no DNA (quebra de fitas dupla ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas) induzidos por compostos genotóxicos (FAUST et al., 2004).

O ensaio cometa consiste na lise das membranas celulares e na digestão de nucleoproteínas, incluindo as histonas. O DNA ocupará um espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula e permanecerá retido ao nucleóide. Quando submetidos à eletroforese, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo ou cauda. Para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: “cabeça” e cauda. Assim, células com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores (VOGELSTEIN et al, 1980; OLIVE, 1989; TICE, 2000).

A condição alcalina do teste e a migração dos danos no DNA estão associadas. Foi comprovado que essa condição é um fator importante para evidenciar o potencial genotóxico de uma determinada substância química em uma única célula. A eletroforese alcalina mostra, além do aumento da migração do DNA, a presença de sítios alcalino-lábeis, os quais são rapidamente convertidos em quebras de filamento (TICE, 2000).

Procedimento experimental

Para realização do cometa, foram preparadas previamente lâminas cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose de um dia para o outro. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão.

As células HCT-116 e HT-29 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 250000 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO² a 37°C. Após 21 horas de tratamento, foi realizado o tratamento com L3 nas concentrações 0,5 µM, 1,0 µM, 2,0 µM e 5,0 µM por 3 horas. Após a tratamento, as células foram lavadas e tripsinizadas para obtenção das células aderidas, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em aproximadamente 20 µL, da qual foi retirado 15 µL de suspensão e misturados a 300µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8%. Em seguida, a suspensão de células foi aplicada rapidamente sobre a primeira camada de agarose, sendo a lâmina, então, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura por 7 minutos até solidificar a agarose. Depois, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada na posição vertical em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA , 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4°C e protegida da luz por um período de 24 horas. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente em cuba de eletroforese e preenchida com tampão de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH ≥13). As lâminas foram mantidas em repouso por 20 minutos antes de dar início à eletroforese a fim de se permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi conduzida em baixa

luminosidade por 20 minutos, usando 34 V e uma corrente de 300 mA. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção da solução de eletroforese, o procedimento foi repetido utilizando-se H₂O destilada gelada, no entanto as lâminas foram mergulhadas por 5 minutos para serem neutralizadas. As lâminas foram fixadas mergulhando-as em etanol absoluto por três minutos. As células foram contadas em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX41) com 50 µL de Brometo de etídio (20µg/ mL).

Análise dos dados

A análise foi realizada de acordo como padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. (BURLINSON et al., 2007). Foram contadas 100 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a Figura 3. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos e 4 = dano total (>95%). A doxorubicina a 0,5 µM foi usada como controle positivo de citotoxicidade e 0,01% de DMSO como controle negativo.

Após a contagem das células e atribuição de escores nas duas lâminas de cada amostra foi estabelecido um índice de dano (ID) e obtido uma média final para cada amostra. O cálculo do índice de dano foi feito através da soma dos produtos do escore como número de danos respectivo a cada nível, com mostra a seguinte fórmula:

$$ID = (0 \times n) + (1 \times n) + (2 \times n) + (3 \times n) + (4 \times n)$$

Onde, ID é o índice de dano, n é a quantidade de danos obtida por escore.

Os dados foram analisados a partir da média ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por ANOVA seguida por Teste de Tukey, com nível de significância de 95% (p<0,05).

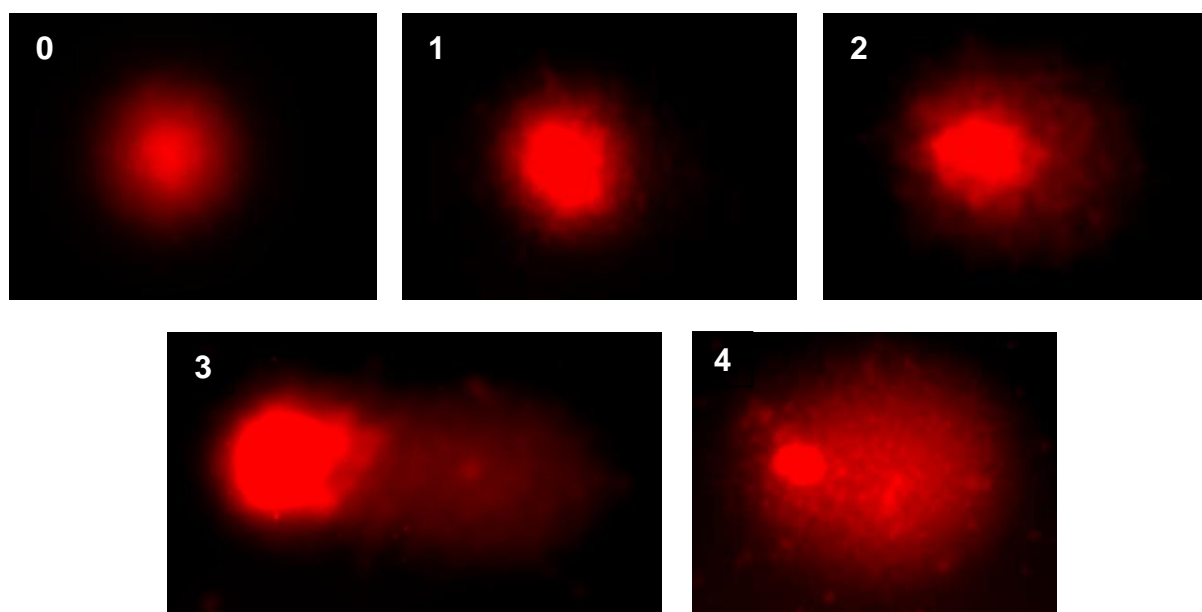


Figura 3: Classificação visual dos danos, representados em uma escala de 0-4, sugeridos por Collins e col. (1997). Imagens de cometas (a partir de linfócitos), coradas com Brometo de Etídio **Fonte:** SOARES, 2012

3.10 TOXICOLOGIA AGUDA (OECD,423, 2001)

Princípio do teste

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Procedimento experimental

Para este estudo, foram utilizados seis camundongos albinos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem swiss, os quais foram obtidos do biotério central do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os animais foram mantidos em biotério, a temperatura da sala de manutenção foi de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro. Foram acondicionados em caixas de polipropileno forradas com palha de arroz em pequenos grupos em estantes ventiladas, alimentados com ração peletizada, água *ad libitum* e observados diariamente.

Os animais foram divididos em dois grupos com três animais cada. O primeiro grupo foi tratado com uma dose única de 1000mg/Kg do extrato etanólico SM-EE, diluído em solução salina; o segundo grupo foi o grupo controle negativo, recebendo somente solução salina. Esses animais foram tratados pela via oral, por gavagem. Logo após administração, esses animais foram observados por duas horas para avaliação de possíveis alterações comportamentais, e posteriormente por 14 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; latência, duração e reversibilidade da toxicidade.

Após os 14 dias de avaliação, esses animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Foi feita a coleta de sangue para avaliação de patologia clínica. Foram feitas as análises hematológica, Bioquímica e histopatológica.

Determinação do perfil hematológico

A análise hematológica foi feita utilizando-se o contador de células automático para uso veterinário Cell Dyn Ruby® (Abbott Diagnostics) para determinação dos seguintes parâmetros hematológicos: Bastonetes, Segmentados, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Basófilos, Plasmócitos, Linfócitos atípicos, Leucoblastos, Pro-mielócitos, Mielócitos, Metamielócitos e Eritroblastos.

Determinação do perfil bioquímico

O perfil bioquímico dos camundongos foi acompanhado durante todo o período experimental, através da análise de Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato de aminotransferase (AST), Uréia, Creatinina, Fosfatase alcalina, Bilirrubina Total e Direta. Os procedimentos foram realizados através do Sistema de química seca ARCHITECT 5000® (Abbot Diagnostics), seguindo a metodologia preconizada pelos fabricantes dos kits para cada parâmetro analisado.

Análise da anatomia patológica e morfológica

Após o término do tratamento os animais foram eutanasiados e procedeu-se a coleta de diversos fragmentos de órgãos e tecidos para a realização dos exames histopatológicos do: Fígado, Baço, Rim, Pulmão, Coração, Pancreas, Estômago e Esôfago. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% -

pH 7,2, desidratados em álcool (70% - 80% - 90% - 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina no Laboratório de Histopatologia do CENP.

Realizou-se também a coloração diferencial por hematoxilina e eosina (H/E), para permitir a diferenciação do citoplasma e do núcleo, fornecendo assim subsídios de análise morfológica para sugerir o mecanismo de ação do composto em estudo.

Análise dos dados

Os dados foram expressos e analisados a partir da média e do erro padrão 6 animais. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Turkey, sendo que as diferenças serão consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0.

3.11 TESTE DO MICRONÚCLEO IN VIVO (OECD, 497, 1997)

Princípio do teste

O teste do micronúcleo é o ensaio, in vivo, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Procedimento experimental

Para a realização desse teste foram utilizados 15 camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) fêmeas que foram tratadas com o SM-EE e após 24h de tratamento, foram sacrificados para a análise dos números de eritrócitos monocromáticos e policromáticos na medula óssea, afim de avaliar os efeitos

citotóxicos causados na medula óssea, bem como a avaliação do potencial mutagênico induzido pelo extrato.

Os camundongos foram divididos em três grupos com cinco animais cada: 1) controle negativo, o qual recebeu apenas o veículo de diluição da substância teste; 2) controle positivo, o qual foi tratado com Ciclofosfamida, 200mg/kg (OECD, 474, 1997); 3) tratado, o qual recebeu o extrato SM-EE (extrato etanólico de *S. macrophylla*) na concentração de 1000mg/kg. Os animais foram pesados, com variação mínima de peso, não excedendo a 20%, e identificados individualmente.

O extrato foi administrado pela via oral, por gavagem, um animal por vez. Após 24h de tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Para a retirada da medula óssea, as pernas do animal foram limpas com álcool 70% e o osso fêmur (das duas pernas) foi retirado, com auxílio de pinça e tesoura de dissecação. O material retirado da medula óssea passou por centrifugação a 1000rpm por 5 minutos e posteriormente uma porção deste material foi colocado em lâminas de microscópio para realização do esfregaço (duas para cada animal); essas lâminas secaram a temperatura ambiente overnight.

Depois de secas as lâminas foram coradas com o corante Leishman a 2%. Tais lâminas foram analisadas em microscópio óptico para avaliação do número de eritrócitos monocromáticos e policromáticos na medula óssea, avaliação dos efeitos citotóxicos causados a medula óssea, bem como a avaliação do potencial mutagênico (ocorrência de micronúcleos) induzido pelo extrato.

Análise dos dados

Os dados foram expressos como média \pm DP e analisados a partir da média e do erro padrão da média de 5 animais. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Turkey, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS (*Mus musculus*, Swiss)

O estudo realizado para a determinação de atividade hemolítica em células de camundongos indicou que nenhum dos compostos provocou lise na membrana plasmática das células na maior concentração testada, apresentando $CE_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS IN VITRO: MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT

A atividade citotóxica do extrato etanólico de *S. macrophylla* (SM-EE) e dos limonóides foi avaliada pelo método do MTT, os resultados estão representados na tabela 6. O SM-EE apresentou CI_{50} variando entre 55,87 até $> 100 \mu\text{g/mL}$ nas linhagens testadas. Os limonóides mostraram atividade citotóxica diversa, com CI_{50} variando entre 0,18 - 7,45 μM .

A análise da ação citotóxica revelou que o extrato SM-EE causou citotoxicidade nas duas linhagens de câncer colorretal, HCT-116 e HT-29, apresentando CI_{50} 55,87 e 59,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os limonóides testados apresentaram citotoxicidade em duas linhagens tumorais, SKMEL-19 e HCT-116, onde os valores de CI_{50} variaram de 0,28 - 5,53 μM . O mesmo foi observado para linhagem de células normais (MRC-5), apresentando valores de CI_{50} 1,91 – 4,74 μM .

O limonóide L2 mostrou melhor resultado em células de melanoma (SKMEL-19), apresentando CI_{50} de 0,18 μM e CI_{50} de 1,91 μM em células normais (MRC-5).

Já o limonóide L3 apresentou excelente atividade citotóxica, após 72h de tratamento, em células da linhagem HCT-116 (colorretal), com valor de CI_{50} 0,28 μM . Vale ressaltar que em células normais esse mesmo composto apresentou de 4,075 μM , mostrando que L3 foi mais seletiva para células tumorais.

A doxorubicina, usada como controle positivo, apresentou elevada citotoxicidade em todas as linhagens testadas, com valores de CI_{50} menores que $0,5\mu\text{M}$.

Tabela 6: Valores da concentração da CI_{50} (concentração inibitória média do crescimento celular em μM), com a realização do teste do MTT, após 72h de incubação, para cinco linhagens tumorais (HCT-116, HT-29, ACP-03, SKMEL19, MDAMB231) e linhagem normal de fibroblasto pulmonar humano (MRC5). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. ND: não determinado. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

COMPOSTO	CI_{50} (μM)						HEMÓLISE ($\mu\text{g/mL}$)
	SKMEL-19	HCT-116	HT-29	ACP03	MDAMB231	MRC5	
SM-EE	> 100 $\mu\text{g/mL}$	55,87 (37,2 - 83,8)	59,7 $\mu\text{g/mL}$ (43,3 - 82,5)	ND	ND	> 100 $\mu\text{g/mL}$	>200
L0	0,97 (0,80 - 1,18)	>10	ND	>10	>10	4,74 (3,84 - 5,84)	>200
L2	0,18 (0,12 - 0,27)	0,5 (0,36-0,67)	ND	>10	>10	1,91 (1,44 - 2,54)	>200
L3	1,96 (1,6 - 2,4)	0,28 (0,13 - 0,57)	7,45 (2,71 - 10,4)	>10	>10	4,075 (1,9 - 8,7)	>200
L4	1,633 (1,27 - 2,10)	0,51 (0,36-0,72)	ND	>10	>10	2,49 (1,63 - 3,8)	>200
L7	5,53 (4,41 - 6,93)	0,69 (0,54-0,88)	ND	>10	>10	3,74 (2,88 - 4,8)	>200
Doxorubicina	0,045 (0,013-0,15)	0,045 (0,03 - 0,05)	0,079 (0,05 - 0,11)	0,274 (0,2 - 0,33)	0,43 (0,36 - 0,52)	0,2 (0,16 - 0,25)	>200

Fonte: Dados obtidos por regressão não-linear, utilizando o *software* GraphPad prism 5.0.

