

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAL E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES  
PURIFICADAS BIOATIVAS DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER DE BEXIGA E DE  
CISTITE HEMORRÁGICA**

**FABRÍCIA DIETRICH**

**Porto Alegre  
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROFESSOR TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAL E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES  
PURIFICADAS BIOATIVAS DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER DE BEXIGA E DE  
CISTITE HEMORRÁGICA**

**FABRÍCIA DIETRICH**

**Orientadora: DRA. ANA MARIA O. BATTASTINI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre.

**Porto Alegre**

**2012**

## CIP - Catalogação na Publicação

Dietrich, Fabrícia

Avaliação dos efeitos antitumoral e anti-inflamatório do extrato bruto e das frações purificadas bioativas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. em modelos experimentais de câncer de bexiga e de cistite hemorrágica / Fabrícia Dietrich. -- 2012. 158 f.

Orientadora: Ana Maria Oliveira Battastini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Cistite hemorrágica. 2. Câncer de bexiga. 3. Glicosídeos do ácido quinóico. 4. *Uncaria tomentosa*. I. Battastini, Ana Maria Oliveira, orient. II. Título.

*“Se desejarmos fortemente o melhor e...  
Principalmente, lutarmos pelo melhor...  
O melhor vai se instalar em nossa vida.  
Porque sou do tamanho daquilo que vejo.  
E não do tamanho da minha altura.”*

Carlos Drummond de Andrade

**À minha amada família:**

**Lírio, Soeli e Franciele.**

## AGRADECIMENTOS

À orientadora Ana, pela oportunidade de crescimento pessoal, científico e profissional. Pelos ensinamentos, pela competência, pela honestidade e pelo exemplo de profissional que és.

Ao professor Ortega e ao colega Samuel, pela competência e pela responsabilidade com que realizaram a obtenção do extrato e das frações purificadas de *Uncaria tomentosa*.

À professora Fernanda e à professora Martha, que desde o início incentivaram o desenvolvimento do projeto da cistite na PUCRS. Em especial ao colega Jerônimo, que nos últimos seis meses do ano de 2011 esteve presente todos os sábados e feriados no laboratório de farmacologia da PUCRS me auxiliando para fazer este projeto acontecer.

À Andressa e ao Rudi, pessoas muito queridas e especiais, que mesmo não trabalhando no mesmo laboratório sempre estiveram por perto me ensinando, me escutando, trocando ideias. Muito obrigada por toda a ajuda, pela torcida e pela amizade!

A duas criaturinhas adoráveis: Lila e Fabrício. Obrigada por sempre estarem dispostos a trocar uma ideia, a ajudar quando era necessário, pela amizade e pela companhia divertida nas festas da Dublin!

À Angélica, que mesmo longe durante o meu mestrado, sei que sempre esteve na torcida!

Aos demais colegas do lab. 22 que me proporcionaram dias alegres e agradáveis: Cris, Leti, Beli, Fer, Va, Fran, Elisa, Manu, Eliz e Rafa. Também aos amigos e colegas “espalhados” pelo Departamento, especialmente aos amigos do lab. 21, 23 e 24.

A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação em Bioquímica, em especial à Cléia pela sua competência e seriedade; à Dona Lia pelo excelente apoio técnico; aos guardas que sempre me “vigiavam” nas noites e madrugadas em que permanecia por horas e horas no lab. Ao CNPq e a UFRGS.

Às minhas queridas, bisavó Élide e vó Cladi, pela torcida constante e pelas orações diárias para que tudo ocorresse bem!

Aos meus amados pais, Soeli e Lírio, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e honestidade. Pelo incentivo e reconhecimento do valor do estudo. Pelo apoio e estímulo nestes dois anos de Mestrado. Amo muito vocês!

À minha querida irmã Franciele, pela ajuda, pelo incentivo, pela companhia e principalmente, por ser a responsável pelas deliciosas refeições. Sem você aqui em Porto Alegre, com certeza, viveria a base de pão e água, hahahahah!

Ao meu grande amor Fernando, pela paciência, pelo incentivo e por sempre ter colaborado com suas ideias inovadoras e criativas.

A Deus por sempre estar ao meu lado!

## RESUMO

A bexiga é um órgão constantemente exposto a compostos tóxicos provenientes do metabolismo, cuja exposição crônica pode levar a diversas patologias quando não tratada adequadamente. A cistite hemorrágica é uma condição inflamatória generalizada da bexiga caracterizada por eventos inflamatórios intensos e normalmente associada ao uso de fármacos antineoplásicos como a ciclofosfamida. Para a prevenção da ocorrência da cistite hemorrágica o fármaco 2-mercaptoetanosulfonato de sódio (Mesna) tem sido utilizado, apesar deste composto não ser eficiente em lesões já estabelecidas. Em relação ao câncer de bexiga, este é caracterizado como sendo a segunda neoplasia mais comum do trato genitourinário e o sétimo câncer mais prevalente entre homens no mundo. O tratamento varia conforme a natureza invasiva do tumor, sendo que para a prevenção da recorrência deste câncer, quimioterapia ou imunoterapia adjuvante têm sido utilizadas. Contudo, a administração intravesical de BCG é o tratamento mais efetivo do câncer de bexiga superficial, porém apresenta inúmeros efeitos colaterais, onde aproximadamente um terço dos pacientes progridem para um estágio superior. Tanto a cistite hemorrágica quanto o câncer de bexiga permanecem como desafios terapêuticos, uma vez que a eficácia dos tratamentos muitas vezes, é insuficiente. Na busca de novos tratamentos, pesquisas tentam encontrar compostos a partir de plantas medicinais com baixa toxicidade. Neste contexto, a *Uncaria tomentosa* merece destaque, uma vez que cascas e raízes da espécie são amplamente empregadas na medicina popular para inúmeras enfermidades, como doenças do trato urinário e câncer. Considerando estes dados, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato bruto hidroetanólico e das frações purificadas de alcalóides oxindólidos e de glicosídeos do ácido quinóvico da planta *Uncaria tomentosa* sobre a proliferação de células tumorais de bexiga e sobre um modelo de cistite hemorrágica em camundongos. Demonstramos no Capítulo 1 que a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóvico foi capaz de inibir o crescimento e a viabilidade celular das linhagens de câncer de bexiga humano T24 e RT4. Na linhagem T24, esta fração induziu significativamente a apoptose pela inibição da ciclooxigenase 2, sem causar parada no ciclo celular. Embora mais investigações sejam necessárias, hipotetizamos que esta inibição possa estar ocorrendo via inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. No Capítulo 2, demonstramos que esta mesma fração purificada foi capaz de promover uma redução significativa no edema e no peso das bexigas dos animais previamente tratados com este composto, demonstrando atividade equivalente à Mesna. Assim como para os experimentos *in vitro*, nos experimentos *in vivo*, supomos que a reversão dos danos induzidos pela ciclofosfamida, provavelmente esteja associada à capacidade desta fração em inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual poderia estar agindo de modo a prevenir os efeitos colaterais provocados pela ciclofosfamida. A partir dos resultados obtidos, fica evidente que esta investigação demonstra promissoras propriedades antitumoral e anti-inflamatória para a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóvico podendo, no futuro, se tornar um agente terapêutico potencial no tratamento destas patologias da bexiga.



## ABSTRACT

The bladder is an organ constantly exposed to toxic compounds from the metabolism, whose chronic exposure can lead to various diseases, if not appropriately treated. Hemorrhagic cystitis is an inflammatory condition of bladder characterized by intense inflammatory events associated with the use of anticancer drugs such as cyclophosphamide. To prevent the occurrence of hemorrhagic cystitis sodium 2-mercaptoethanesulfonate (Mesna) has been used, although this compound is not effective in established lesions. Regarding bladder cancer, this is characterized as the second most common malignancy of the genitourinary tract and the seventh more prevalent cancer among men in the world. The treatment depends on tumor invasiveness. To prevent recurrence of bladder cancer, adjuvant chemotherapy or immunotherapy has been used. However, the intravesical administration of BCG is the most effective treatment of superficial bladder cancer. Nevertheless, many side effects are common and approximately one third of cancer cases progress to higher stage. So, both hemorrhagic cystitis and bladder cancer remain like therapeutic challenges, since the effectiveness of treatment is often insufficient. In the search for new treatments, researches have been trying to find compounds from medicinal plants with low toxicity. In this context, *Uncaria tomentosa* is noteworthy, since barks and roots of this species are widely used in folk medicine for numerous diseases such as urinary tract disease and cancer. Considering these data, the objective of this study was to investigate the effect of crude extract hydroethanolic and purified fractions of *Uncaria tomentosa* on the proliferation of bladder cancer cells and on a model of hemorrhagic cystitis in mice. We demonstrated in the Chapter 1, that the quinovic acid glycoside purified fraction was able to inhibit the growth and viability of T24 and RT4 human bladder cancer cells. In T24 cells, this fraction significantly induced apoptosis by inhibition of cyclooxygenase 2, without causing cell cycle arrest. Although further investigations are necessary, we hypothesized that this effect may be occurring by inhibition of the transcription factor NF- $\kappa$ B. In the Chapter 2, we demonstrated that the same purified fraction was able to promote a significant reduction on edema and weight of mice bladders, showing activity equivalent to Mesna. In these experiments, we assume that the reversal effect of the damage induced by cyclophosphamide probably is related to the ability of this fraction to inhibit the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, which could be acting to prevent the side effects caused by cyclophosphamide. Considering these results, it is evident that this research shows promising antitumor and anti-inflammatory properties for the quinovic acid glycosides purified fraction, which may in future, become a potential therapeutic agent in treatment of bladder diseases.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A bexiga.....	1
1.2 Cistite hemorrágica.....	2
1.2.1 Considerações iniciais .....	2
1.2.2 Ciclofosfamida: principal causador da cistite hemorrágica.....	2
1.2.3 Mediadores pró-inflamatórios envolvidos.....	4
1.2.4 Sinais e sintomas .....	4
1.2.5 Tratamento.....	4
1.3 Câncer de bexiga .....	5
1.3.1 Considerações iniciais .....	5
1.3.2 Origem do câncer de bexiga .....	7
1.3.3 Classificação .....	8
1.3.4 Alterações gênicas .....	10
1.3.5 Sinais e sintomas .....	11
1.3.6 Tratamento.....	12
1.4 <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC. ....	13
1.4.1 Aspectos botânicos e geográficos.....	13
1.4.2 Aspectos fitoquímicos .....	14
1.4.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos .....	14
2. OBJETIVOS.....	21
3. CAPÍTULOS – ARTIGOS.....	22
CAPÍTULO 1 .....	22
Quinovic acid glycosides purified fraction of <i>Uncaria tomentosa</i> downregulate cyclooxygenase-2 and induces apoptosis in T24 human bladder cancer cell line.....	22
CAPÍTULO.....	73
Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com extrato bruto (UT), fração purificada de alcalóides oxindólicos (FPAO) e fração purificada de glicosídeos do ácido quinóvico (FPAQ) de <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC. sobre a cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida em camundongos .....	73
4. DISCUSSÃO GERAL.....	97

5. CONCLUSÕES .....	108
6. PERSPECTIVAS .....	109
7. REFERÊNCIAS .....	111
8. LISTA DE FIGURAS .....	131
9. LISTA DE TABELAS .....	132
10. ANEXOS.....	133
1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	133
2. LAUDO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA E AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO.....	134
3. NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY.....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – fator antiapoptótico

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

CCT – Carcinoma de Células Transicionais

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

CYP – ciclofosfamida

ERK – cinase reguladora de sinal extracelular

FPAO – fração purificada de alcalóides oxindólicos

FPAQ – fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico

IC<sub>50</sub> – concentração de um determinado fármaco que é necessário para causar uma inibição de 50%

IL-1 $\beta$  – interleucina-1 beta

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

Mesna – 2-mercaptoetanosulfonato de sódio

NF- $\kappa$ B – fator nuclear Kappa B

p53 – gene supressor tumoral

PTEN – fosfatase e homólogo da angiotensina deletado no cromossomo 10

PIP2 – fosfatidilinositol 4,5-difosfato

PIP3 – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PI3K – fosfatidilinositol 3-cinase

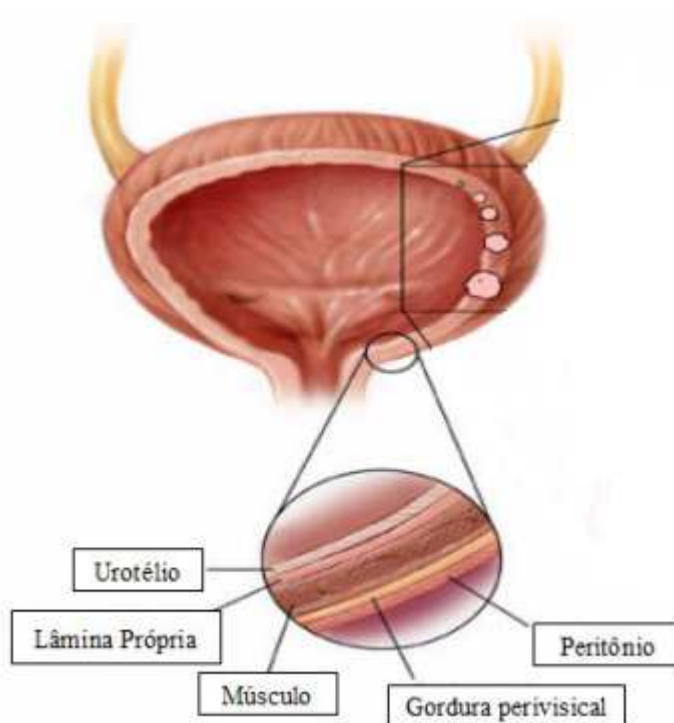
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

TNM – Tumor-Nódulo-Metástase

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A bexiga

O sistema urinário (Figura 1) é revestido internamente pelo urotélio, que corresponde à camada de células transicionais, denominadas de células uroteliais. Estas células são nutridas por uma lâmina própria ou submucosa, enquanto que o músculo detrusor é circundado por tecido conjuntivo frouxo e pela gordura pélvica (Netto Jr, 1999; Spence, Johnston, 2003).



**Figura 1.** Camadas que compõem a bexiga. Adaptado do site <[http://www.iamaguchi.com/page\\_15.html](http://www.iamaguchi.com/page_15.html)>.

Quando a bexiga é exposta a compostos tóxicos provenientes do metabolismo, pode se tornar inflamada, induzindo morte das células epiteliais e, então, cistite (Huan et al., 2006), podendo progredir a câncer, quando não tratada adequadamente.

## **1.2 Cistite hemorrágica**

### **1.2.1 Considerações iniciais**

A cistite hemorrágica é uma condição inflamatória difusa da bexiga (Manikandan et al., 2010) caracterizada por eventos inflamatórios intensos como: dor, edema, hemorragia, ulceração, necrose, infiltração linfocítica e, raramente, carcinoma das células transicionais da bexiga (Santos Jr et al., 2010).

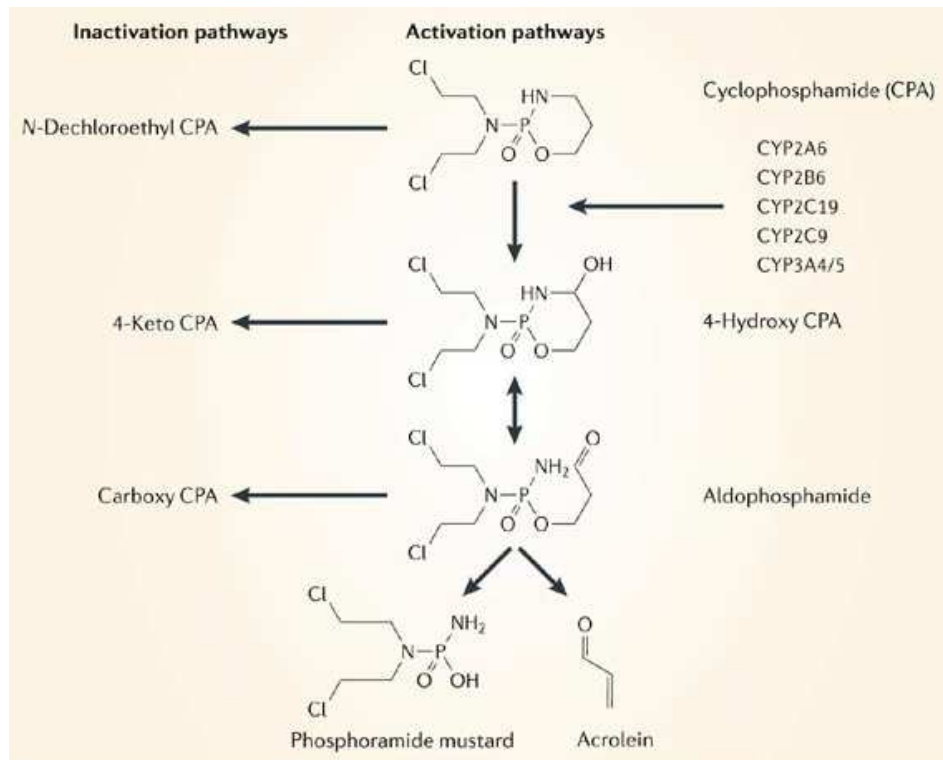
Embora a etiologia da cistite hemorrágica seja variável, agentes químicos e radiação são as duas causas mais frequentes. As oxafosforinas (ciclofosfamida e ifosfamida) e o busulfano, assim como as penicilinas e os anti-inflamatórios não esteróides, estão dentre os agentes químicos causadores da cistite hemorrágica. Sua ocorrência também tem sido observada após a radioterapia para tratamento de carcinomas próximos à região pélvica. Ainda, pode estar relacionada a infecções virais, bacterianas, fúngicas ou parasitárias e/ou agentes tóxicos (Traxer et al., 2001; Neheman et al., 2005; Cheuk et al., 2007).