A partir dos dados do teste de citotoxicidade, escolheu-se para dar continuidade a este trabalho a linhagem HCT-116, por apresentar maior sensibilidade aos compostos testados. Foi ainda selecionado o composto L3 (Figura 4), devido seu excelente efeito citotóxico frente à linhagem selecionada, apresentando CI_{50} aproximadamente 14 vezes menor do que o valor da CI_{50} em células normais.

Também foi escolhida a linhagem HT-29 para comparação com a linhagem HCT-116, pois esta última apresenta o gene p53 selvagem, já HT-29 possui esse gene na sua forma mutada. No teste do MTT, verificamos que a linhagem HCT-116 apresenta maior sensibilidade ao limonóide L3 quando comparamos com HT-29 (Tabela 6).

A partir desses dados, foram escolhidas as concentrações 0,5, 1, 2 e 5 μ M para continuar os testes subsequentes.

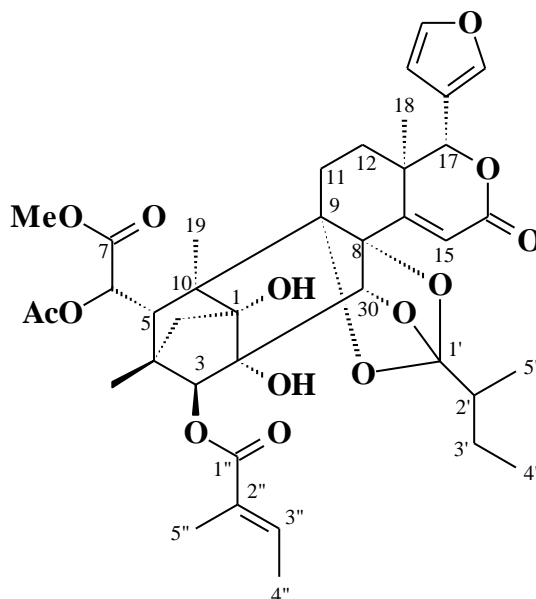


Figura 4: Estrutura química do limonoide L3, isolado de folhas de *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). Fonte: DA SILVA et al., 2008

4.3 ENSAIO CLONOGÊNICO

Os resultados obtidos no ensaio clonogênico estão representados na Figura 5. Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do número de colônias após oito dias de tratamento com L3 nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0 μ M, comparando-se ao controle negativo na linhagem HCT-116 (Figura 5-A), enquanto que na linhagem HT-29 somente houve redução significativa no número de colônias nas concentrações 0,5 e 1,0 μ M ($p < 0,05$) (Figura 5-B). O tratamento com doxorrubicina (0,1 μ M) também causou redução significativa ($p < 0,05$).

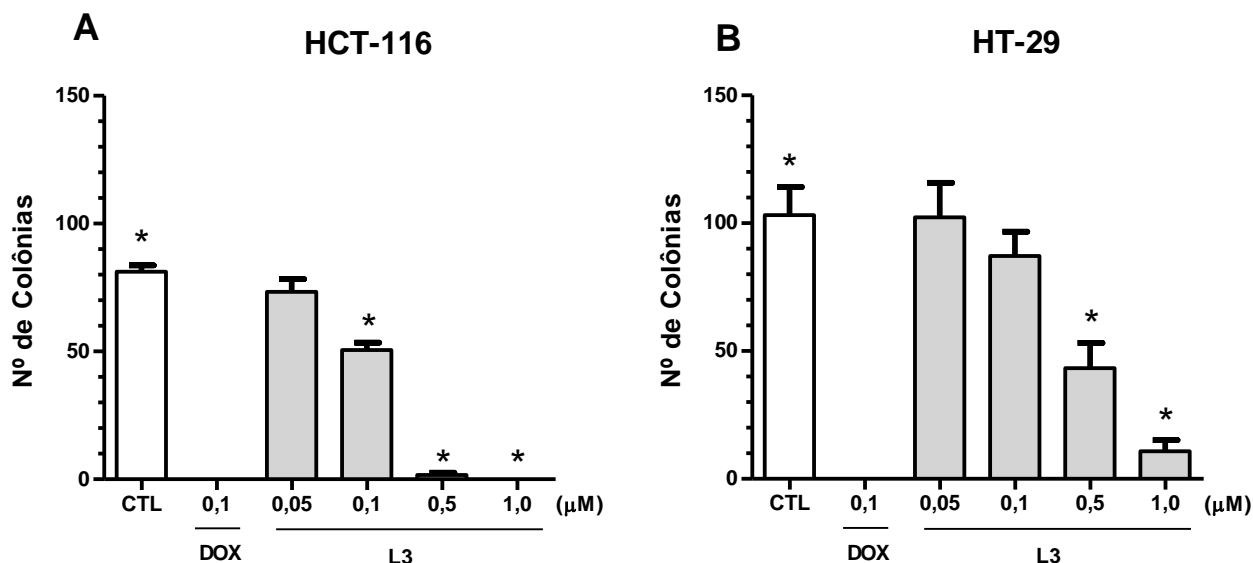


Figura 5: Efeito de L3 sobre as linhagens HCT-116 (A) e HT-29 (B) no ensaio clonogênico, após 7 dias de incubação. As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Tukey.

4.4 ANÁLISE DO PADRÃO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE/NECROSE) ATRAVÉS DA COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA

A morfologia das células das linhagens HCT-116 e HT-29 foi investigada utilizando a coloração laranja de acridina e brometo de etídio para microscopia de fluorescência. Células uniformemente verdes com morfologia normal foram observadas no grupo controle atingindo mais de 85% das células contadas. Após 72h de tratamento com L3, observou-se significativo aumento crescente de células em apoptose nas concentrações 0,5, 1, 2 e 5 μ M comparado ao controle negativo nas duas linhagens ($p < 0,01$) (Figura 6-A e B). Ao compararmos o efeito de L3 entre as duas linhagens, percebeu-se que HCT-116 se mostra mais sensível, apresentando maior número de células em apoptose, exceto na maior concentração testada (5 μ M) onde não há diferença. Não houve diferença significativa no padrão de morte celular por necrose em nenhuma das concentrações testadas

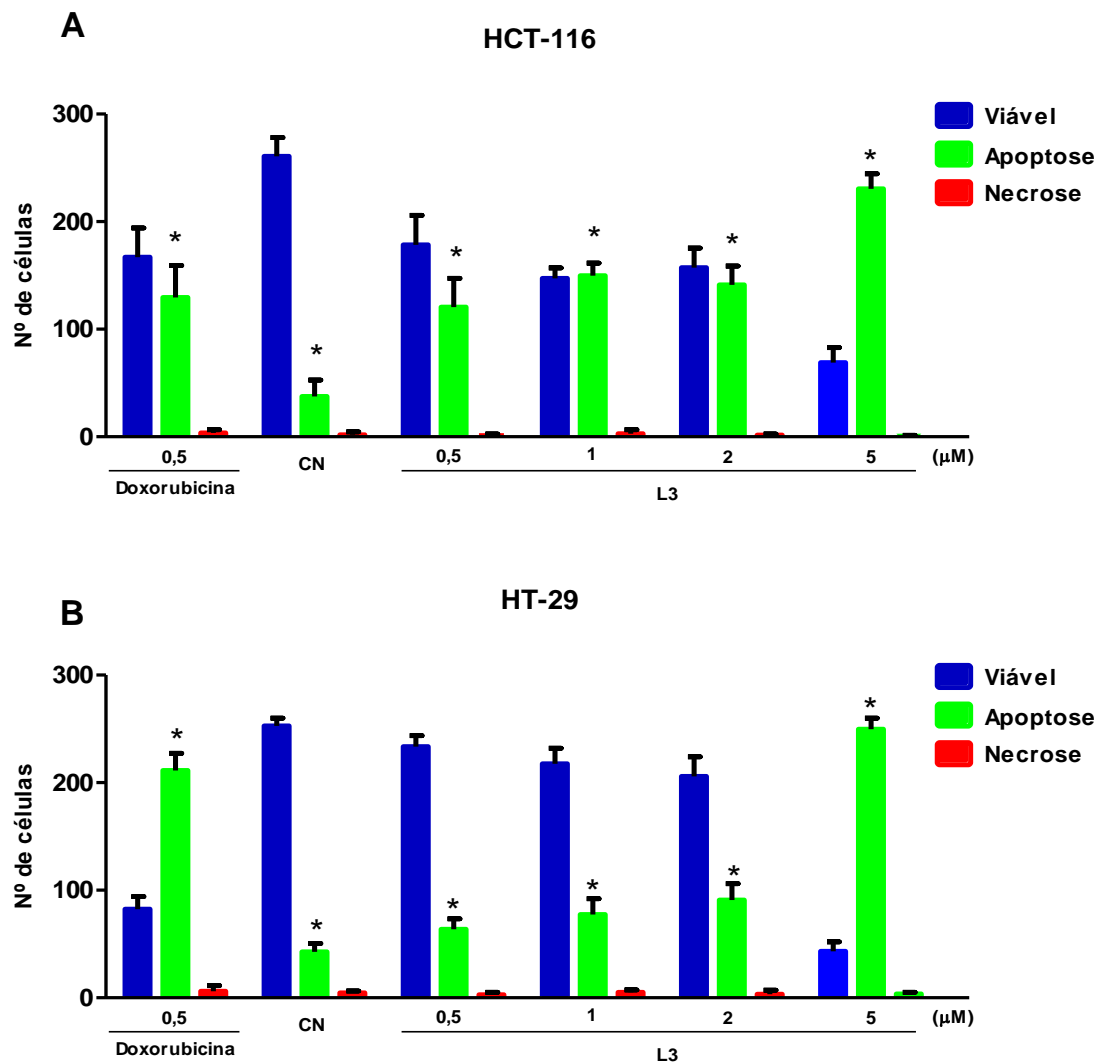


Figura 6: Análise do padrão de morte celular ocasionada pelo limonoide L3 nas linhagens de câncer colorretal HCT-116 (A) e HT-29 (B) através da coloração diferencial de brometo de etídio/laranja de acridina. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado o número de células apoptóticas com o controle negativo (CN) e positivo (doxorubicina) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Tukey.

4.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A atividade sobre o ciclo celular das células HCT-116 e HT-29 foi avaliada após 48 e 72h de tratamento com L3 nas concentrações 0,5µM, 1,0µM, 2,0µM e 5,0µM e doxorubicina na concentração de 0,5µM, como controle positivo.

Na linhagem HCT-116, a partir da concentração 1,0 µM, ocorre significativo acúmulo de células na fase G2/M, a partir de 48h de tratamento e persiste no tempo

de 72h (Tabela 7), onde cerca de 45% das células analisadas se encontravam nessa fase na duas maiores concentrações testadas. Já na linhagem HT-29, também ocorre acúmulo de células em G2/M, porém somente a partir da concentração 2,0 μM (Tabela 8), com 42% de células nessa fase. Além disso, na linhagem HCT-116, a quantidade de células em G2/M tratadas com L3 é significativamente maior do que em HT-29.

Tabela 7: Efeito de L3 sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HCT-116 tratadas por 48 e 72h, avaliado por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias de três experimentos independentes, realizados em triplicatas, com 10000 eventos adquiridos em cada replicata. *Significativamente diferente do controle (CTL) negativo, $p < 0,05$; † Significativamente diferente do controle positivo, $p < 0,05$.

Tempo de tratamento	Amostras (μM)	Distribuição das fases do ciclo celular (%)			
		Sub-G1	G1/G0	S	G2/M
48h	CTL negativo	4.42 \pm 0.46	56.33 \pm 0.51 [†]	17.72 \pm 0.49	20.31 \pm 0.48 [†]
	0,5	7.04 \pm 0.67 [†]	55.13 \pm 0.58 ^{*†}	13.72 \pm 0.71 ^{*†}	22.85 \pm 0.69 [†]
	1,0	7.10 \pm 0.77*	48.27 \pm 0.68 ^{*†}	17.66 \pm 0.65	24.41 \pm 0.64 ^{*†}
	2,0	7.88 \pm 0.89 ^{*†}	26.99 \pm 0.91*	20.16 \pm 0.93*	41.16 \pm 0.95 ^{*†}
	5,0	8.98 \pm 0,69 ^{*†}	21.87 \pm 0,68 ^{*†}	21.65 \pm 0.73*	44.13 \pm 0.77 ^{*†}
	CTL positivo	3.35 \pm 1.08	12.64 \pm 1.12*	19.77 \pm 1.07	67.91 \pm 1.11*
72h	CTL negativo	4.33 \pm 0.48	54.74 \pm 0.67 [†]	18.34 \pm 0.63	21.73 \pm 0.56 [†]
	0,5	8.45 \pm 0.76 [†]	54.00 \pm 0.76 ^{*†}	11.23 \pm 0.80 ^{*†}	24.04 \pm 0.72 [†]
	1,0	8.34 \pm 0.87*	43.54 \pm 0.84 ^{*†}	16.00 \pm 0.93 [†]	29.73 \pm 0.97 ^{*†}
	2,0	9.53 \pm 0.78 ^{*†}	23.19 \pm 0.90*	21.94 \pm 1.00*	41.04 \pm 0.91 ^{*†}
	5,0	9.68 \pm 0,67 ^{*†}	20.10 \pm 0,60 ^{*†}	20.99 \pm 0.59*	45.48 \pm 0.63 ^{*†}
	CTL positivo	5.86 \pm 0.98	13.50 \pm 0.95*	21.76 \pm 1.01	67.87 \pm 1.06*

Fonte: Dados obtidos a partir do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, seguido do pós teste de Games-Howell.

Tabela 8: Efeito de L3 sobre a distribuição das fases do ciclo celular em células HT-29 tratadas por 48 e 72h, avaliado por citometria de fluxo. Os valores apresentados correspondem às médias de três experimentos independentes, realizados em triplicatas, com 10000 eventos adquiridos em cada replicata. *Significativamente diferente do controle (CTL) negativo, $p < 0,05$; † Significativamente diferente do controle positivo, $p < 0,05$.