### **1.2.2 Ciclofosfamida: principal causador da cistite hemorrágica**

A ciclofosfamida é um dos fármacos antineoplásicos mais efetivos no tratamento de tumores sólidos (câncer de mama e linfoma), bem como, de doenças malignas de células B, sendo também utilizada como imunossupressora em doenças não neoplásicas, como síndrome nefrótica, lúpus e artrite reumatóide (Batista et al., 2006; Bhatia et al., 2008; Macedo et al., 2008; Santos Jr et al., 2010). No entanto, o uso de ciclofosfamida está associado a manifestações tóxicas como imunotoxicidade, teratogenicidade, genotoxicidade e urotoxicidade (Bhatia et al., 2006; Bhatia et al., 2008). Destas, os efeitos colaterais urológicos são os principais limitantes do seu uso, incluindo sintomas

urinários irritativos, tais como cistite hemorrágica, fibrose da bexiga e necrose (Bhatia et al., 2006).

A ciclofosfamida é um fármaco inativo até sofrer metabolização hepática, via hidroxilação enzimática microsossomal, dando origem a 4-hidroxiciclofosfamida e a seu tautômero acíclico, a aldofosfamida. Aldofosfamida e 4-hidroxiciclofosfamida são transportadas pela circulação até as células tumorais, onde a 4-hidroxiciclofosfamida pode ser oxidada produzindo metabólitos inativos (*N*-decloroetilciclofosfamida e 4-cetociclofosfamida), enquanto a aldofosfamida é clivada produzindo uma mostarda de fosforamida, que é a forma ativa, e a acroleína, responsável pela toxicidade ao urotélio (Figura 2) (Wong et al., 2000; Rang et al., 2004). Deste modo, a urotoxicidade da ciclofosfamida está relacionada à excreção renal de metabólitos 4-hidróxi, como da acroleína, não estando baseada, portanto, no efeito alquilante direto na bexiga (Zupancic et al., 2008).



**Figura 2.** Metabolismo da ciclofosfamida. Reproduzido de Stearns et al., 2006.

Batista et al. (2006) demonstraram em um modelo em camundongos, que a toxicidade induzida por ciclofosfamida é atribuída, principalmente, ao metabólito acroleína, que em contato direto com o urotélio pode causar edema subepitelial, ulceração, neovascularização, hemorragia e necrose.

### **1.2.3 Mediadores pró-inflamatórios envolvidos**

Tem-se demonstrado que a acroleína promove um aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), a interleucina-6 (IL-6), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e o óxido nítrico (NO) endógeno, os quais estão diretamente envolvidos na patogênese da cistite no epitélio da bexiga em resposta a terapia com ciclofosfamida (Macedo et al., 2008; Dantas et al., 2010; Manikandan et al., 2010).

### **1.2.4 Sinais e Sintomas**

A sintomatologia da cistite hemorrágica caracteriza-se pela polaciúria (aumento da frequência urinária), dor abdominal (região vesical ou suprapúbica) e disúria (dor ou queimação ao urinar). Sinais sistêmicos, como febre, calafrios e mal-estar, também podem estar associados (Cotran et al., 2000).

Algumas vezes, a cistite hemorrágica é uma complicação secundária proveniente de uma doença primária, como aumento da próstata, cálculos ou tumores (Cotran et al., 2000).

### **1.2.5 Tratamento**

Considerando que a acroleína é reconhecida como o agente tóxico da cistite hemorrágica, a necessidade de prevenir esta doença se torna evidente. Alternativas



como diurese vigorosa e irrigação contínua da bexiga vêm sendo utilizadas para diminuir a incidência da cistite hemorrágica. Agentes como o 2-mercaptoetanosulfonato de sódio (Mesna), que detoxificam a ciclofosfamida e seus metabólitos, têm sido usados apesar da detoxificação da acroleína não prevenir completamente os sintomas da cistite hemorrágica (Zupancic et al., 2008; Santos Jr et al., 2010). Mesna é um fármaco clinicamente utilizado para prevenir a ocorrência de cistite hemorrágica em pacientes sob tratamento com a ciclofosfamida (Batista et al., 2006), cuja ação é se ligar a acroleína inativando-a; porém, sem anular a atividade do fármaco antitumoral (Crocitto et al., 1996; Morais et al., 1999). Contudo, Mesna não tem se mostrado eficiente quando a lesão já está estabelecida (Morais et al., 1999; Santos Jr et al., 2010). Conseqüentemente, outros métodos têm sido utilizados, como instilação intravesical de salina, formalina, nitrato de prata e prostaglandinas; administração oral de dissulfiram e de *N*-acetilcisteína; e terapia com oxigênio hiperbárico. Embolização da artéria hipogástrica, cistectomia com conduto ileal e aumento da bexiga são as medidas mais agressivas empregadas (Manikandan et al., 2010; Santos Jr et al., 2010). Embora a terapêutica disponível geralmente seja eficiente, a mortalidade não é descartada, enfatizando a gravidade desta manifestação clínica (Traxer et al., 2001) e trazendo a perspectiva de busca por novas estratégias terapêuticas que sejam mais seguras.

### **1.3 Câncer de bexiga**

#### **1.3.1 Considerações iniciais**

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia mais comum que afeta o trato genitourinário (Burnstock, 2011) e o sétimo câncer mais prevalente entre homens no

mundo (Ma et al., 2006), cuja incidência é relatada ser três vezes menor em mulheres (Jemal et al., 2010). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, estão previstas para o ano de 2012, 8.900 novos casos de câncer de bexiga, mantendo-se o sétimo câncer de maior frequência também no nosso país.

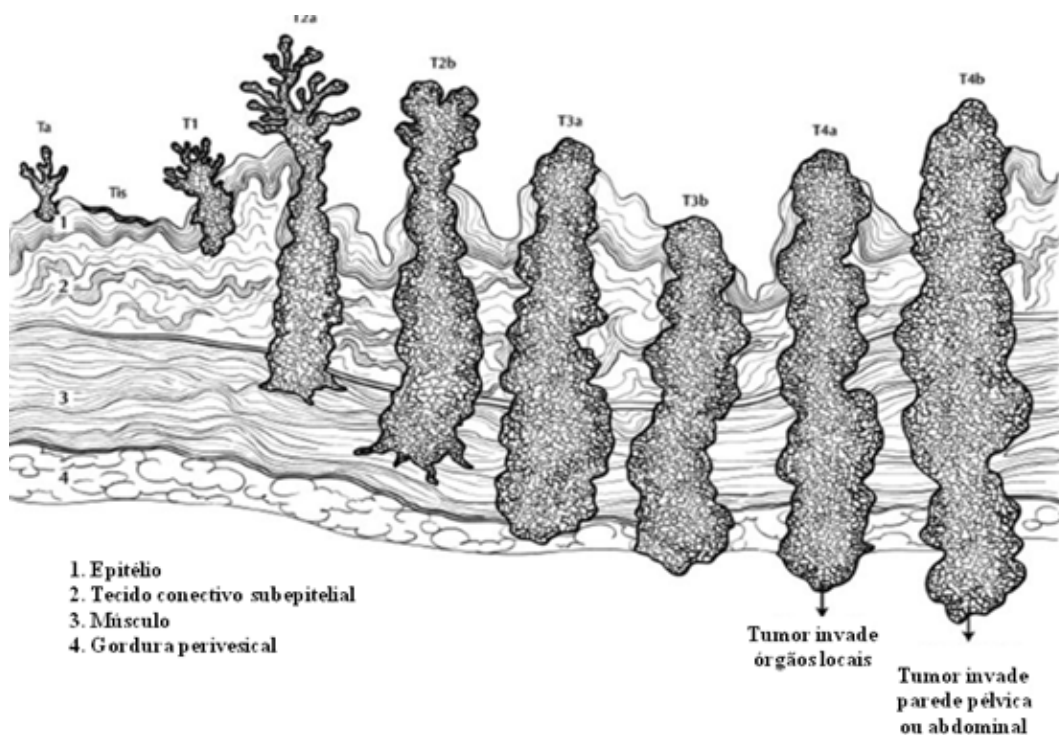
A mortalidade do câncer de bexiga varia entre países, sendo que os maiores índices são observados em países Europeus (Dinamarca, Reino Unido, Bélgica e Itália) e os menores índices em países Asiáticos (Japão, China e Singapura) (Bai et al., 2010).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os fatores de risco associados ao câncer de bexiga abrangem: cigarro, idade, histórico familiar, inflamação crônica da bexiga, exposição ocupacional a aminas aromáticas, tintas, solventes, metais pesados, diesel e exposição à radiação pélvica (Lee et al., 2009; Philips et al., 2009; Jacobs et al., 2011). O tabaco é indicado como a influência mais importante, aumentando o risco em três a sete vezes e acarretando em 50 a 80% do total dos cânceres de bexiga (Cotran et al., 2000). A incidência também aumenta com a idade, ocorrendo mais frequentemente em pessoas entre 50 a 70 anos (Netto Jr, 1999; Philips et al., 2009), sendo raro antes dos 40. Em pacientes com menos de 30 anos, o tumor tende a ser mais diferenciado e menos agressivo (Netto Jr, 1999). Trabalhadores da indústria de borracha, de couro, de tinta, têxtil e gráfica têm o risco aumentado de desenvolvimento do tumor, devido à presença de compostos carcinógenos nestes locais de trabalho (Cotran et al., 2000). As infecções crônicas da bexiga e os cálculos vesicais também aumentam o risco do câncer de bexiga, sendo mais frequente entre os indivíduos que abrigam o parasita *Schistosoma haematobium* (Porth, 2004). O uso abusivo de paracetamol, a radioterapia pélvica e o tratamento prévio com ciclofosfamida também parecem estar associados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer vesical (Netto Jr, 1999, Cotran et al., 2000). Ainda,

evidências atuais sugerem que alterações genéticas da mucosa normal da bexiga predispõem a esse câncer (Pollock et al., 2006).

### 1.3.2 Origem do câncer de bexiga

O câncer de bexiga pode ser de origem epitelial ou mesenquimal (Figura 3). Aqueles de origem epitelial (urotelial) constituem a grande maioria dos tumores, sendo o carcinoma de células transicionais o mais frequente (90%). Tumores de origem mesenquimal correspondem aos sarcomas, que são característicos de grandes tumores sólidos. Representam de 1-5% dos tumores vesicais e, em geral, são raros (Netto Jr, 1999; Cotran et al., 2000).



**Figura 3.** Extensão do câncer de bexiga. Adaptado de Jacobs et al., 2011.

A forma tumoral mais comum (90%) é o carcinoma de células transicionais (CCT) (Netto Jr, 1999; Cotran et al., 2000; Ma et al., 2006), sendo este câncer

caracterizado como imunogênico, cujas mudanças imunológicas estão associadas à progressão tumoral (Qian et al., 2009).

O câncer de bexiga é uma doença heterogênea, classificada em duas categorias principais: câncer superficial e câncer músculo-invasivo, com base na sua progressão e ocorrência (Spence, Johnston, 2003; Lee et al., 2009; Kim et al., 2010). Cerca de 70% dos tumores de bexiga são diagnosticados como tumores superficiais bem diferenciados, os quais estão confinados a mucosa (estágio Ta-Tis) ou a submucosa (estágio T1) (Figura 3) (Wu et al., 2004; Memon et al., 2005; Burnstock, 2011). Em geral não são fatais, apresentando um bom prognóstico (Lee et al., 2009; Kim et al., 2010). Contudo, em torno de 50% destes pacientes, apresentam recorrências após ressecção transuretral do câncer de bexiga, com progressão para o músculo (10-20%) (Wu et al., 2004; Ma et al., 2006; Nguyen-Khuong et al., 2009; Burnstock, 2011). Aproximadamente 25-30% dos cânceres de bexiga são classificados como tumores músculo-invasivos, pobremente diferenciados, estando associados com significativo risco de metástases subsequentes (30-60%) e uma taxa de sobrevivência significativamente reduzida de 10 anos (35%), demonstrando a natureza agressiva desta doença (Memon et al., 2005; Ma et al., 2006; Nguyen-Khuong et al., 2009; Kim et al., 2010; Burnstock, 2011).

### **1.3.3 Classificação**

Com o intuito de padronizar o tratamento e facilitar a comunicação dos casos em estudo, a classificação mais utilizada é a da União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominada TNM (tumor-nodo-metástase), onde T representa a extensão clínica do tumor, N os linfonodos comprometidos e M a presença de metástase, conforme demonstrado na Tabela 1 (Netto Jr, 1999).

**Tabela 1.** Classificação dos tumores de bexiga segundo a classificação TNM. Adaptado de Netto Jr, 1999.

---

**T (tumor primário)**

Tis - Carcinoma in situ

Ta - Carcinoma papilífero restrito a mucosa

T1 - Invasão da lâmina própria

T2 - Invasão da musculatura superficial

T3a - Invasão da musculatura profunda

T3b - Invasão da gordura perivisceral

T4 - Invasão de órgãos adjacentes e vísceras pélvicas

T4a - Invasão da próstata, vagina ou útero

T4b - Invasão da parede pélvica ou abdominal

T0 - Ausência de tumor

Tx - Extensão tumoral não esclarecida

---

**N (linfonodos)**

N0 - Ausência de linfonodos comprometidos

N1 - Linfonodo único unilateral menor ou igual a 2cm de diâmetro

N2 - Linfonodo único entre 2 e 5cm ou vários menores que 5cm de diâmetro

N3 - Linfonodos maiores que 5cm

N4 - Envolvimento dos linfonodos periaórticos

Nx - Linfonodos não estudados

---

**M (metástase)**

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Presença de metástase à distância

Mx - Presença de metástases não avaliadas

---

Os tumores de bexiga ainda são divididos conforme a graduação tumoral e o prognóstico: grau I (tumor bem diferenciado, com baixo potencial maligno), grau II (tumor moderadamente diferenciado, com baixo grau maligno) e grau III (tumor indiferenciado, com alto grau de malignidade). Em relação ao grau tumoral e ao estágio no qual o câncer se encontra, os tumores bem diferenciados são considerados superficiais e os indiferenciados, invasivos (Netto Jr, 1999; Cotran et al., 2000).

#### **1.3.4 Alterações gênicas**

No desenvolvimento e na progressão do câncer de bexiga múltiplas alterações genéticas e moleculares que antecedem mudanças morfológicas e são responsáveis pela tumorigênese e progressão deste tumor estão envolvidas (Tanaka et al., 2000; Lee et al., 2007).

Dentre as alterações genéticas descritas, destacamos a mutação no gene p53, considerada a alteração genética mais comum no câncer de bexiga humano, cujas alterações estão relacionadas à progressão tumoral. O gene p53 está envolvido na regulação do ciclo celular, apoptose e reparação do DNA em vários tipos celulares (Ma et al., 2006).

Mutações e/ou deleções no gene supressor tumoral PTEN também têm sido encontradas em uma proporção significativa no câncer de bexiga invasivo (24-58%) (Wu et al., 2004; Knowles et al., 2009; Yohn et al., 2011). Da mesma forma, a via da PI3K, responsável pela progressão do ciclo celular, sobrevivência, invasão e angiogênese na célula tumoral, também tem sido demonstrada estar aberrantemente ativa em tumores de bexiga, podendo estar envolvida justamente na progressão e/ou tumorigênese (Wu et al., 2004). A hiperativação da Akt também é uma característica comum em uma ampla variedade de cânceres humanos, incluindo o câncer de bexiga.

Sua ativação resulta no aumento da resistência à apoptose (Wu et al., 2004; Qin et al., 2007).

A survivina é uma proteína que está presente durante o desenvolvimento fetal e embrionário, mas que no tecido adulto normal é regulada negativamente. Contudo, esta passa a ser expressa em uma variedade de cânceres, incluindo o câncer de bexiga. Neste câncer, sua expressão está associada com grau tumoral, risco de recorrência e sobrevivência, uma vez que a survivina exibe efeitos antiapoptóticos (Ma et al., 2006).

Outra molécula que tem sido apontada como sendo promotora do crescimento das células do câncer de bexiga é a citocina interleucina-6 (IL-6), cujo aumento dos seus níveis no soro e na urina de pacientes com câncer foi correlacionado com o grau e o tamanho tumoral e prognóstico desfavorável. Da mesma forma, receptores do tipo Toll 4 (TLR4) também podem ser aberrantemente expressos no câncer de bexiga, promovendo, quando ativados, a progressão tumoral (Qian et al., 2009).