Tempo de tratamento	Amostras (μM)	Distribuição das fases do ciclo celular (%)			
		Sub-G1	G1/G0	S	G2/M
48h	CTL negativo	3.02 \pm 0.47	64.04 \pm 0.57 [†]	13.29 \pm 0.45 [†]	17.57 \pm 0.77 [†]
	0,5	8.74 \pm 0.47 ^{*†}	60.34 \pm 0.51 ^{*†}	13.02 \pm 0.41 [†]	16.09 \pm 0.79 [†]
	1,0	8.99 \pm 0.66 ^{*†}	52.01 \pm 0.47 ^{*†}	16.12 \pm 0.48 ^{*†}	18.18 \pm 0.81 [†]
	2,0	8.67 \pm 0.69 ^{*†}	51.66 \pm 0.51 ^{*†}	16.34 \pm 0.49 ^{*†}	22.57 \pm 0.88 ^{*†}
	5,0	8.23 \pm 0,73 ^{*†}	22.75 \pm 0,64 ^{*†}	33.80 \pm 0.51 ^{*†}	35.22 \pm 0.89 [*]
	CTL positivo	4.36 \pm 0.57	28.73 \pm 0.78 [*]	27.46 \pm 0.56 [*]	35.56 \pm 0.84 [*]
72h	CTL negativo	3.33 \pm 0.55	65.74 \pm 0.65 [†]	13.84 \pm 0.63 [†]	16.99 \pm 0.63 [†]
	0,5	8.31 \pm 0.76 ^{*†}	56.45 \pm 0.77 ^{*†}	14.00 \pm 0.83 [†]	18.73 \pm 0.84 [†]
	1,0	9.95 \pm 0.93 ^{*†}	49.66 \pm 0.96 ^{*†}	23.55 \pm 0.99 ^{*†}	17.63 \pm 0.89 [†]
	2,0	9.45 \pm 0.88 ^{*†}	46.12 \pm 0.87 ^{*†}	27.14 \pm 0.89 ^{*†}	20.53 \pm 0.85 ^{*†}
	5,0	10.54 \pm 0,84 ^{*†}	18.86 \pm 0,82 ^{*†}	30.00 \pm 0.81 ^{*†}	40.44 \pm 0.80 ^{*†}
	CTL positivo	5.58 \pm 0.79	32.42 \pm 0.77 [*]	26.56 \pm 0.75 [*]	31.57 \pm 0.71 [*]

Fonte: Dados obtidos a partir do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, seguido do pós teste de Games-Howell.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA por PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (PCR-RT)

As análises por PCR em tempo real avaliaram a expressão de genes que estão envolvidos na fase G2 e M do ciclo celular.

O gene *ATM* é ativado mediante os danos no DNA, respondendo principalmente a quebras de fita dupla no DNA. A ativação de ATM pode causar bloqueio do ciclo celular em G1, S ou G2. Esse processo pode ser mediado através da ação de Chk1 ou Chk2, duas quinases de *checkpoint*. O principal responsável pelo *checkpoint* em G1 é a proteína p53. A ativação do gene *TP53* pode

desencadear uma sinalização apoptótica pela via intrínseca, com a ativação de genes pró-apoptótico (*BAX* e *BAK*), promovendo a liberação do conteúdo mitocôndria, com consequente ativação de caspases efetoras.

A análise da expressão do mRNA por PCR em tempo real mostrou que houve significativo aumento na expressão do gene *ATM*, nos dois tempos avaliados em ambas as linhagens HCT-116 (Figura 7-A e B) e HT-29 (Figura 7-C e D), de maneira dose-dependente. Na linhagem HCT-116, a expressão de *ATM* aumentou em 96% em comparação ao controle negativo na maior concentração testada, após 72h de tratamento. Já na HT-29, esse aumento foi menor, aproximadamente 70%.

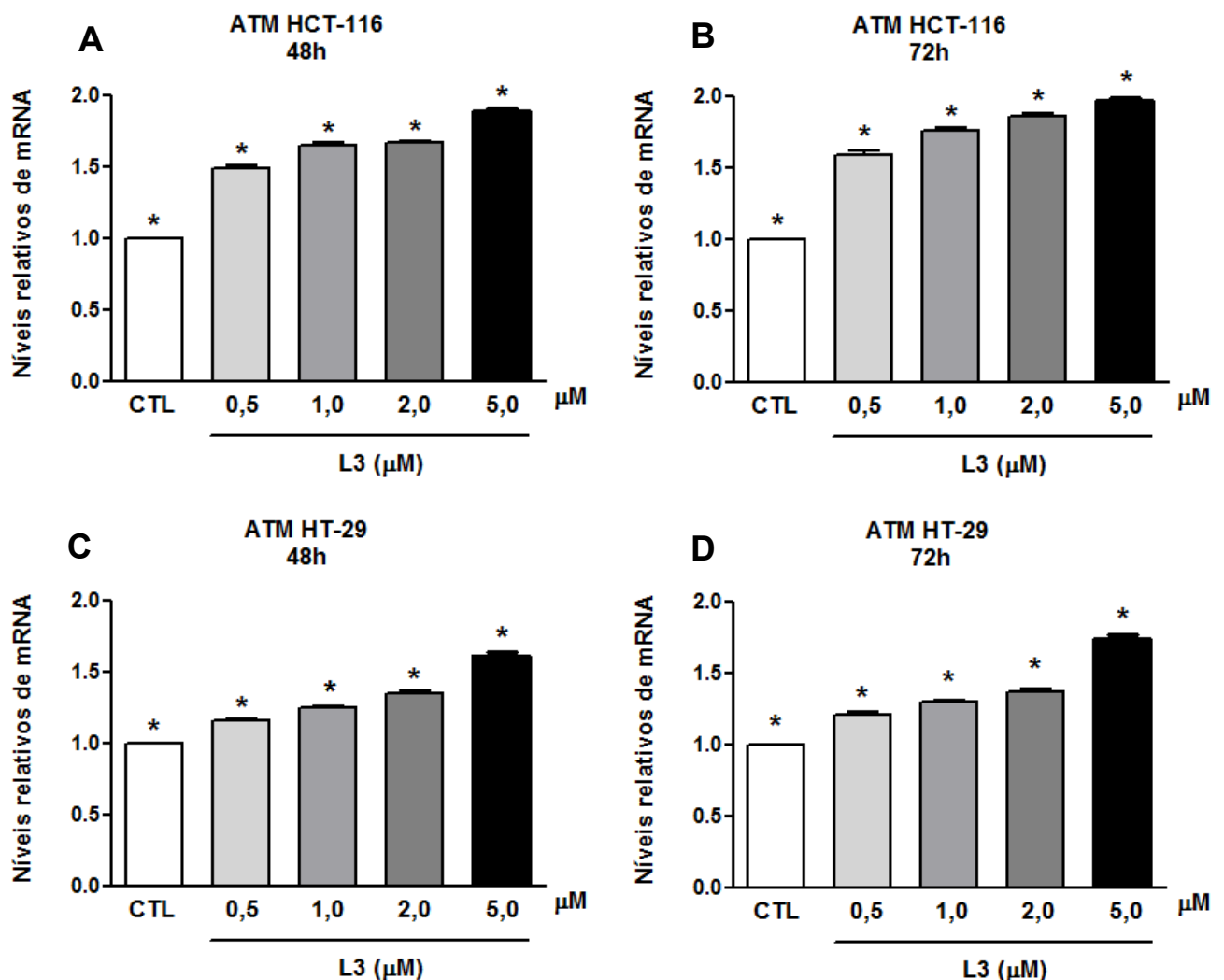


Figura 7: Níveis de expressão do gene *ATM* nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

O gene *CHK-2*, o qual é ativado por *ATM*, também teve sua expressão aumentada, porém na linhagem HCT-116 essa expressão aumentou em todas as concentrações testadas a partir de 48h de tratamento, a qual alcançou 75% de aumento em comparação ao controle negativo na maior concentração testada (Figura 8-A e B), já na linhagem HT-29 esse aumento somente é significativo a partir da concentração 2,0 μ M, e aumentou em 44% sua expressão na maior concentração (Figura 8-C e D).

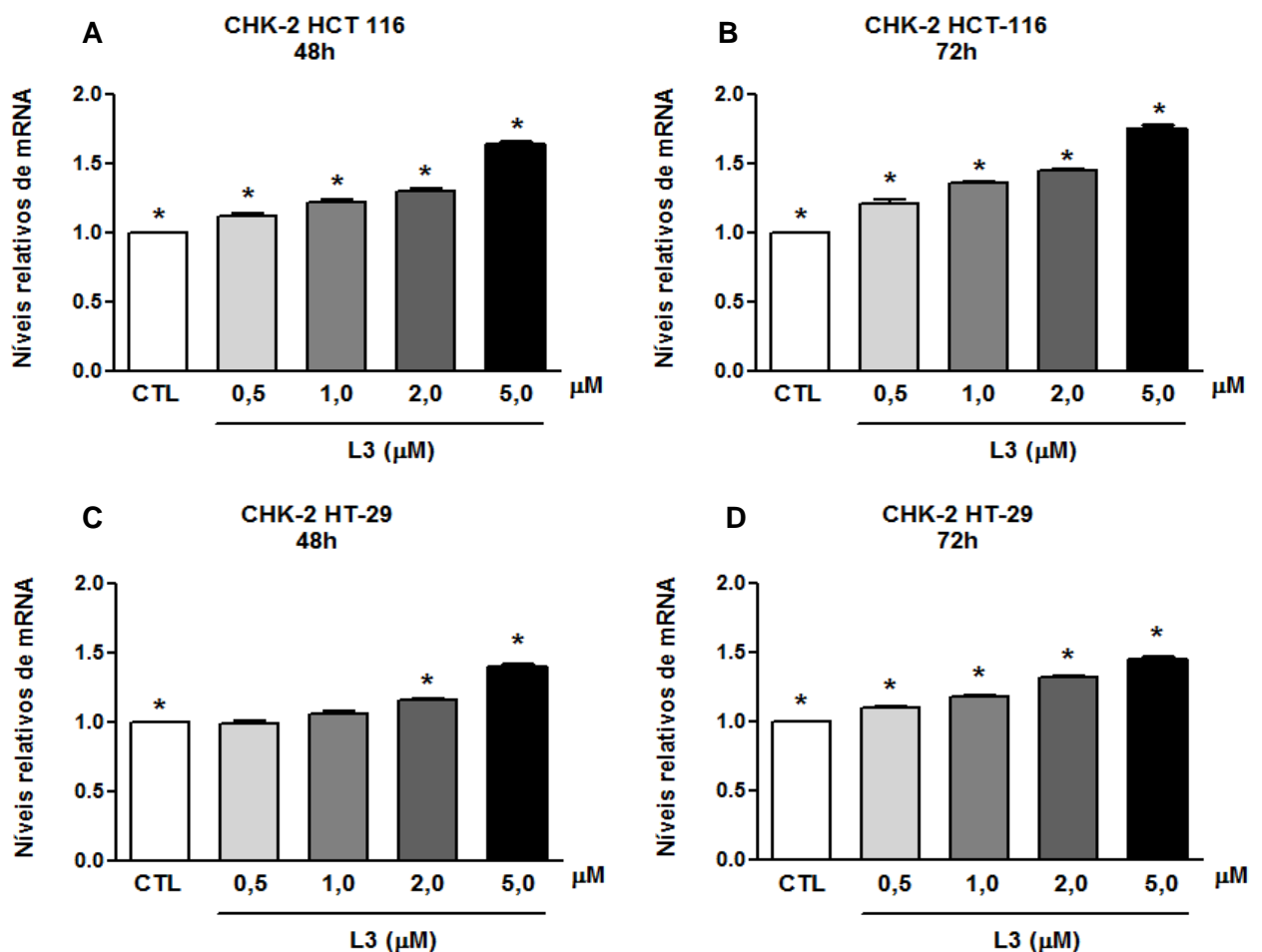


Figura 8: Níveis de expressão do gene *CHK-2* nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

O gene *TP53* teve sua expressão aumentada na linhagem HCT-116, nos dois tempos avaliados (Figura 9-A e B). No entanto, esse aumento foi observado a partir da concentração 2,0 μ M no tempo de 48h, e a partir de 1,0 μ M no tempo de 72h; essa expressão aumentou em 48% na maior concentração testada em

comparação ao controle negativo. Já na linhagem HT-29, também houve aumento significativo na expressão desse gene, porém ocorreu em todas as concentrações testadas, nos dois tempos avaliados, chegando a 53% (Figura 9-C e D).

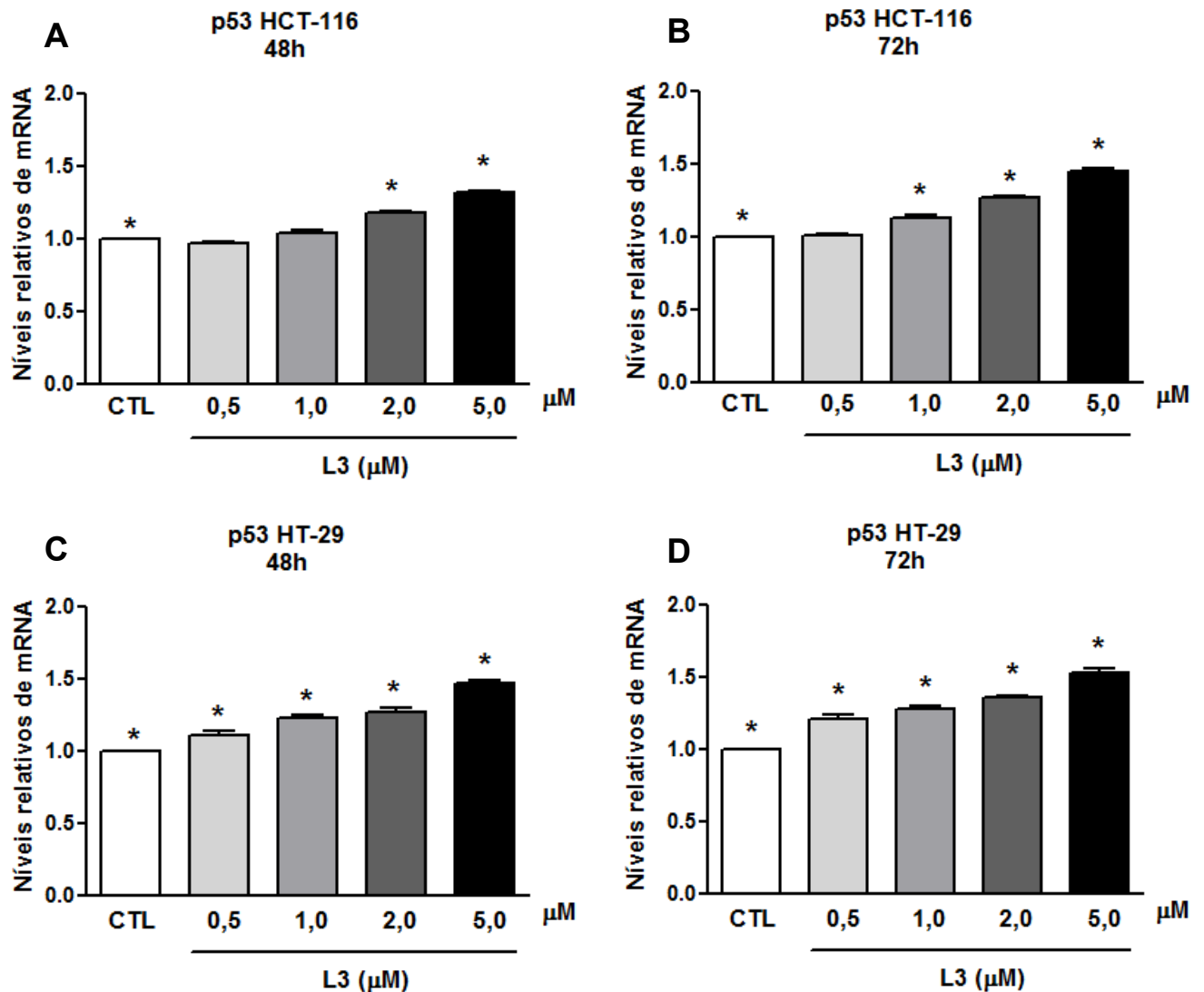


Figura 9: Níveis de expressão do gene p53 nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

O gene *ARF* teve sua expressão aumentada na linhagem HCT-116, nos dois tempos avaliados, a partir da concentração 1 μM, essa expressão aumentou em 49% na maior concentração testada (Figura 10-A e B). Na linhagem HT-29, também houve aumento significativo na expressão desse gene, porém ocorreu a

partir da concentração 1 μM , após 48h de tratamento, e em todas as concentrações testadas, após 72h (Figura 10- C e D).