### **1.3.5 Sinais e sintomas**

Hematúria indolor é a sintomatologia mais frequente, acometendo aproximadamente 85% dos pacientes. A irritabilidade vesical caracterizada por disúria, polaciúria e urgência miccional é outra manifestação clínica, geralmente associada a tumores mais agressivos (Netto Jr, 1999; Cotran et al., 2000; Jacobs et al., 2011). Dor lombar e pélvica e edema dos membros inferiores são sinais e sintomas secundários, decorrentes de metástases ou comprometimento de órgãos próximos à bexiga (Netto Jr, 1999).

### 1.3.6 Tratamento

O tratamento do câncer de bexiga varia conforme a natureza invasiva do tumor. Tumores superficiais podem ser removidos facilmente com cistoscopia, enquanto tumores invasivos requerem cistectomia radical, seguido de desvio urinário, quimioterapia sistêmica, radioterapia ou uma combinação destes métodos (Nguyen-Khuong et al., 2009; Ozawa et al., 2009).

Para prevenção da recorrência do câncer de bexiga, quimioterapia ou imunoterapia adjuvante têm sido amplamente utilizadas. Contudo, a administração intravesical do Bacillus Calmette-Guérin (BCG) após ressecção transuretral é a mais efetiva no tratamento do câncer de bexiga superficial. No entanto, os efeitos colaterais hematuria, febre, irritação da bexiga e dor vesical da terapia da BCG são comuns, e aproximadamente um terço dos pacientes não respondem a este tratamento, progredindo para um estágio superior (Lamm et al., 1980; Herr et al., 1992; Swellam et al., 2003; Qian et al., 2009).

O câncer de bexiga é considerado o câncer mais dispendioso para pesquisa e tratamento devido à necessidade de intervalos frequentes de uretrocistoscopia, citologia urinária e avaliações radiológicas (Bai et al., 2010). Ademais, câncer de bexiga invasivo, localmente avançado e metastático, câncer superficial recorrente e carcinoma *in situ* resistente ao tratamento permanecem como desafios terapêuticos (Ma et al., 2006; Ozawa et al., 2009), uma vez que a eficácia dos tratamentos avaliados para esta neoplasia não são sempre suficientes. Frente a vários efeitos colaterais da terapia disponível, muitas pesquisas tentam encontrar compostos naturais com baixa toxicidade (Ma et al., 2006), tendo como base inúmeros resultados promissores das plantas em modelos de câncer pré-clínico (Lee et al., 2007).



## 1.4 *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

### 1.4.1 Aspectos botânicos e geográficos

*Uncaria tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Shultes) DC. pertence à família Rubiaceae e é popularmente conhecida como unha-de-gato ou garra-de-gato. Os caules desta planta possuem um espinho lenhoso, posicionado para baixo, reto ou pouco curvado, podendo medir cerca de 2 cm, o qual é fundamental na escalada para outras árvores e são os responsáveis pelos nomes populares atribuídos a espécie (Figura 4) (Keplinger et al., 1999; Pollito, Tomazello, 2006).



**Figura 4.** *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Adaptado de Pollito, 2004.

A espécie vegetal é uma videira lenhosa, amplamente difundida, distribuindo-se nas florestas tropicais da América do Sul (Amazônia Brasileira, Peru, Colômbia, Equador, Guiana, Venezuela, Trinidad, Suriname) e da América Central (Guatemala, Costa Rica, Panamá, República Dominicana) (Keplinger et al., 1999; Quintera, Ugaz, 2003; Pollito, Tomazello, 2006). No Brasil, *Uncaria tomentosa* é encontrada nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e, principalmente, no Acre (Pollito, 2004).

### 1.4.2 Aspectos fitoquímicos

A análise dos constituintes químicos das cascas de *Uncaria tomentosa* revela a presença de uma série de metabólitos secundários. Entre eles estão os compostos fenólicos, como flavonóides, derivados fenilpropânicos e taninos; os derivados triterpênicos, representados pelas agliconas e heterosídeos dos ácidos quinóico, ursólico e oleanólico, com uma ou duas cadeias de carboidratos ligadas ao núcleo triterpênico; e os alcalóides, sendo majoritários os oxindólicos e, em menor proporção, os indólicos, ambos divididos em tetracíclicos e pentacíclicos. Dentre os alcalóides oxindólicos pentacíclicos estão a pteropodina, isopteropodina, especiofilina, uncarina F, mitrafilina e isomitrafalina (Keplinger et al., 1999). Isolamento dos esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol têm sido referenciado (Sandoval-Chacón et al., 1998; Keplinger et al., 1999). Recentemente, ésteres do ácido quínico também têm sido identificados (Sheng et al., 2005).

A padronização das formulações comerciais de *Uncaria tomentosa* é baseada no seu conteúdo de alcalóide oxindólico, uma vez que alcalóides representam a classe mais abundante de compostos encontrados nesta espécie (Keplinger et al., 1999; Sandoval et al., 2002). Porém, já foi observado que mudanças sazonais podem ocasionar alterações no conteúdo destes alcalóides (Keplinger et al., 1999).

### 1.4.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos

Relatos históricos demonstram que *Uncaria tomentosa* tem sido cultivada por várias gerações indígenas na floresta amazônica, tanto na medicina tradicional quanto institucional (Pollito, Tomazello, 2006). Quanto ao início do emprego desta espécie na medicina indígena Asháninka, na região Amazônica Peruana, estes continuam incertos (Syrimis, 1999). Cascas e raízes de *Uncaria tomentosa* são amplamente empregadas,

sendo administradas como chá, tanto na forma de decocção como de maceração (Keplinger et al., 1999; Sheng et al., 2000a; Sandoval et al., 2002). Especialmente no Peru e na região norte do Brasil, a espécie tem sido administrada em casos de dor reumática, artrite, osteoartrite, infecções bacterianas e virais, dores cardíacas, úlceras gástricas, hemorragia, inflamações crônicas, alergias, asma, diarreia, gonorréia, acne, doenças do trato urinário e até mesmo em casos de câncer (Keplinger et al., 1999; Aguilar et al., 2002; Heitzman et al., 2005; Valente, 2006; Hardin, 2007; Allen-Hall et al., 2010). Extratos, cápsulas e comprimidos à base de *Uncaria tomentosa* têm sido introduzidos na Europa e nos Estados Unidos como tratamento adjuvante para o câncer e algumas doenças virais, como a AIDS (Sandoval-Chacón et al., 1998; Sheng et al., 2000a).

Diversos estudos relatam diferentes atividades biológicas para extratos, frações e/ou isolados de *Uncaria tomentosa*, demonstrando propriedades citotóxica, contraceptiva, antiproliferativa, antiapoptótica ou pró-apoptótica, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antimutagênica (Aquino et al., 1989; Rizzi et al., 1993; Sandoval-Chacón et al., 1998; Sheng et al., 2000a; De Martino et al., 2006; Allen-Hall et al., 2007; Cheng et al., 2007; Allen-Hall et al., 2010; Dreifuss et al., 2010).

A atividade imunoestimulante induzida pelos alcalóides oxindólicos presentes na espécie *Uncaria tomentosa* foi demonstrada inicialmente *in vitro* e *in vivo* pelo aumento da fagocitose em leucócitos (Wagner et al., 1985). Posteriormente, o extrato ácido desta espécie vegetal, rico em alcalóides, foi administrado por cinco meses em pacientes infectados pelo vírus HIV, causando um aumento representativo nos níveis de linfócitos (Keplinger et al., 1999). Neste mesmo estudo, Keplinger et al. (1999) demonstraram *in vitro* que os alcalóides oxindólicos pentacíclicos promoveram o estímulo das células endoteliais a produzirem fatores que regulam a proliferação dos linfócitos. Ainda, a

atividade imunoestimulante foi constatada em macrófagos alveolares de ratos de forma dose-dependente para os extratos aquosos, com intensa produção das interleucinas 1 e 6 (Lemaire et al., 1999). Além disso, o extrato hidroetanólico e uma fração enriquecida em alcalóides oxindólicos pentacíclicos de *Uncaria tomentosa* demonstraram efeitos imunomodulatório e antiviral contra o vírus da dengue tipo 2 em monócitos humanos, onde a fração demonstrou-se muito mais eficiente quando comparada ao extrato (Reis et al., 2008). Ademais, a administração de *Uncaria tomentosa* promoveu o estímulo do sistema imunológico em um modelo de infecção de listeriose em camundongos (Eberlin et al., 2005).

C-Med 100<sup>®</sup> (CampaMed, New York, NY, USA) é um extrato padronizado, obtido por decocção das cascas de *Uncaria tomentosa*, onde moléculas com massa molecular acima de 10 kDA, como alcalóides, taninos e flavonóides, são removidos. Após a suplementação deste extrato aquoso, foi demonstrado um aumento no reparo do DNA e na resposta imunológica *in vivo*, enquanto nenhum sinal ou sintoma de toxicidade foi observado nas doses testadas em humanos e ratos (Sheng et al., 2000a). Observações semelhantes em camundongos foram demonstradas, cujo tratamento destes animais com C-Med 100<sup>®</sup> promoveu um aumento significativo de linfócitos esplênicos, sendo este efeito totalmente reversível depois da retirada do extrato (Akeson et al., 2003b). *In vitro*, o extrato padronizado promoveu proteção de linfócitos primários e de células tumorais (Raji, HL-60, Jurkat) da indução espontânea de apoptose (Akeson et al., 2003a). Da mesma forma, este extrato padronizado acelerou a recuperação da leucopenia, mesmo após a administração do agente quimioterápico doxorrubicina (Sheng et al., 2000b). Ainda, foi evidenciado que o ácido quínico, um componente ativo deste extrato padronizado, é responsável por aumentar o número de linfócitos esplênicos *in vivo* e por inibir a atividade do NF-κB *in vitro* (Akeson et al., 2005). O aumento no

reparo do DNA demonstra ser muito importante para o tratamento de pacientes sob quimioterapia, uma vez que pacientes tratados com a combinação de quimioterápicos e *Uncaria tomentosa* apresentaram uma acelerada recuperação na contagem de leucócitos, bem como uma redução dos efeitos colaterais, além de atenuar a neutropenia (Allen-Hall et al., 2007; Farias et al., 2011). No entanto, é importante salientar que o efeito de *Uncaria tomentosa* depende do tipo celular estudado, apresentando atividades contraditórias, podendo inibir a ativação do NF- $\kappa$ B bem como ativar mecanismos antiapoptóticos que protegem algumas células, como os linfócitos (Allen-Hall et al., 2007).

O potencial antitumoral da espécie *Uncaria tomentosa* é atribuído às três principais frações de metabólitos secundários: polifenóis, alcalóides e derivados triterpênicos (Sheng et al., 1998; Riva et al., 2001; De Martino et al., 2006). Esta atividade foi observada em células leucêmicas HL60, cuja inibição do crescimento celular decorrente da ação do extrato aquoso padronizado foi atribuída à estimulação de mecanismos de reparo do DNA, resultando em imunoestimulação, atividade anti-inflamatória e, conseqüentemente, prevenção do câncer (Sheng et al., 2005). Igualmente foi constatado o efeito antiproliferativo do extrato aquoso de *Uncaria tomentosa* sobre as linhagens de carcinoma de mama (MCF7), linhagens humanas de osteossarcoma (SAOS) e linhagens de carcinoma cervical (HeLa). O efeito pró-apoptótico foi observado sobre a linhagem HeLa, quando tratada com a fração *n*-butanólica da espécie *Uncaria tomentosa* (De Martino et al., 2006). O alcalóide oxindólico pentacíclico mitrafilina tem demonstrado significativa ação antiproliferativa sobre duas linhagens celulares do sistema nervoso humano: neuroblastomas SKN-BE (2) e glioma GAMG (García Prado et al., 2007). O efeito antitumoral da espécie averiguada para extratos, frações enriquecidas e alcalóides oxindólicos pentacíclicos isolados, também foi

demonstrada em outros estudos onde diversas linhagens celulares foram utilizadas, tais como linhagens de leucemia mielóide humana (K-562 e HL-60), linhagem de linfoma humano (Raji), linhagem de melanoma humano (SK-MEL), carcinoma cervical humano (KB), carcinoma ductal (BT-549), carcinoma de ovário (SK-OV-3), linhagem derivada do rim do macaco (VERO), linhagem humana de leucemia linfoblástica T (CCRF-CEM-C7H2), linhagem de leucemia linfoblástica aguda (ALL), linhagem celular de carcinoma de tireóide medular humano (MTC-SK), linhagem humana de sarcoma de Ewing's (MHH-ES-1), linhagens de glioma de rato (C6) e de humano (U138-MG), carcinoma de pulmão Lewis de camundongo LL/2 (LLC), carcinoma de mama humano (MCF7 e MT-3), carcinoma de pulmão de não-pequenas células humano (A549) e adenocarcinoma de colorretal humano (SW707) (Stuppner et al., 1993; Sheng et al., 1998; Muhammad et al., 2001; Bacher et al., 2005; Bacher et al., 2006; Cheng et al., 2007; Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009; Giménez et al., 2010; Pavei, 2010; Pilarski et al., 2010). A apoptose mediada por caspases parece ser o mecanismo associado à morte destas células tumorais (Sheng et al., 1998; Bacher et al., 2005; De Martino et al., 2006; Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009). No entanto, um mecanismo alternativo de indução de apoptose parece estar relacionado à capacidade da *Uncaria tomentosa* em inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, o qual depende do tipo celular e do seu *status* de ativação (Allen-Hall et al., 2010).

Além destes, outros estudos também foram realizados a fim de se investigar a atividade anti-inflamatória relatada para o uso desta espécie na medicina popular. A ação anti-inflamatória *in vitro* foi relacionada à capacidade da espécie *Uncaria tomentosa* em modular o fator transcricional NF- $\kappa$ B, mediando a secreção diferencial de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e, desta forma, promovendo morte celular por apoptose. Conforme dados da literatura, *Uncaria tomentosa* é o primeiro vegetal que de maneira distinta

regula a secreção destas duas citocinas pró-inflamatórias, promovendo, via NF- $\kappa$ B, o aumento de IL-1 $\beta$  e suprimindo a síntese de TNF- $\alpha$  (Sandoval-Chacón et al., 1998; Sandoval et al., 2000; Aguilar et al., 2002; Sandoval et al., 2002; Akesson et al., 2003a; Allen-Hall et al., 2007; Allen-Hall et al., 2010). *In vivo*, efeitos anti-inflamatórios foram observados pela redução do dano celular em brônquios de camundongos, após inflamação respiratória induzida por O<sub>3</sub>, seguida da administração de decoctos (Cisneros et al., 2005) e pela redução do edema de pata de camundongos e ratos, induzido por carragenina, após administração de extratos hidroalcoólicos e de glicosídeos do ácido quinóico, respectivamente (Aguilar et al., 2002; Aquino et al., 1991). Ainda, no estudo conduzido por Aguilar et al. (2002) foi demonstrado que os extratos aquoso e hidroalcoólico de *Uncaria tomentosa* promoveram um moderado e fraco efeito inibitório sobre as ciclooxigenases, COX-1 e COX-2, respectivamente. Esta atividade anti-inflamatória observada foi atribuída à presença de alcalóides oxindólicos pentacíclicos, os quais podem estar agindo isoladamente ou em sinergismo com outros metabólitos. Da mesma forma, um análogo do ácido quínico prontamente inibiu a atividade de NF- $\kappa$ B em células A549 estimuladas com TNF- $\alpha$ . Porém, esta atividade foi atribuída a mecanismos que não estão relacionados à atividade citotóxica ou antiproliferativa nem à atividade antioxidante (Zeng et al., 2009).

O efeito citoprotetor do extrato aquoso das cascas de *Uncaria tomentosa* contra agentes oxidativos também foi evidenciado pela redução da apoptose, tanto em macrófagos (RAW 264.7) como em células epiteliais intestinais humanas (HT29), demonstrando a habilidade em proteger o DNA e em inibir a expressão da iNOS, via supressão da atividade do NF- $\kappa$ B (Sandoval-Chacón et al., 1998). Ainda, Sandoval-Chacón et al. (1998) reportaram que este mesmo extrato foi capaz de inibir a inflamação intestinal crônica induzida por indometacina *in vivo*. Efeitos antioxidantes similares

foram evidenciados contra o ácido hipocloroso, um forte oxidante produzido por neutrófilos, podendo justificar a efetividade de *Uncaria tomentosa* no tratamento de doenças inflamatórias e em certos tipos de câncer (Amaral et al., 2009). Dreifuss et al., 2010 demonstraram um efeito antineoplásico relevante do extrato hidroalcoólico de *Uncaria tomentosa* em modelo tumoral sólido de carcinosarcoma (Walker-256), correlacionando esta atividade observada com a habilidade antioxidante da espécie em regular a homeostase metabólica e redox *in vivo*.



## 2. OBJETIVOS

O presente estudo está delineado na forma de capítulos, onde estão inseridos os artigos científicos que objetivaram:

- Investigar a ação antiproliferativa do extrato bruto e das frações purificadas de alcalóides oxindólicos e de glicosídeos do ácido quinóvico da espécie *Uncaria tomentosa* sobre culturas de linhagem de células de câncer de bexiga humano RT4 e T24, e elucidar as vias celulares envolvidas (Capítulo 1).