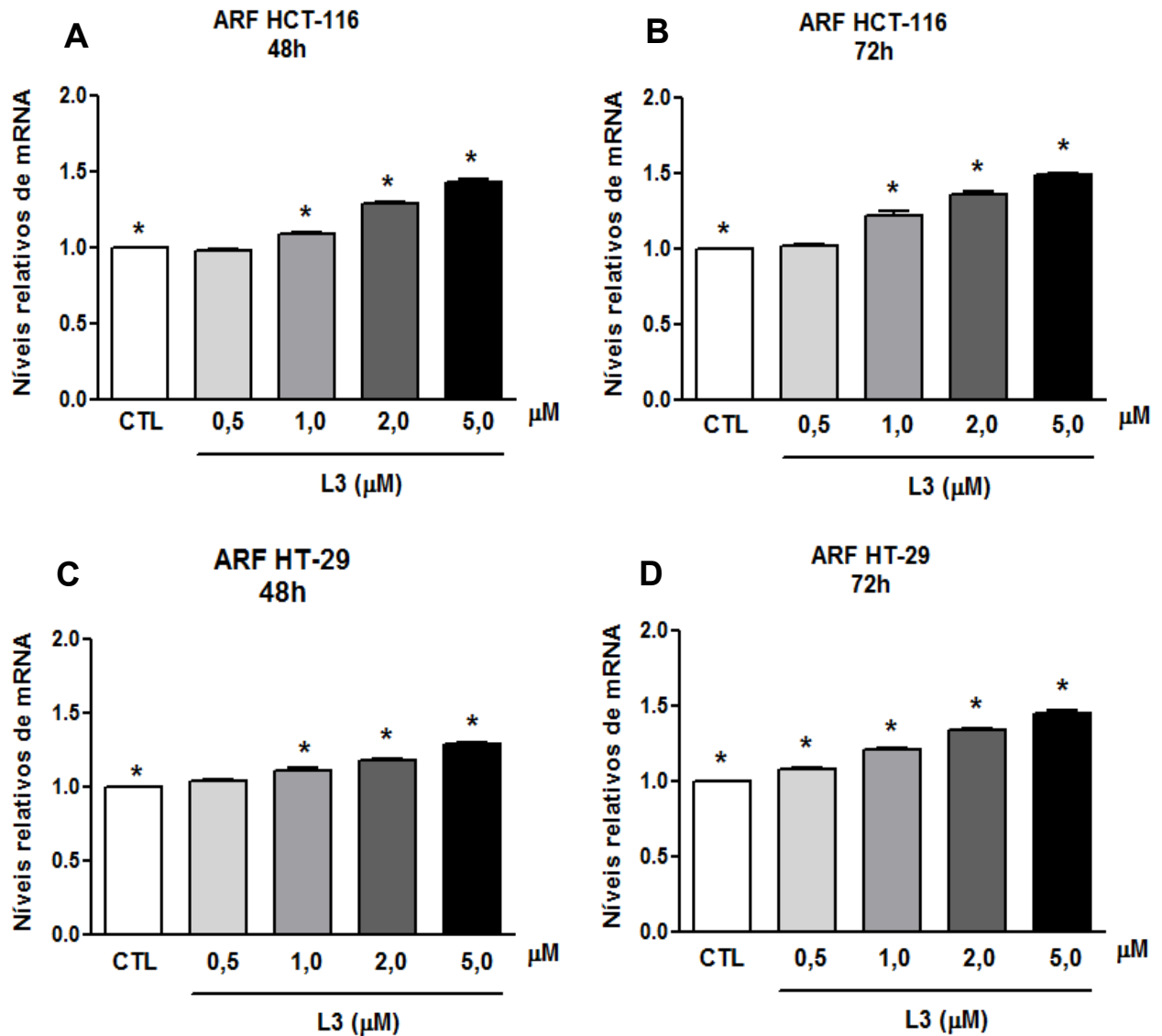


Figura 10: Níveis de expressão do gene *ARF* nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

Ao analisar o gene p21, observou-se aumento significativo a partir da concentração 1,0 μM na linhagem HCT-116, nos dois tempos de tratamento com L3 (Figura 11-A e B). Essa expressão aumentou em 70% na maior concentração testada. Já na linhagem HT-29, a expressão de p21 foi drasticamente diminuída no tempo de 48h, em todas as concentrações testadas (Figura 11-C). A expressão foi diminuída em 43%. No tempo de 72h, somente na concentração de 5 μM , foi observado aumento das expressão desse gene (Figura 11-D).

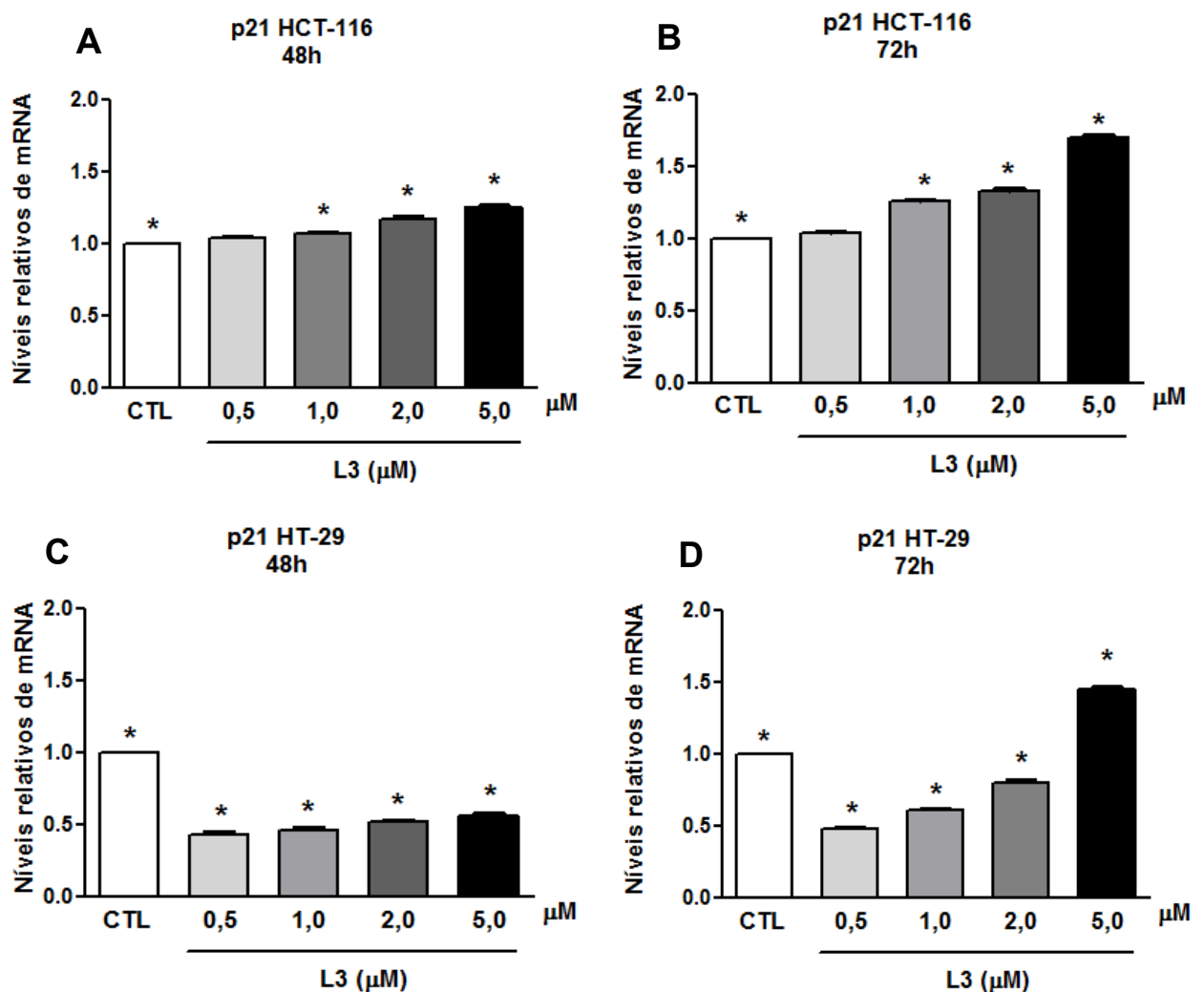


Figura 11: Níveis de expressão do gene p21 nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

Para avaliação de morte por apoptose, foi realizada a expressão de caspase-3, a qual está relacionada com a ativação da via intrínseca da apoptose. Observou-se aumento na expressão de Caspase-3, nas duas linhagens analisadas, nos dois tempos de tratamento, nas concentrações 2,0 e 5,0 μ M (Figura 12). A expressão de caspase-3 aumenta em 30%, aproximadamente, nas duas linhagens, na maior concentração testada.

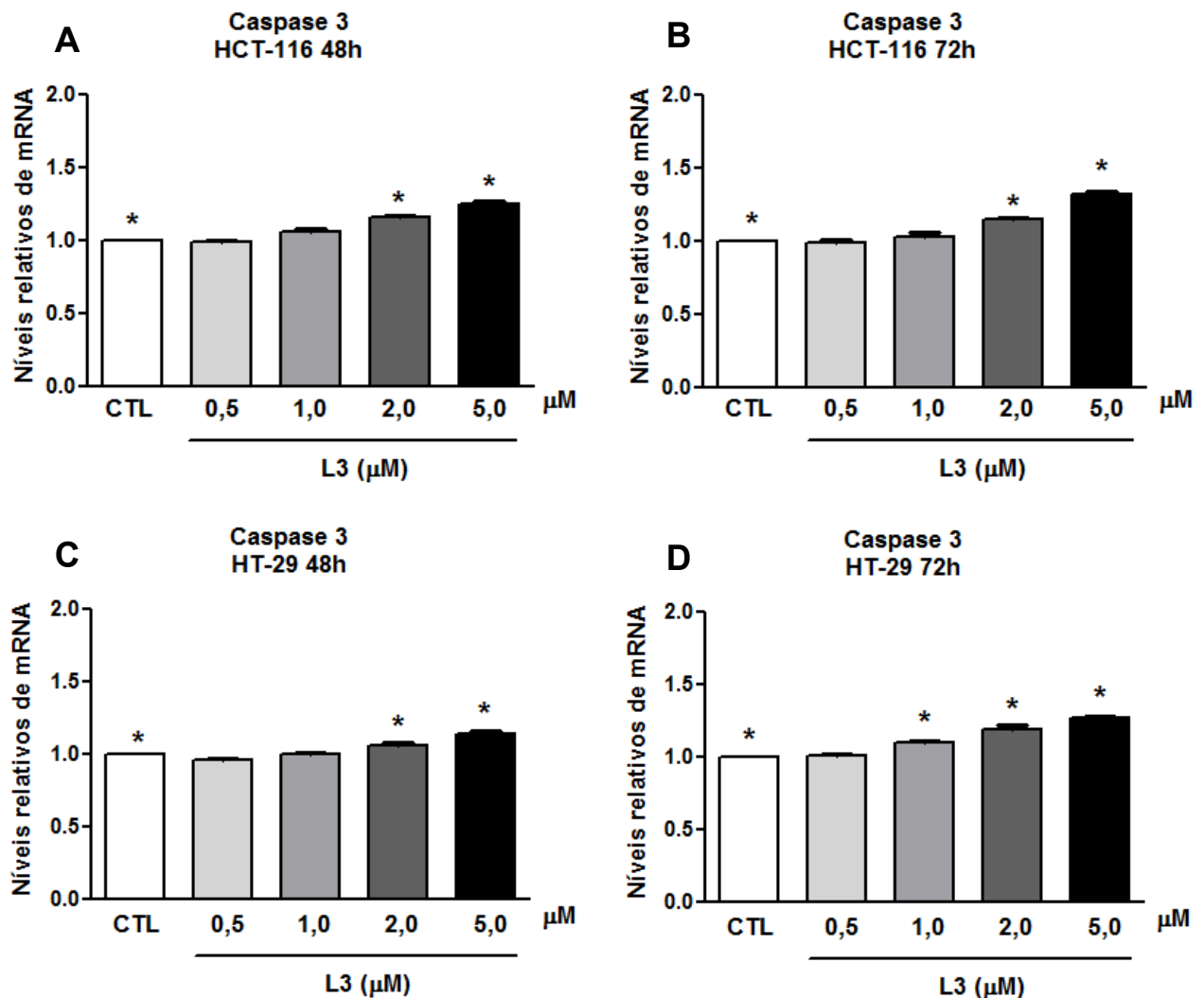


Figura 12: Níveis de expressão do gene da Caspase-3 nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

Também foi analisado o gene de *BCL-2*, o qual tem função anti-apoptótica, onde houve significativa diminuição na sua expressão também nas duas linhagens e nos dois tempos de tratamento nas concentrações 2,0 e 5,0 μ M (Figura 13). No entanto, essa diminuição foi mais acentuada na HCT-116, onde diminuiu 40% na maior concentração testada

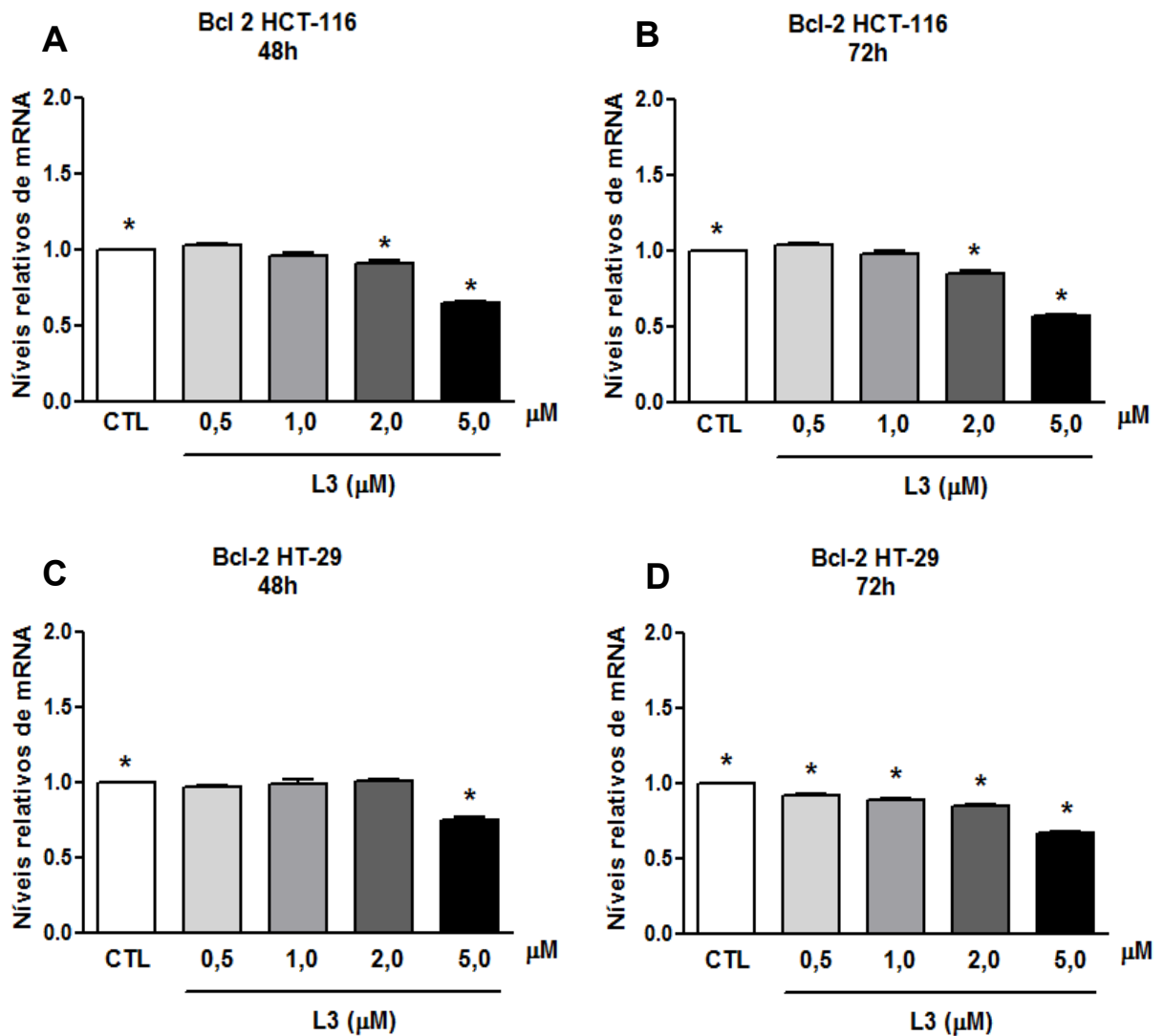


Figura 13: Níveis de expressão do gene *BCL-2* nas linhagens HCT-116 (A e B) e HT-29 (C e D), após 48 e 72h de tratamento com L3. As barras representam média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado a expressão de mRNA no controle negativo (CTL) por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do pós teste de Turkey.

4.7 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE IN VITRO: TESTE DO COMETA

A atividade genotóxica de L3 foi avaliada através do ensaio do cometa versão alcalina, o qual revela quebras na fita dupla de DNA. As células foram incubadas por 3h com L3 nas concentrações 0,5 μ M, 1,0 μ M, 2,0 μ M e 5,0 μ M e doxorubicina na concentração de 0,5 μ M, como controle positivo. O índice de dano no DNA somente foi significativo nas duas maiores concentrações testadas (2,0 μ M e 5,0 μ M), em ambas as linhagens (Figura 14). No entanto, esse dano foi maior na linhagem HCT-116.

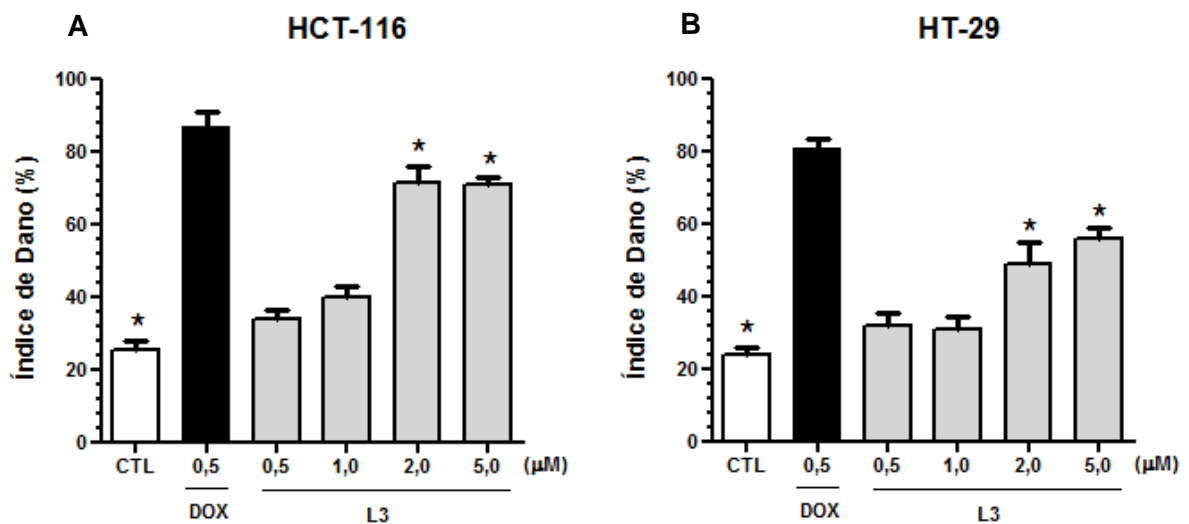


Figura 14: Índice de dano causado pelo tratamento com L3 nas linhagens de câncer colorretal HCT-116 (A) e HT-29 (B). * $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado controle negativo por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido de teste Tukey.

4.8 TOXICOLOGIA AGUDA (OECD,423, 2001)

O extrato etanólico de *S. macrophylla* não causa toxicidade em camundongos adultos, após administração via oral, de 1000mg/kg. Também não foi observado variação no comportamento dos animais.

Os parâmetros bioquímicos analisados (bilirrubina total e direta, ureia e creatinina) e a análise hematológica estavam dentro da faixa de referência, não houve alterações significativas quando comparadas com o controle negativo.

Na análise histopatológica, foi verificada pequenas alterações fígado, rins e baço, indicando toxicidade leve passíveis de alteração. Observou-se hiperplasia de polpa branca no baço, sugerindo que o extrato apresente possível atividade imune de natureza adjuvante.

4.9 TESTE DO MICRONÚCLEO IN VIVO (OECD, 497, 1997)

Foram avaliados os efeitos mutagênicos e citotóxicos do extrato etanólico de *S. macrophylla*, mediante a comparação entre três grupos experimentais. Para essa avaliação foi realizada a análise de 2000 eritrócitos por lâmina, a fim de verificar a frequência de micronúcleos, bem como a quantidade de eritrócitos policromáticos e normocromáticos.

O teste do micronúcleo foi considerado negativo para SM-EE, uma vez que não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o controle negativo em relação a frequência de Eritrócitos policromáticos com micronúcleos (Figura 15). A ocorrência média de micronúcleos no grupo controle positivo foi de 71,7, no grupo controle negativo foi de 20,9 e no grupo tratado com extrato etanólico aproximadamente 30. Com relação à avaliação da citotoxicidade, mediante a contagem do número de eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC), houve diferença significativa entre a quantidade de EPC e ENC nos grupos de controle negativo e tratado.

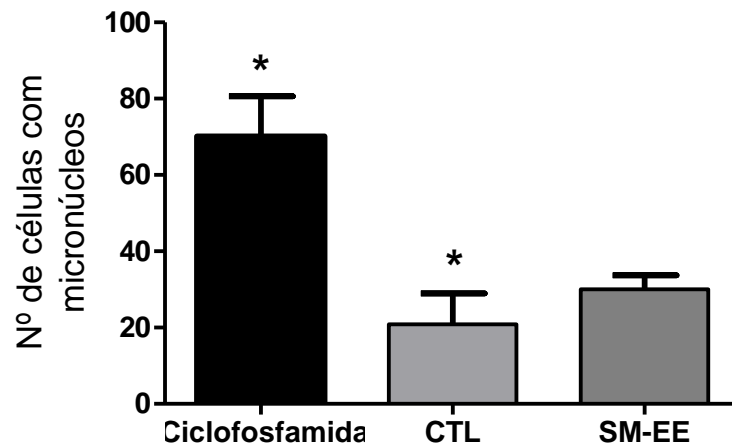


Figura 15: Número de células com micronúcleos dos animais tratados com SM-EE ou ciclofosfamida (controle positivo) por 24h. As barras representam a média \pm E.P.M. de cinco animais por grupo, numa contagem de 2000 células policromáticas. Foi considerado estatisticamente significativo (* $p < 0,001$), quando comparado ao controle negativo por análise de variância (ANOVA *one way*), seguido de pós-teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

Compostos derivados de plantas sempre foram importantes fontes de medicamentos para várias doenças e têm recebido atenção considerável em virtude das suas diferentes propriedades farmacológicas incluindo a citotoxicidade (GONZALES, VALERIO, 2006; GOH, ABDUL KADIR, 2011). Nos últimos anos, houve grande interesse científico e comercial na descoberta contínua de novos agentes anticancerígenos de origem vegetal (CRAGG, NEWMAN, 2005; 2013), devido a crescente compreensão de seu significado biológico, origem e função de sua diversidade estrutural (CONFORTI et al., 2008; GOH, ABDUL KADIR, 2011).

A triagem de drogas anticâncer em modelos in vitro tem sido um importante caminho na pesquisa do câncer. Assim, um método eficaz de triagem desses compostos é um ponto de partida e um passo decisivo na pesquisa de futuros medicamentos inovadores (CHEN, et al., 2009).

Limonóides isolados de plantas da família Meliaceae tem sido amplamente estudados quanto seu potencial antitumoral (BABYKUTTY et al., 2012; GUPTA et al., 2010a; GUPTA et al., 2010b). Neste trabalho, foi proposto estudar ação antitumoral do extrato etanólico e limonoide L3, isolado de folhas de *Swietenia macrophylla*, espécie de planta pertencente à família Meliaceae, vulgarmente conhecida como mogno, a qual tem ampla distribuição natural que se estende do México à Bolívia e Brasil Central (KRISNAWATI et al., 2011).

Extratos isolados, principalmente da semente de *S. macrophylla*, são tradicionalmente utilizados para tratamento de malária, anemia, diarreia, febre, disenteria, hipertensão, tosse, dores no peito, parasitismo intestinal e câncer (NAGALAKSHMI et al, 2001; MAITI et al, 2007; CHEN et al., 2009; GOH, ABDUL KADIR, 2011;). Neste trabalho, o extrato etanólico extraído das folhas de *S. macrophylla* foi testado em três linhagens tumorais: SK-MEL-19 (melanoma), HT-29 (colorretal), HCT-116 (colorretal), onde apresentou atividade citotóxica somente em HT-29 e HCT-116. Goh e Abdul Kadir (2011) desenvolveram um estudo utilizando extrato etanólico isolado das sementes dessa espécie, avaliando sua atividade citotóxica em quatro linhagens tumorais: Ca Ski (cervical), MCF-7 (mama), HepG2 (hepatocarcinoma) e HCT-116 (colorretal), onde também foi observada ação citotóxica variada com CI_{50} entre 48,27 - 135,49 $\mu\text{g/mL}$, sendo que na linhagem HCT-116 esse valor foi 48,27 $\mu\text{g/mL}$.

Análises químicas demonstraram que os limonóides são os metabólitos secundários predominantes no extrato de folhas de *S. Macrophylla*, sendo, provavelmente, responsáveis pela atividade observada (SILVA et al., 2008). Nesse trabalho, os limonóides isolados da folha de *S. macrophylla* mostraram grande atividade citotóxica in vitro quando testada em duas linhagens tumorais humanas, câncer colorretal e melanoma (HCT-116 e SKMEL-19, respectivamente). A CI_{50} variou entre 0,28 μ M à $>10\mu$ M na linhagem HCT-116 e 0,18 - 5,53 μ M na linhagem SKMEL-19 (Tabela 6). De acordo com a literatura, compostos puros podem ser considerados promissores para justificar novos estudos quando apresentarem CI_{50} menor que 1 μ M (PESSOA et al., 2000).

Os limonoides Nimbolida e Azadiractina, isolados de *Azadirachta indica* (Meliaceae), se mostraram citotóxicos quando testados em células da linhagem HeLa (câncer do colo do útero), as quais apresentaram CI_{50} 5 e 135 μ M, respectivamente (PRIYADARSINI et al., 2010). Outro limonoide, Eritrocarpina E (CEB4), isolado de *Chisocheton erythrocarpus* (Meliaceae), apresentou citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma escamoso oral (HSC-4), carcinoma cervical (Ca Ski), hepatocarcinoma (HepG2) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), apresentando valores de CI_{50} 4, 8,5, 6 e 14 μ M, respectivamente, após 24h de tratamento (NAGOOR et al., 2011). Considerando esses valores, os limonoides testados mostraram grande potencial citotóxico, principalmente na linhagem de câncer colorretal HCT-116.

De acordo com outros autores, na avaliação do potencial antitumoral de um composto é importante utilizar células normais para avaliação de seletividade desse composto para células tumorais ou normais (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003). Os limonoides foram testados em uma linhagem de fibroblasto pulmonar humano normal (MRC-5), apresentando CI_{50} entre 1,91 a 4,74 μ M (Tabela 6). Esses valores demonstram que os compostos avaliados são mais seletivos para células tumorais.

O câncer colorretal é um dos mais frequentes tipos de câncer diagnosticado e também possui alta mortalidade em todo o mundo. Nos países desenvolvidos apresenta-se como a terceira maior causa de morte por câncer, sendo considerado um problema de saúde pública (DIAZ et al., 2012; ZHANG, et al., 2014). Segundo o INCA, o câncer colorretal está entre o mais incidentes na população brasileira, para ambos os sexos, sendo previstos aproximadamente 33 mil

casos novos para o ano de 2014/2015, perdendo apenas para o tipo melanoma (182 mil), próstata (69 mil) e mama (57 mil). Na Região Norte, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer colorretal é o quarto tipo de câncer mais frequente (INCA, 2014).