- Avaliar *in vivo*, o efeito do extrato bruto e das frações purificadas de alcalóides oxindólicos e de glicosídeos do ácido quinóvico da espécie *Uncaria tomentosa* nos eventos inflamatórios e nociceptivos em modelo de cistite hemorrágica, induzida pela ciclofosfamida (Capítulo 2).

### **3. CAPÍTULOS – ARTIGOS**

#### **CAPÍTULO 1**

**QUINOVIC ACID GLYCOSIDES PURIFIED FRACTION OF *Uncaria tomentosa*  
DOWNREGULATE CYCLOOXYGENASE-2 AND INDUCES APOPTOSIS IN  
T24 HUMAN BLADDER CANCER CELL LINE**

**Artigo a ser submetido ao Periódico Journal of Ethnopharmacology**

**Quinovic acid glycosides purified fraction of *Uncaria tomentosa* downregulate cyclooxygenase-2 and induces apoptosis in T24 human bladder cancer cell line**

Fabrcia Dietrich<sup>1</sup>, Samuel Kaiser<sup>2</sup>, Liliana Rockenback<sup>1</sup>, Fabrcio Figueiró<sup>1</sup>, Fernanda Monte da Cunha<sup>1</sup>, Fernanda Bueno Morrone<sup>3</sup>, George Gonzàlez Ortega<sup>2</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>2</sup> *Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>3</sup> *Farmacologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Corresponding author:

Ana Maria Oliveira Battastini

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone: +55 (51) 3308.5554

Fax: +55 (51) 3308.5535

E-mail: [abattastini@gmail.com](mailto:abattastini@gmail.com)

## Abstract

*Ethnopharmacological Relevance:* The *Uncaria tomentosa* species is widely used in traditional medicine because of the many pharmacological properties attributed to it, and studies have shown the presence of metabolites with potential antitumor effect in different cell lines.

*Aim of the study:* Investigate the antitumor effect of purified bioactive fractions of *Uncaria tomentosa* on the cell proliferation of T24 and RT4 human bladder cancer lines.

*Materials and methods:* The purified bioactive fractions were obtained by maceration process from the barks of *Uncaria tomentosa*. The T24 and RT4 cell lines were cultured in RPMI 1640 and DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, respectively. Cells were maintained in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37°C. For the evaluation of the antitumoral activity, the cell count assay was performed in haemocytometer. To measure cell viability, the MTT assay was performed. To determine the cell death, annexin V/PI flow cytometric staining technique was used. The cell cycle analysis was also performed. The immunocontent of PTEN, ERK and COX-1/COX-2 were evaluated by Western blot. For determination of activity ecto-5'-nucleotidase/CD73, the inorganic phosphate released was measured by Malachite Green method.

*Results:* Quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) was able to decrease cell growth and viability of bladder cancer cells. In T24 cell, QAPF significantly inhibited COX-2 and induced apoptosis. Others experiments showed that this fraction does not induce cell cycle arrest and do not alter the PTEN and ERK immunocontent. In the set of incubation, no change in the enzyme profile of ecto-5'-nucleotidase/CD73 was observed. The A3 adenosine receptor antagonist (MRS 1220) also did not change the anti-proliferative effect induced by QAPF.

*Conclusion:* Whereas all alternative mechanisms investigated we demonstrated that QAPF acts by specific inhibition of COX-2 and induces apoptosis in T24 cells. Further studies to characterize the exact mechanism by which QAPF induces apoptosis will be carried.

**Abbreviations:** oxindole alkaloids purified fraction (OAPF), quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF)

**Keywords:** bladder cancer, *Uncaria tomentosa*, quinovic acid glycosides, apoptosis, COX-2

## 1. Introduction

Bladder cancer is the second most common malignancy that affects the genitourinary tract (Burnstock, 2011) and the seventh more prevalent cancer among men in the world (Ma et al., 2006). The incidence of this kind of tumor is reported to be three times higher in men than in women (Jemal et al., 2010). In Brazil, according to the National Cancer Institute, 8,900 new cases of bladder cancer are expected in 2012. Some risk factors associated with this cancer are tobacco, age, occupational exposure, chronic bladder inflammation and exposure to pelvic radiation (Jacobs et al., 2011). Transitional cell carcinoma (TCC) is the most common tumor (90%) (Burnstock, 2011), where approximately 70% are diagnosed as well differentiated superficial lesions (Memon et al., 2005) that may have recurrences after transurethral resection (Wu et al., 2004; Ma et al., 2006; Nguyen-Khuong et al., 2009; Burnstock, 2011). Approximately 25-30% of bladder cancers are classified as muscle-invasive tumors and are associated with significant risk of subsequent metastases (30-60%) and a significantly reduced 10-year survival rate (35%), demonstrating the aggressive nature of this disease (Memon et al., 2005; Nguyen-Khuong et al., 2009, Burnstock, 2011). Adjuvant chemotherapy or immunotherapy have been used to prevent recurrence of bladder cancer, but the intravesical administration of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) after transurethral resection is the most effective treatment of superficial bladder cancer. Nevertheless, side effects of BCG therapy are common and approximately one third of patients do not respond to this treatment (Lamm et al., 1980; Herr et al., 1992; Swellam et al., 2003).

Recently, the participation of purinergic signaling in the physiology of the urinary bladder has demonstrated strong evidence of the involvement of this system in the tumor progression, particularly ecto-5'-nucleotidase/CD73, the enzyme responsible

to catalyse the hydrolysis of extracellular nucleotide monophosphates like AMP to adenosine. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 is highly expressed in many solid tumors and is related with invasiveness, neovascularization and metastasis of tumors (Zimmermann, 1992; Spychala, 2000; Burnstock, 2004). It has been demonstrated that this enzyme is involved in tumor cell proliferation and tumor progression (Spychala et al., 2004; Zhou et al., 2007). In the same way, in the development and progression of bladder cancer, multiple gene alterations are involved (Tanaka et al., 2000). Recent studies have demonstrated that reduced PTEN expression is common in bladder cancer, while COX-2 has been found to be overexpressed in this tumor (Knowles et al., 2009; Méric et al., 2006; Huang, Chen, 2011). In relation to ERK, it has been shown that the dysregulation of this cascade results in several diseases, being responsible for more than half of all cancers (Wortzel, Seger, 2011). Thus, the possible association of the ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the malignancy of bladder tumors and the modification on the immunoccontent of PTEN, COX-2 and ERK in tumorigenesis of bladder, becomes possible targets for the treatment of this tumor. Moreover, considering the ineffectiveness of various currently available therapeutic strategies used in bladder cancer (Ozawa et al., 2009) and several side effects of chemical therapeutics drugs, many studies tried to find more effective natural drugs with reduced toxicity (Ma et al., 2006). In this sense, medicinal plants have received great attention in recent decades, since the late findings of great impact in this area stems from research into plant products (Simões et al., 2004).

*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC., commonly known as “uña de gato” or “cat’s claw”, is a South American Rubiaceae (Pollito, Tomazello, 2006). Maceration and decoctions of bark and roots of this species has been used for centuries by Asháninkas indigenous people (Syrimis, 1999). Recently, preparations of *Uncaria tomentosa* have

been used for the treatment of several diseases, such as gastric ulcers, arthritis, bacterial and viral infections, inflammations, diseases of the urinary tract and even in cases of cancer, especially in Peruvian and northern Brazilian traditional medicine (Keplinger et al., 1999; Heitzman et al., 2005). Phytochemical studies have shown that *Uncaria tomentosa* barks present three main fractions of secondary metabolites, such as polyphenols (flavonoids, tannins and phenylpropanic derivatives), alkaloids (oxindole and indol) and triterpene derivatives (aglycones and quinovic acid, ursolic and oleanolic heterosides), groups described with potential antitumor effects (Sheng et al., 1998; Keplinger et al., 1999; Riva et al., 2001; De Martino et al., 2006). Some studies have suggested that *Uncaria tomentosa* can inhibit the proliferation of several cell lines such as cervical carcinoma, breast cancer, osteosarcoma (De Martino et al., 2006), leukemia (Sheng et al., 1998; Bacher et al., 2005; Cheng et al., 2007; Pilarski et al., 2007) and glioma (Pavei, 2010). Caspase-dependent apoptosis appears to be the mechanism associated with the death of these tumor cells (Sheng et al., 1998; Bacher et al., 2005; De Martino et al., 2006; Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009). Nevertheless, there seems to be an alternative mechanism of induction apoptosis on the ability of *Uncaria tomentosa* to inhibit the activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B (Allen-Hall et al., 2010). However, no study has evaluated the antitumor effects of extracts and fractions of *Uncaria tomentosa* in the treatment of bladder cancer. Here, we demonstrated for the first time that quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* has a potent inhibitory effect on the COX-2 and induces apoptosis on bladder cancer cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin, Fungizone® and 0.5% trypsin/EDTA solution were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Cultilab (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). AMP, dimethyl sulfoxide (DMSO), propidium iodide (PI), RNase and (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT) were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). MRS 1220 (9-Chloro-2-(2-furanyl)-5-((phenylacetyl)amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline) was obtained from Tocris Cookson (UK). FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I was obtained from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA). Antibodies specific to phospho-ERK42/44, ERK42/44, PTEN, COX-1, COX-2,  $\beta$ -actin, and anti-rabbit IgG-horseradish peroxidases were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

### 2.2. Obtaining of oxindole alkaloids purified fraction (OAPF) and quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF)

Barks of *Uncaria tomentosa*, collected in Ucayali (Peru), were supplied by Laboratorios Induquímica S.A. of Chorrillos (Lima, Peru). The plant material used was confirmed to be *Uncaria tomentosa* by biologist Peruvian José Ricardo Campos de la Cruz.