Diante disso, para avaliação do mecanismo de ação, foi selecionado o composto L3 e a linhagem de câncer colorretal HCT-116, o qual apresentou nesta linhagem CI_{50} aproximadamente 14 vezes menor em comparação com a CI_{50} em células normais. Também foi utilizada a linhagem de câncer colorretal HT-29 como modelo celular para comparação do mecanismo de ação do composto, haja vista que esta linhagem tem o gene *TP53* mutado, diferentemente da linhagem HCT-116, a qual possui *TP53* selvagem. O estudo de citotoxicidade mostrou que HT-29 é menos sensível ao composto L3, pois apresentou CI_{50} 26 vezes maior do que em HCT-116, o que sugere que o mecanismo de ação de L3 envolve vias de sinalização desse gene.

Em geral, o ensaio para avaliação da capacidade hemolítica in vitro é utilizado como método de triagem para dano de membrana sendo estimado o dano eritrocitário que poderá ocorrer in vivo (APARICIO et al., 2005). No ensaio de hemólise, os resultados demonstraram que o SM-EE e os limonóides não causaram dano na membrana das hemácias, sugerindo que a citotoxicidade desses compostos não está relacionada com danos inespecíficos à membrana plasmática (Tabela 6).

O descontrole na proliferação celular é uma característica universal para todas as células tumorais. A investigação do mecanismo de controle do crescimento celular contribui para a compreensão do processo de carcinogênese e para a identificação de compostos com uma possível ação antitumoral específica. É fundamental identificar compostos que reduzam a taxa de proliferação celular, para posteriormente investigar o mecanismo de ação de drogas antitumorais (JAIN; JAIN, 2011).

Dentre os ensaios para avaliar mecanismos de ação de drogas está o ensaio clonogênico, o qual é amplamente utilizado para examinar efeitos de drogas com potencial antitumoral. Este ensaio determina a capacidade de uma célula sobreviver e se proliferar indefinidamente, mantendo assim, a capacidade reprodutiva para formar uma grande colônia (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio (Figura 5), o limonoide L3 reduziu o número de colônias ($p < 0,05$) a partir da concentração $0,1 \mu\text{M}$ quando comparado ao

controle negativo na HCT-116, sendo que na maior concentração não havia nenhuma colônia. Na linhagem HT-29, essa redução somente ocorreu a partir da concentração 0,5 μ M. Pode-se afirmar que o limonoide L3 diminui a capacidade das células tumorais formarem colônias, no entanto a linhagem HCT-116 é mais sensível a ação de L3 quando comparada a HT-29.

Modelos celulares são amplamente utilizados para avaliar o efeito citotóxico de um determinado composto, traduzido, inicialmente, pela sua capacidade de induzir morte celular (GRZANKA et al., 2003; STEFANSKA et al., 2005; JIMENEZ et al., 2008). Apoptose ou morte celular programada se caracteriza por um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA internucleossomal e alterações na superfície celular que possibilitam o reconhecimento rápido e englobamento de células apoptóticas por células fagocitárias, evitando, assim, a indução de reação inflamatória (SCHULTZ; HARRINGTON, 2003).

Baseado nisso, foi realizada a investigação do tipo de morte que o limonoide L3 causou nas células da linhagem HCT-116 e HT-29, através da coloração diferencial de brometo de etídeo e laranja de acridina. Observou-se que a maioria das células sofreu morte por apoptose, após 72h de tratamento de maneira dose-dependente. Na linhagem HCT-116 esse efeito foi mais expressivo, exceto na maior concentração testada (5 μ M), onde não houve diferença entre as linhagens. Também foi possível observar mudanças morfológicas características de apoptose, como redução do volume celular, formação de *blebbings* (alterações na membrana plasmática) e fragmentação nuclear.

Para crescer e se multiplicar, a célula deve seguir uma sucessão de eventos ordenados, até resultar em duas células-filha idênticas e perfeitas, o que caracteriza o ciclo celular. Este ciclo é dividido nas fases G1, S, G2 e M, além da fase G0, quando as células não estão em processo de divisão. A duplicação do material genético ocorre na fase S, onde todo o DNA é duplicado, sem exceções e sem erro, e na fase M ocorre a divisão do material duplicado para as duas células filhas (ZHOU; ELLEDGE, 2000).

Essas fases são intercaladas pelas fases G1 e G2, onde o sistema de controle do ciclo verifica se as condições ainda são favoráveis à divisão. Caso haja alguma condição desfavorável, o ciclo pode ser paralisado em alguns dos pontos de checagem, que se encontram no limiar entre G1 e S e entre G2 e M, para

reavaliação das condições extra e intracelulares, reparo de DNA, ou ainda decidir se mantem ou eliminar a célula (ALBERTS et al., 2010).

A atividade sobre o ciclo celular das células HCT-116 e HT-29 foi avaliada frente o tratamento com L3 por 48 e 72h. Observou-se bloqueio do ciclo celular na fase G2/M nas duas linhagens, nos dois tempos avaliado, porém, foi observada maior porcentagem de células em G2/M na linhagem HCT-116, quando comparada a HT-29. Bignon e colaboradores (2009) demonstraram que 6,6-dimethyl-5,6-dihydropyran-2-one (IDDP), um produto intermediário na formação do limonoide haperforina B1, o qual foi isolado da planta *Harrisonia perforata* (Simaroubaceae), induziu parada do ciclo celular na fase G2/M de maneira dose-dependente em várias linhagens tumorais, independente do status de *TP53*. Esse resultado sugere que outras vias de controle do ciclo celular podem estar sendo ativadas, haja vista que HT-29 possui o gene *TP53* mutado.

O ciclo celular é um processo altamente coordenado, onde a progressão pelas fases é regulada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2 e M (MALUMBRES, BARBACID, 2009). O mau funcionamento nessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem o aparecimento de diversas patologias, como o câncer (OGINO et al., 2005; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Danos no DNA são alterações químicas na dupla-hélice que desafiam constantemente a estabilidade genômica, já que podem comprometer o metabolismo do DNA (replicação e transcrição) e serem transformados em mutações ou aberrações cromossômicas. Assim, desempenham importante papel nos processos biológicos de carcinogênese e envelhecimento em humanos (SHEN, 2011; MENCK, MUNFORD, 2014).

Para evitar entrar em fase S ou em mitose com danos no DNA, as células ativam vias de resposta a esse dano que promovem parada no ciclo celular, o qual resulta em mais tempo para que as enzimas de reparo do DNA realizem o reparo do genoma antes da síntese completa ou da segregação cromossômica (HARRISON, HABER, 2006). Trabalhos mostram que membros da superfamília de proteínas PI3K (fosfatidilinositol 3-cinases) são rapidamente ativados em resposta a danos no DNA, incluindo as proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada) e ATR (ataxia telangiectasia Rad3 *related*) (BAO et al., 2001; GOLDSTAIN, KASTAN, 2015).

Na avaliação da genotoxicidade foi observado que L3 causa quebra da fita de DNA nas duas linhagens de câncer colorretal, no entanto, o índice de dano é estatisticamente maior na HCT-116. Diante disso, através da técnica de PCR em tempo real, também foi avaliada a expressão dos genes *ATM* e *CHK-2*, nas linhagens em estudo frente ao tratamento com L3. Foi observado aumento na expressão desses genes de maneira dose dependente nas duas linhagens, no entanto, a expressão foi significativamente maior na HCT-116 em todas as concentrações testadas, de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio do cometa.

Tanto ATM quanto ATR podem ser ativadas em resposta a danos no DNA, porém ATM responde principalmente a quebras duplas na molécula de DNA, enquanto que ATR responde a danos de fita simples (GOLDSTAIN, KASTAN, 2015). Uma vez ativada, a proteína ATM fosforila vários substratos, entre eles estão Chk-1 (*checkpoint kinase 1*), Brca-1 (*Breast cancer 1, early onset*) e p53, os quais estão envolvidos nos *checkpoints* do ciclo celular. Fosforilação dependente de ATM estabiliza p53, que por sua vez fosforila p21 e induz para de ciclo em G1, enquanto que Chk-2 e Brca1 parecem estar envolvidas com checkpoints em S e G2/M (GOLDSTAIN, KASTAN, 2015). Logo, pode-se concluir que o bloqueio do ciclo celular em G2/M nas linhagens tratadas com L3 deve estar ocorrendo devido a danos no DNA, os quais podem desencadear a via dos genes *ATM*, *CHK-2* e *TP53* (ELIAS et al., 2014).

A proteína p53 funciona como um ponto chave direcionando a resposta celular a diferentes níveis de estresse em direção a apoptose, parada do ciclo celular, reparo do DNA ou autofagia (KRUSE, GU, 2009). Em células normais, os níveis de p53 são baixos, mas sob estresse ou dano no DNA, a proteína é estabilizada e se torna ativa. A parada do ciclo celular assim como a ativação de apoptose dependente de p53 parece contribuir para a inibição do desenvolvimento do câncer em vários estágios durante a tumorigênese (LOWE, LIN, 2000; ELIAS et al., 2014). A análise da expressão do gene *TP53* revelou que o tratamento com L3 induz aumento de sua expressão nas duas linhagens testada de maneira dose-dependente, o que sugere que os danos causados no DNA dessas linhagens por L3 estão desencadeando a transcrição desse gene.

Goh e colaboradores (2014) demonstraram que a fração etil acetato (SMEAF) do extrato isolado de sementes de *Swietenia macrophylla* inibiu a

proliferação de células da linhagem HCT-116 (carcinoma colorretal) de maneira dose-dependente e causou morte por apoptose pela via dependente de p53. A indução de apoptose causada SMEAF foi associada com aumento intracelular de espécies reativas do oxigênio, aumento da expressão da proteína p53, assim como na diminuição de MDM2, regulador negativo de p53. Além disso, também houve aumento na taxa de Bax/Bcl-2, seguido de ativação das caspases 3, 7 e 9 (GOH et al., 2014).

A proteína ARF, assim como p53, também participa do módulo de sinalização em cânceres. Essa proteína é induzida em resposta a ativação de oncogenes (*Ras*, *c-myc*, *E1A*) e limita a progressão do ciclo celular mediante a sinais hiperproliferativos (BALABURSK et al., 2010). ARF também é conhecida por ativar p53 através da neutralização da ubiquitina que controla os níveis de p53, Mdm2 (*mouse double minute 2*). ARF superexpresso interage diretamente com Mdm2 bloqueando assim a ubiquitinação, exportação nuclear e degradação de p53 nos proteassomas (OZENNE et al., 2010). Nas duas linhagens tratadas com L3 foi observado aumento da expressão de ARF de maneira dose-dependente, o que também pode estar implicado na ativação de *TP53*.

O controle do ciclo celular é realizado principalmente por proteínas chamadas ciclinas, uma família de proteínas que regulam a função de CDKs (cinases dependentes de ciclinas). Para assegurar que o ciclo, flua unidirecionalmente, as ciclinas são sintetizadas e degradadas ao decorrer do processo. A regulação da função das CDKs é dada principalmente pelo acoplamento das ciclinas, pela ligação de proteínas inibidoras, e pela fosforilação/desfosforilação da subunidade quinase, sendo, geralmente, a fosforilação um mecanismo inibitório e a desfosforilação, ativador (ALBERTS et al., 2010).

Algumas proteínas são capazes de se ligarem ao complexo ciclina-CDK, inibindo a ação dessas, essas proteínas são conhecidas como Proteínas inibidoras de CDK (CKI). Em mamíferos, há duas classes de CKIs, distinguíveis pelo alvo: a família Cip/Kip (p21, p27, p57) que pode inibir todas as CDKs; e as proteínas INK4 (p15, p16, p18, p19) que inibem somente CDK 4 e 6 (VERNEL et al., 2003). p53 ativa a transcrição de p21, a qual apresenta importante atividade supressora por antagonizar a atividade dos complexos formados com CDK-2 em S e G2 e com CDK-1 em G2/M, impedindo a fosforilação de Rb (LIU et al., 2003).

Neste trabalho, também foi avaliada a expressão de *p21* nas linhagens após tratamento com L3. Verificou-se que a expressão de *p21* aumentou de maneira dose dependente na linhagem HCT-116, ao passo que na HT-29 a expressão foi bastante diminuída, exceto na maior concentração testada, após 72h de tratamento. Logo, pode-se relacionar esses resultados com o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, o qual foi mais expressivo na linhagem HCT-116.

As mutações em p53 constituem o tipo de alteração genética mais frequente em câncer, sendo encontrada em mais de 50% de todos os tipos de tumores humanos (SOUSSI, WIMAN, 2007). Além da perda da atividade normal, alguns mutantes apresentam um efeito dominante negativo sobre a forma selvagem de p53 e apresentam efeito oncogênico de ganho de função (SOUSSI; HJORTSBER, 2008; SOLOMON et al., 2011). Dessa forma, pode-se concluir que outras vias de controle do ciclo celular e apoptose estejam sendo ativadas mediante ao tratamento com L3 na linhagem HT-29.

A apoptose é um processo ativo que pode ser deflagrado por um amplo espectro de estímulos, tanto intra como extracelulares. Nos mamíferos, a apoptose apresenta duas grandes vias: via do receptor de morte (extrínseca) e via mitocondrial (intrínseca) (YIN et al., 2003). A via mitocondrial é controlada pela família das proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*). As proteínas da família Bcl-2 apresentam uma importante função no controle da apoptose, que é regulada por multisítios de fosforilação envolvendo interações entre várias proteínas da família. Níveis elevados de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) e outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular por inibirem a ocorrência desse tipo de morte celular (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Outro evento fundamental da apoptose é a ativação de enzimas denominadas caspases. O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de ativação, onde as caspases se tornam ativas, e uma fase efetora, na qual as enzimas atuam provocando a morte celular (GRIVICICH et al., 2007; KUMAR et al., 2008). Dessa forma, as caspases são divididas em dois grupos básicos: iniciadoras (caspases 8 e 9) e efetoras (caspases 3 e 7, por exemplo). Depois que uma caspase iniciadora é ativada, o programa de morte enzimática é desencadeado pela ativação rápida e sequencial de outras caspases, resultando nos processos nucleares e citoplasmáticos que levam a morte celular por apoptose (MITCHEL, 2006).

Neste trabalho foi avaliada a expressão dos genes *BCL-2* (anti-apoptótico) e do gene das caspase-3 (efetora). A linhagem HCT-116 apresentou diminuição da expressão do gene *BCL-2*, ao passo que aumentou a expressão de caspase 3, de maneira dose-dependente, corroborando com os dados anteriores que mostravam que as células morriam por apoptose. Na linhagem HT-29, também houve diminuição de *BCL-2* e aumento de caspase 3, porém menos expressivo em comparação a HCT-116.

Trabalhos realizados com limonoides isolados de várias espécies de plantas da família Meliaceae demonstram a capacidade dessas moléculas induzirem morte celular por apoptose (BIGNON et al., 2009; HARISH KUMAR et al., 2010; CHINDABARA MURTHY et al., 2011a; CHINDABARA MURTHY et al., 2011b). O limonoide Limonina, isolado de *Citrus reticulata* (Rutaceae), causou morte por apoptose pela via intrínseca em linhagens de células de adenocarcinoma colorretal (SW480), haja vista que ativou caspase-3, diminuiu a taxa de Bcl-2/Bax e induziu a liberação de citocromo c no citoplasma dessas células (CHIDAMBARA MURTHY et al., 2011a).

Outro trabalho também mostra um limonoide isolado de *Citrus paradisi* (Rutaceae), Obacunona, o qual causou morte celular por apoptose em linhagem de células de adenocarcinoma colorretal (SW480). Obacunona causou danos no DNA, diminuição da taxa de Bcl-2/Bax, induziu ativação de caspase-3 e liberação de citocromo c no citoplasma dessas células. Além disso, também induziu ativação de p21, com conseqüente parada do ciclo celular nas fases G2/M (CHIDAMBARA MURTHY et al., 2011b).

Diante disso, pode-se sugerir que L3 causa danos no DNA das linhagens HCT-116 e HT-29, ativando a proteína ATM que por sua vez ativa Chk-2, fosforilando p53. p53 por sua vez ativa transcrição de p21, bloqueando o ciclo celular, ao mesmo tempo que desencadeia sinais para que a célula morra por apoptose. Na linhagem HCT-116, o gene *TP53* é selvagem, logo sua proteína será funcional, ativando a transcrição de *p21*, o que acarretará parada do ciclo celular, assim como, ativação da apoptose, devido ao aumento da expressão de caspase 3, ao mesmo tempo que diminui a expressão de *BCL-2*, gene anti-apoptótico.

Já na linhagem HT-29, o gene *TP53* está mutado, logo sua proteína não está funcionando de forma adequada, o que leva a diminuição da expressão de *p21* e respostas de controle do ciclo menos eficazes, em comparação com HCT-116.

No entanto, outras vias de sinalização podem estar sendo ativadas, desencadeando a apoptose. Como no trabalho de Du e colaboradores (2015), onde um diterpenoide chamado Ponicidina, extratido da planta *Isodon adenolomus*, causou parada do ciclo celular em G1/S e morte celular por apoptose através da ativação da via de p38, com ativação subsequente dos genes de caspase 3 e BAX, culminando em morte celular por apoptose.

A avaliação de toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anátomo-patológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança – juntamente com outros dados de toxicidade – para a saúde humana (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009).

O extrato etanólico de folhas de *S. macrophylla* não causou a morte de animais, tampouco alterações clínicas, durante o período de observação, nos camundongos tratados 1000 mg/kg. Esses dados caracterizam o extrato como de baixa toxicidade aguda, pois esta é observada quando ocorrem efeitos adversos após a administração oral de uma simples dose, em curta duração (OECD, 2001).

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). Também se manifestam através da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (MELO, 2001). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ, SILVA, 2003). O SM-EE não produziu alteração significativa nos parâmetros fisiológicos e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e urinalise) entre os grupos tratados.

O teste de micronúcleo em células da medula óssea 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). Esse ensaio, quando realizado corretamente, detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos – quanto aneugenicidade – aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (KRISHNA, HAYASHI, 2000; CHOY, 2001). O aparecimento de micronúcleos nas células analisadas é uma consequência de

quebra cromossômica, evidenciando claramente a manifestação de distúrbios do processo mitótico (RIBEIRO, 2003). 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).

No presente estudo, o extrato etanólico de folhas de *S. macrophylla* não apresentou atividade mutagênica sobre as células da linhagem eritroblástica da medula óssea de camundongos, visto que não foi observado aumento significativo na frequência de micronúcleos, quando comparado ao controle negativo. Concluiu-se ainda, que o extrato não possui atividade citotóxica em células normais da medula óssea.

Esses testes permitem sugerir que esse extrato possa ser utilizado em testes de eficácia para que no futuro possa ser desenvolvido um fitoterápico para tratamento de câncer colorretal.

6 CONCLUSÃO

- O extrato etanólico e os limonoides isolados de folhas de *S. macrophylla* se mostraram citotóxicos frente a linhagens celulares tumorais. O extrato apresentou citotoxicidade em linhagens de câncer colorretal e os limonoides em células de câncer colorretal e melanoma.
- O extrato etanólico e os limonoides isolados de folhas de *S. macrophylla* não causaram danos diretos à membrana plasmática de heritrócitos de camundongos.
- O limonoide L3 foi o que apresentou melhor potencial citotóxico em células HCT-116, já que este apresentou CI_{50} 14 vezes menor quando comparado aos valores em células normais. Células da linhagem HT-29 foram utilizadas nesse trabalho para comparação de possíveis mecanismos de ação do composto, envolvendo a via do gene *TP53*.
- L3 causou danos no DNA, diminui a capacidade proliferativa da célula tumoral, morte por apoptose e bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Sendo que todos esses eventos são significativamente mais expressivos em HCT-116 em comparação com HT-29.
- L3 causou aumento na expressão dos genes *ATM*, *CHK-2*, *TP53*, *ARF* e *p21*, com consequente para do ciclo celular em G2/M, assim como aumento da expressão de caspase-3 e diminuição da expressão de *BCL-2*, resultando em morte celular por apoptose na linhagem HCT-116.
- Na linhagem HT-29, houve aumento na expressão dos genes *ATM*, *CHK-2*, *TP53* e *ARF*, porém em quantidade menor do que ocorre em HCT-116. Além disso, foi observado diminuição expressiva de *p21*. Essa linhagem também apresentou aumento de caspase 3 e diminuição de *BCL-2*, porém em níveis menores do que em HCT-116.
- O extrato etanólico de *S. macrophylla* não causou toxicidade e nem mutagenicidade.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF. 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

ALONSO-CASTRO, A.J.; VILLARREAL, M.L.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **J Ethnopharmacol**, v.113, n.3, p.945-72. 2011.

ALONSO-CASTRO, A. J.; ORTIZ-SÁNCHEZ, E.; DOMÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-TOLEDO, G.; CHÁVEZ, M.; ORTIZ-TELLO A. J.; GARCÍA-CARRANCA, A. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 2, p. 438-42. 2012.

American Type Culture Collection - ATCC: The global bioresource center. <Disponível em: <http://www.atcc.org/en.aspx>> Acesso em: 05 de out. de 2015.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2-3, p.261-74. 2003.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. **Mutat Res**, v. 307, n. 1, p. 261-71. 1994.

APARICIO, R. M.; JOSÉ GARCÍA-CELMA, M.; PILAR VINARDELL, M.; MITJANS, M. In vitro studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 39, n. 5, p. 1063-7. 2005.

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.

BABYKUTTY, S.; KUMAR, M. A.; NAIR, M. S.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Nimbolide retards tumor cell migration, invasion, and angiogenesis by downregulating MMP-2/9 expression via inhibiting ERK1/2 and reducing DNA-binding activity of NF- κ B in colon cancer cells. **Mol Carcinog**, v. 51, n. 6, p. 475-90. 2012.

BALABURSKI, G. M.; HONTZ, R. D.; MURPHY, M. E. p53 and ARF: unexpected players in autophagy. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 6, p. 363-9. 2010.

BAO, S.; TIBBETTS, R. S.; BRUMBAUGH, K. M.; FANG, Y.; RICHARDSON, D. A.; ALI, A.; CHEN, S. M.; ABRAHAM, R. T.; WANG, X. F. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 969-74. 2001.

BASKIĆ, D.; POPOVIĆ, S.; RISTIĆ, P.; ARSENIJEVIĆ, N. N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 11, p. 924-32. 2006.

BALMAÑA, J.; BALAGUER, F.; CERVANTES, A.; ARNOLD, D.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP () Familial risk-colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines. **Ann Oncol**, v. 6, p. 73-80. 2013.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci**, v. 78, n. 5, p. 431-41. 2005.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, n. 2, p. 474-82. 1993.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species. **Z Naturforsch C**, v. 60, n. 7-8, p. 539-43. 2005.

BIGNON, J.; BÉNÉCHIE, M.; HERLEM, D.; LIU, J. M.; PINAULT, A.; KHUONG-HUU, F.; WDZIECZAK-BAKALA, J. A novel iodomethylene-dimethyl-dihydropyranone induces G2/M arrest and apoptosis in human cancer cells. **Anticancer Res**, v. 29, n. 6, p. 1963-9. 2009.

BORST, P. Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? **Open Biol**, v.2, p.1-9. 2012.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1490-502. 2014.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMS, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y, F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the vivo comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, p. 31-35, 2007.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22. 2009.

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; SILVA, A. A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P.; STÁBELI, R. G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **J Braz Chem Soc**, v. 20, n. 6, p. 1011-1023. 2009.

CAPONIGRO, G.; SELLERS, W. R. Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. **Nat Rev Drug Discov**. v.10, n.3, p.179-87. 2011.

CERVEIRA, N.; BIZARRO, S.; TEIXEIRA, M. R. Cancer Cell Cycle. **Canal BQ**, n. 9, 2012.

CHAMPAGNE DE, K. O; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, v. 31, p. 377-394. 1992.

CHEN, J. J.; HUAN, S. S.; LIAO, C. H.; WEI, D. C.; SUNG, P. J.; WANG, T. C.; CHENG, M. J. A new phragmalin-type limonoid and anti-inflammatory constituents from the fruits of *Swietenia macrophylla*. **Food Chem**, v. 120, n. 2, p. 379-384. 2009.

CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; KUMAR, V.; RATHORE, K. S.; PATIL, B. S. Citrus limonin and its glucoside inhibit colon adenocarcinoma cell proliferation through apoptosis. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 6, p. 2314-23. 2011a.

CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 7, p. 1616-25. 2011b.

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.

CONFORTI, F.; IOELE, G.; STATTI, G. A.; MARRELLI, M.; RAGNO, G.; MENICHINI F. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 10, p.3325-32. 2008.

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. **Rev Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58. 2010.

CRAGG, G .M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n 1-2, p. 72-9. 2005.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chem Rev**, v.109, p.3012–3043. 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95. 2013.

DA SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S.; CASTRO, K. C.; DA SILVA, M. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Limonoids of the phragmalin type from *Swietenia macrophylla* and their chemotaxonomic significance. **J Nat Prod**, v. 71, n. 12, p. 1983-7. 2008.

DAS, A.; SUNILSON, J. A. J.; GOPINATH, R.; RADHAMANI, S.; NILUGAL, K. Antinociceptive Activity of the Fruits of *Swietenia macrophylla* King. **J Pharm Res**, v. 2, n. 9, p. 1367-1369. 2009.

DEWANJEE, S.; KUNDU, M.; MAITI, A.; MAJUMDAR, R.; MAJUMDAR, A.; MANDEL, S. C. *In Vitro* Evaluation of Antimicrobial Activity of Crude Extract from Plants *Diospyros peregrina*, *Coccinia grandis* and *Swietenia macrophylla*. **Trop J Pharma Res**, v. 6, n. 3, p. 773-778. 2007.

DEWANJEE, S.; MAITI, A.; DAS, A. K.; MANDAL, S. C.; DEY, S. P. Swietenine: A potential oral hypoglycemic from *Swietenia macrophylla* seed. **Fitoterapia**, v. 80, n. 4, p. 249-251. 2009.

DIAZ, L. A. JR.; WILLIAMS, R. T.; WU, J.; KINDE, I.; HECHT, J.R.; BERLIN, J.; ALLEN, B.; BOZIC, I.; REITER, J. G.; NOWAK, M. A.; KINZLER, K. W.; OLINER, K. S.; VOGELSTEIN, B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 537-40. 2012.

DU, J.; CHEN, C.; SUN, Y.; ZHENG, L.; WANG, W. Ponacidin suppresses HT29 cell growth via the induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 4, p. 5816-20. 2015.

EL-READI, M. Z.; HAMDAN, D.; FARRAG, N.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. **Eur J Pharmacol**, v. 626, n. 2-3, p. 139-45. 2010.

EISNER, T. Chemical prospecting: A proposal for action. In: **Ecology Economics and Ethics: The Broken Circle**, p. 196-202. Bormann, F. H.; Kellert, S. R. (eds), Yale University Press: New Haven, 1992.

EL ZALABANI SM, EL-ASKARY HI, MOUSA OM, ISSA MY, ZAITOUN AA, ABDEL-SATTAR E. Acaricidal activity of *Swietenia mahogani* and *Swietenia macrophylla* ethanolic extracts against *Varroa destructor* in honeybee colonies. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 2, p. 166-70. 2012.

ELIAŠ, J.; DIMITRIO, L.; CLAIRAMBAULT, J.; NATALINI, R. The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844. 2014.

ENDRIGA, M. A.; MOJICA, E. R. C.; MERCA, F. E.; LACSAMANA, M. S.; DEOCARIS, C. C. Evaluation of some lectins as anti-protozoal agents. **J Med Sci**, v. 5, n. 1, p. 31-34. 2005.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat Res**, v. 566, n. 3, p. 209-29. 2004.

FIGUEROA, C.J.C. An assessment of the distribution and status of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). **Puerto Rico Conservation Foundation and International Institute of Tropical Forestry**. 25 p. 5. 1994.

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

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9. 2006.

GOH, B. H.; ABDUL KADIR, H. In vitro cytotoxic potential of *Swietenia macrophylla* King seeds against human carcinoma cell lines. **J Med Plant Res**, v. 5, n. 8, p. 1395–1404. 2011.

GOLDSTEIN, M.; KASTAN, M. B. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. **Annu Rev Med**, v. 66, p. 129-43. 2015.

GONZALES, G. F.; VALERIO, L. G. JR. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 6, n. 5, p. 429-44. 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p.179-198. 2003.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje** 6: 44-50. 1990.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ZANONI, C.; CORREA, L. P.; JOTZ, G. P.; HENRIQUES, J. A.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA, A. B. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. **Int J Colorectal Dis**, v. 22, n. 10, p. 1201-8. 2007.

GROGAN, J.; BARRETO, P.; VERÍSSIMO, A. Mogno na Amazônia Brasileira: ecologia e Perspectiva de Manejo. **Belém: Imazon**, v. 40. 2002.

GRZANKA, A.; GRZANKA, D.; ORLIKOWSKA, M. Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 8, p. 1611-7. 2003.

GUEVARA, A. P.; APILADO, A.; SAKURAI, H.; KOZUKA, M.; TOKUDA, H. Anti-inflammatory, Antimutagenicity and Antitumor-promoting Activities of Mahogany Seeds, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae). **PJS**, v.125, n.4. 1996.

GUPTA, S. C.; REUTER, S.; PHROMNOI, K.; PARK, B.; HEMA, P. S.; NAIR, M.; AGGARWAL, B. B. Nimbolide sensitizes human colon cancer cells to TRAIL through reactive oxygen species- and ERK-dependent up-regulation of death receptors, p53, and Bax. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1134-46. 2011a.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; REUTER, S.; KANNAPPAN, R.; YADAV, V. R.; RAVINDRAN, J.; HEMA, P. S.; CHATURVEDI, M. M.; NAIR, M.; AGGARWAL, B. B. Modification of cysteine 179 of I κ B α kinase by nimbolide leads to down-regulation of NF- κ B-regulated cell survival and proliferative proteins and sensitization of tumor cells to chemotherapeutic agents. **J Biol Chem**, v. 285, n. 46, p. 35406-17. 2010b.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n.5, p. 646-674. 2011.

HARRISON, J. C.; HABER, J. E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. **Annu Rev Genet**, v. 40, p. 209-35. 2006.

HARISH KUMAR, G.; CHANDRA MOHAN, K. V.; JAGANNADHA RAO, A.; NAGINI, S. Nimbolide, a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. **Invest New Drugs**, v. 27, p. 246–252. 2009.

HARTWELL, J. L. **Plants Used Against Cancer: A Survey**. Quarterman: Lawrence, MA, 1982.

HOSTETTMANN, K. History of a plant: the example of Echinacea. **Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd**, v. 1, p. 9-12. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**, p. 25. 2014.

JAIN, R.; JAIN, S. K. Screening of in vitro cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S147-S150. 2011.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J for Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90. 2011.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; TAKEARA, R.; LOTUFO, T. M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 151, n. 3, p. 391-8. 2008.

JOHNSON, T. **CRC Ethnobotany Desk Reference**; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999.

KIKUSHI, T.; ISHII, K.; NOTO, T.; TAKAHASHI, A.; TABATA, K.; SUZUKI, T.; AKIHISA, T. Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of Limonoids from the Seeds of *Azadirachta indica* (Neem). **J Nat Prod**, v. 74, p. 866–870. 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; VANDE LOOCK, K.; DECORDIER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 8, p. 873-99. 2011.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166. 2000.

KRISNAWATI, H.; KALLIO, M. H.; KANNINEN, M. *Swietenia macrophylla* King: Ecology, silviculture and productivity. CIFOR, Bogor, Indonesia. 2011.

KRUSE, J. P.; GU, W. Modes of p53 regulation. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 609-22. 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas da doença**. 7ed. Amsterdam: Elsevier. 2004.

KUMAR, A.; D'SOUZA, S. S.; GAONKAR, S. L.; RAI, K. M.; SALIMATH, B. P. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by a new series of substituted-1,3,4-oxadiazole derivatives. **Invest New Drugs**, v. 26, n. 5, p. 425-35. 2008.

LASSANCE, F.A.C; LASSANCE, P.M.S.; GARICOCHEA, B.; COTTI, G.C.C.; CUTAIT, R. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Rev Med Saude Brasilia**. v.1, n.1, p.34-50. 2012.

LESLIE, A.; STEELE, R.J. Management of colorectal cancer. **Postgrad Med J**. v.78, n.922, p.473-8. 2002.

LIU, J. D.; WANG, Y. J.; CHEN, C. H.; YU, C. F.; CHEN, L. C.; LIN, J. K.; LIANG, Y. C.; LIN, S. Y.; HO, Y. S. Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells. **Mol Carcinog**, v. 37, n. 1, p. 39-50. 2003.

LIU, Z. L.; LIU, Q. Z.; DU, S. S.; DENG, Z. W. Mosquito larvicidal activity of alkaloids and limonoids derived from *Evodia rutaecarpa* unripe fruits against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 111, n. 3, p. 991-6. 2012.

LOURO, I. D.; LLERENA, J. R.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FRÓES, N. **Genética molecular do câncer**. 1. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485-95. 2000.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 153-85. 1995.

MAITI, A.; DEWANJEE, S.; MANDAL, S. C. In Vivo Evaluation of Antidiarrhoeal Activity of the Seed of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). **Trop J Pharma Res**, v. 6, n. 2, p. 711-716. 2007.

MAITI, A.; DEWANJEE, S.; SAHU, R. Isolation of Hypoglycemic Phytoconstituent from *Swietenia macrophylla* Seeds. **Phytother Res**, v. 23, n. 12, p. 1731-3. 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-66. 2009.

MANS, D.R.; DA 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.185–198. 2000.

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. 1515-1531. 2006.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.;NAGAMINE, M.K.; DA SILVA, T.C.; SAKAI, M.; DE SOUZA MONTEIRO FONSECA, E.; PALERMONETO, J.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Lett**, v. 238, n. 1, p.85-9. 2006.

MAXIMOV, G.; MAXIMOV, K. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.22, p. 664-668. 2008.

MENCK, C. F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genet Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 220-33. 2014.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; JORDAN, J. J.; RESNICK, M. A. Changing the p53 master regulatory network: elementary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, v. 25, n. 15, p.2191-201. 2007.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M. A. The expanding universe of p53 targets. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 10, p. 724-37. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

MITCHEL, R. E. Radiation risk prediction and genetics: the influence of the TP53 gene in vivo. **Dose Response**, v. 3, n. 4, p. 519-32. 2006.

MOERMAN, D. E. **Medicinal Plants of Native America**. Museum of Anthropology, University of Michigan: Ann Arbor, MI, 1986.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, R.; CHEN, Z.; BOLCATO, J.; CAPARROTTA, L.; FROLDI, G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 3, p. 747-53. 2012.

MOOTOO, B. S.; ALI, A.; MOTILAL, R.; PINGAL, R.; RAMLAL, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Limonoids from *Swietenia macrophylla* and *S. aubrevilleana*. **J Nat Prod**, v. 62, n. 11, p. 1514-1517. 1999.

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

MOUSINHO, K.C.; OLIVEIRA, C. de C.; FERREIRA, J.R.; CARVALHO, A.A.; MAGALHÃES, H.I.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.; COSTA-LOTUFO, L.V. PESSOA, C.; DE MATOS, M.P.; RAMOS, M.V.; MORAES, M.O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel - Apocynaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 421-6. 2011.

MUNÕZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; ROJAS, I.; VARGAS, L.; TAE, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene indians. **J Ethnopharmacol**, v. 69, p. 139-155. 2000.

MUNÕZ, B. Lessons for 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Rev Drug Discov**, v.8, p.959–968. 2009.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21-8, 2005.

MURNIGSIH, T.; SUBEKI.; MATSUURA, H.; TAKAHASHI, K.; YAMASAKI, M.; YAMATO, O.; MAAEDE Y, KATAKURA K, SUZUKI M, KOBAYASHI S, CHAIRUL, YOSHIHARA T. Evaluation of the inhibitory activities of the extracts of Indonesian traditional medicinal plants against *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*. **J Vet Med Sci**, v. 67, n. 8, p. 829-831. 2005.

NAGALAKSHMI, M. A.; THANGADURAI, D.; RAO, D. M.; PULLAIAH, T. Phytochemical and antimicrobial study of *Chukrasia tabularis* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 62-4. 2001.

NAGAMINE, M.K.; DA SILVA, T.C.; MATSUZAKI, P.; PINELLO, K.C.; COGLIATI, B.; PIZZO, C.R.; AKISUE, G.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; SINHORINI, I.L.; RAO K.V.; BARBUTO, J.A.; DAGLI, M.L. Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. **Exp Toxicol Pathol**, v. 61, n. 1, p. 75-82. 2009.

NAGOOR, N. H.; SHAH JEHAN MUTTIAH, N.; LIM, C. S.; IN, L.L.; MOHAMAD, K.; AWANG K. Regulation of Apoptotic Effects by Erythrocarpine E, a Cytotoxic Limonoid from *Chisocheton erythrocarpus* in HSC-4 Human Oral Cancer Cells. **Plos One**, v. 6, n. 8. 2011.

NAKATANI M, ABDELGALEIL SA, SAAD MM, HUANG RC, DOE M, IWAGAWA T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 20, p. 2833-41. 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**. v.66, n.7, p.1022-37. 2003.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** 75, 311–335. 2012.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos**. In: Simões et al. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p.11-24. 1999.

OGINO, A.; YOSHINO, A.; KATAYAMA, Y.; WATANABE, T.; OTA, T.; KOMINE, C.; YOKOYAMA, T.; FUKUSHIMA, T. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 64, n. 5, p. 398-403. 2005.

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, p. 79-92, 1989.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do “Ginseng Brasileiro” *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **An Farm Quím S Paulo**, v.20, n.1-2. p.261–277. 1980.

OLIVEIRA, A.A.; MORI, S.A. A central Amazonian terra firme forest. I. High tree species richness on poor soils. **Biodiversity and Conservation**, v.8, p.1219-1244. 1999.

OZENNE, P.; EYMIN, B.; BRAMBILLA, E.; GAZZERI, S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. **Int J Cancer**, v. 127, n. 10, p. 2239-47. 2010.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother Res**, v. 14, n. 3, p. 187-91. 2000.

PETITJEAN, A.; MATHE, E.; KATO, S.; ISHIOKA, C.; TAVTIGIAN, S. V.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat**, v. 28, n. 6, p. 622-9. 2007.

POWELL, S.M. Clinical applications of molecular genetics in colorectal cancer. **Sem Colon Rectal Surg**. v.6, p.2-18. 1995.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, A. O.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sci Pharm**, v. 70, p. 135-145. 2002.

REBOUÇAS, S. D. E. O.; GRIVICICH, I.; DOS SANTOS, M. S.; RODRIGUEZ, P.; GOMES, M. D.; DE OLIVEIRA, S. Q.; DA SILVA, J.; FERRAZ, A. D. E. B. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 926-9. 2011.

ROSA, D. D.; ISMAEL, G.; DAL LAGO, L.; AWADA, A. Molecular-targeted therapies: Lessons from years of clinical development. **Cancer Treat Rev**, v.34, p.61-80. 2008.

SAGAERT, X. Prognostic biomarkers in colorectal cancer: where do we stand?. **Virchows Arch**, v. 464, n. 3, p. 379-91. 2014.

SALGALLER, M.L.; LODGE, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J Surg Oncol**. v.68, n.2, p.122-38. 1998.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; CLARK, M.; ANGELES, F. M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M. J. Sangre de grado Croton palanostigma induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **J Ethnopharmacol**, v. 80, n. 2-3, p. 121-9. 2002.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8. 2008.

SCHULTZ, D. R.; HARRINGTON, W. J. JR. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Semin Arthritis Rheum**, v. 32, n. 6, p. 345-69. 2003.

SCHWARTZ, R.N.; BLANKE, C.D.; PESKO, L.J. Target therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. **J Manag Care Pharm**. v.10, n.5, p.2-13. 2004.

SHEN Z. Genomic instability and cancer: an introduction. **J Mol Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 1-3. 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:da planta ao medicamento**.

SOARES, B. M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do corante alimentar amarelo tartrazina em linfócitos humanos**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. **Câncer de Cólon: Tratamento Quimioterápico**. Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar – Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar. 2011.

SOLOMON, H.; MADAR, S.; ROTTER, V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. **J Pathol**, v. 225, n. 4, p. 475-8. 2011.

SOUSSI, T.; HJORTSBERG, L. When mutant p53 plays hide and seek: a new challenge for diagnosis and therapy? **Trends Mol Med**, v. 15, n. 1, p. 1-4. 2009.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. **Cancer Cell**, v. 12, n. 4, p. 303-12. 2007.

STEFAŃSKA, B.; BONTEMPS-GRACZ, M. M.; ANTONINI, I.; MARTELLI, S.; ARCIEMIUK, M.; PIWKOWSKA, A.; ROGACKA, D.; BOROWSKI, E. 2,7-Dihydro-3H-pyridazino[5,4,3-kl]acridin-3-one derivatives, novel type of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines. Synthesis and biological evaluation. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 6, p. 1969-75. 2005.

SWANTON, C.; NICKE, B.; MARANI, M.; KELLY, G.; DOWNWARD, J. Initiation of high frequency multi-drug resistance following kinase targeting by siRNAs. **Cell Cycle**, v.6, p.2001–2004. 2007.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nat Rev Drug Discov**, v.10, n.7, p.507-19. 2011.

TAN, S.; OSMAN, H.; WONG, K.; BOEY, P. New phragmalin-type limonoids from *Swietenia macrophylla* King. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1279–1285. 2009.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196. 2002.

TICE, R.R. AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206- 221, 2000.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. **Rev Eletr Farm**, v. 3, n. 2, p. 93-8. 2006.

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.

VALENCIA, R.; BALSLEV, H.; PAZ Y MINO, G.C. High tree alpha-diversity in Amazonian Ecuador. **Biodiversity and Conservation**, v.3, p.21-28. 1994.

VERÍSSIMO, A., P.; BARRETO, R.; TARIFA, C. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. **Forest Ecology and Management**, v. 72, p. 39-60. 1995.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif**, v. 36, n. 3, p. 165-75. 2003.

VOGELSTEIN, B.; FEARON, E.R.; HAMILTON, S.R.; KERN, S.E.; PREISINGER, A.C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A.M. BOS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med**. v.319, p.525–32. 1988.

WOLPIN, B.M.; MAYER, R.J. Systemic treatment of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v.134, n.5, p.1296-310. 2008.

WOLPIN, B.M.; MEYERHARDT, J.A.; MAMON, H.J.; MAYER, R.J. Adjuvant treatment of colorectal cancer. **CA Cancer J Clin**, v.57, n.3, p.168-85. 2007.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85. 2005.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med**, v. 53, n. 2, p. 65-8. 2006.

YIN, X. M.; DING, W. X. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. **Curr Mol Med**, v. 3, n. 6, p. 491-508. 2003.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C.; TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; PUCCI, L. L.; GARROTE, C. F. D.; OLIVEIRA, F. N. M.; PAULA, J. R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. **Latin Am J Pharm**, v. 28, n. 4, p. 485-9. 2009.

ZHANG, A.; SUN, H.; YAN, G.; WANG, P.; HAN, Y.; WANG, X. Metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 345, n. 1, p. 17-20. 2014

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433-9. 2000.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett**, v. 175, n. 1, p. 17-25. 2002.