The process for obtaining the extract and purified fractions was performed in accordance to Borré (2010). Thus, an extract of *Uncaria tomentosa* stem barks was



prepared by a 4 days-maceration with hydroethanolic solution 40% (v/v) in a plant:solvent ratio of 1:10 (w/v), at room temperature. After, the extract was pre-purified with cross-linked polyvinylpyrrolidone at dried residue extract: PVPP ratio of 1:10 (w/w) by 60 min. The pre-purified extract was submitted to ion-exchange process using a column filled with strong anionic resin, as follows: 300 mL of pre-purified extract were poured onto the column and eluted with 100 mL of hydroethanolic solution 40% (v/v), and subsequently with 300 mL of ammonium acetate buffer 0.3 M (pH 7.0), 300 mL of hydroethanolic solution 80 % (v/v). A flow rate of 5.0 mL/min was applied during the whole process. Separately, the eluates obtained in first step (Anionic resin eluate - ARE) and that using hydroethanolic solution 80 % (OAPF) were reserved, concentrated and freeze-dried. The ARE was submitted to solid-phase fractionating using a column filled with polystyrene resin as follows: a 300 mg-sample of ARE was dissolved in 200 mL of water, poured on the column top, and sequentially fractionated with methanol:water mixtures in decreasing polarity. The flow rate was kept constant at 2.5 mL/min during all the process. The methanol:water 90% (v/v) and methanol fractions were mixed (QAPF), concentrated and freeze-dried. The content of oxindole alkaloids (Unpublished results) and quinovic acid glycosides (Pavei et al., 2012) in the freeze-dried samples (extract, OAPF and QAPF) were determined by HPLC-PDA analysis using previously validated methods (Table 1).

### *2.3. Maintenance of cell lines*

The human bladder cancer cell lines T24 (derived from an invasive bladder tumor with metastatic potential) and RT4 (representing a superficial noninvasive cancer) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). T24 was maintained in RPMI culture medium and RT4 was

maintained in DMEM culture medium. Cells with up to 25 passages were grown and maintained in culture flasks in culture medium containing 0.5 U/mL penicillin/streptomycin antibiotics and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95% and an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

#### 2.4. Cell treatment

*Uncaria tomentosa* crude extract and fractions were dissolved in cell culture-grade dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximum final concentration of DMSO in the culture medium was 0.25% (v/v) and it was the vehicle group in all experiments. The human bladder cancer cells line were seeded according each experiment and after reaching semi-confluence the cultures were exposed to following formulations: *Uncaria tomentosa* crude extract (5, 10, 25, 50, 100 and 150 µg/mL) for 24 or 48 h; oxindole alkaloids purified fraction (OAPF) and quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) (5, 10, 25, 50, 100 and 150 µg/mL) for 24, 48 or 72 h. In experiments performed in the presence of adenosine receptor antagonist, this compound was added to the culture medium 30 min before QAPF treatment.

To evaluate de effect of QAPF on AMP hydrolysis, the cells were treated with this fraction (25, 50, 100 and 150 µg/mL) for 48 h. After the treatment, the cells were washed three times with phosphate-free buffer and the AMP hydrolysis assay was performed in the absence of treatment. To measured the direct effect of QAPF on ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity, the cells were pre-incubated in the incubation medium with the same concentrations of QAPF for 10 min and then the AMP hydrolysis assay was performed as described above.

### 2.5. Cell counting

The human bladder cancer cell lines T24 and RT4 were seeded at  $8 \times 10^3$  cells per well (RPMI 10% FBS) and  $5 \times 10^4$  cells per well (DMEM 10% FBS), respectively, in 24-well plates and allowed to grow until reaching semi-confluence. Cells were treated with *Uncaria tomentosa* crude extract, OAPF, QAPF and/or adenosine receptor antagonist, as described above. At the end of treatment, the medium was removed. Cells were washed twice with CMF (calcium and magnesium free buffer) and 200  $\mu$ L of 0.05% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a haemocytometer. The results were expressed as percentage of cells in relation to vehicle group.

### 2.6. Cell viability assay

The MTT method is based on the ability of metabolically active mitochondria from viable cells to reduce the tetrazolium rings of the pale yellow MTT and form dark blue formazan crystals. Bladder cancer cell lines were plated in a 96-well plate at  $3 \times 10^3$  (T24) and  $8 \times 10^3$  (RT4) per well. After reaching semi-confluence, the cultures were treated as described above. Control culture was performed with the addition of culture medium (cell viability control) or DMSO (vehicle control) in the absence of treatment. After 24, 48 or 72 h of treatment, the culture medium was removed and the cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). After removing the PBS, 90  $\mu$ L of culture medium and 10  $\mu$ L of MTT (5mg/mL) were added to each well. The cells were incubated for 3 h and the solution was then removed from the precipitate. A total of 100  $\mu$ L of DMSO were added to the wells and the optical absorbance was measured at 492 nm using an ELISA plate reader. This absorbance was linearly

proportional to the number of live cells with active mitochondria. The results were expressed as percentage of cell viability against the DMSO.

### *2.7. Annexin V/PI flow cytometric staining technique*

Apoptotic or necrotic cells were quantified by annexin V-FITC-propidium iodide (PI) kit of double staining, in accordance with the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). The T24 cells seeded in 6-well plates at  $2 \times 10^4$  cells per well were maintained for three days to adhere. After reaching semi-confluence, cells were treated with 50, 100 or 150  $\mu\text{g/mL}$  of QAPF for 48 h in culture medium conditions. At the end of the treatment, the medium and the cells were harvested and centrifuged  $400 \times g$  for 6 min. Cells were suspended in cold PBS (pH 7.4) and were counted. A quantity of  $1 \times 10^6$  cells were centrifuged and suspended in binding buffer containing FITC-conjugated annexin V and PI. The samples were incubated for 15 min in dark at room temperature, before analysis by flow cytometer. The quantification of apoptotic or necrotic cells was screened by dual-color flow cytometry technique using a FACScan cytometry system (FACS Calibur, BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). The data obtained were analyzed with FLOWJO (flow cytometry analysis software).

### *2.8. Cell cycle analysis*

T24 cell line was plated in 6-well plate at  $2 \times 10^4$  per well and incubated three days to adhere. After reaching semi-confluence, cells were treated with 50, 100 or 150  $\mu\text{g/mL}$  of QAPF for 48 or 72 h. At the end of the treatment, the medium and the cells were harvested and centrifuged  $400 \times g$  for 6 min. Cells were suspended in PBS (pH 7.4) and were counted. A quantity of  $1 \times 10^6$  cells were fixed with 70% ethanol and

maintained at -20 °C. At the day of analysis, the fixed cells were then washed with PBS prior to staining. PBS containing 50 µg/mL of propidium iodide and 100 µg/mL of RNase was added to the sample for 30 min in the dark. Control cultures were treated with DMSO. Finally, the cells were analyzed using flow cytometry technique using a FACS Calibur cytometry system (FACS Calibur, BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). The data obtained were analyzed with FLOWJO (flow cytometry analysis software).

### *2.9. Ecto-5'-nucleotidase activity*

To determine the ecto-5'-nucleotidase activity, the 24-well plates containing bladder cancer cell lines, previously treated, were washed three times with phosphate-free incubation medium in the absence of substrate. The enzymatic reaction was started by the addition of 200 µL of incubation medium containing 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4 and 2 mM of AMP as substrate, at 37 °C. After 30 min of incubation the reaction was stopped, withdrawing an aliquot of the reaction medium, which was transferred to eppendorf tubes containing trichloroacetic acid (5%, w/v), previously placed on ice. The inorganic phosphate (Pi) released was measured by the malachite green method (Chan et al., 1986), using KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as a Pi standard. Controls to determine the non-enzymatic Pi release were performed by incubating the cells in the absence of the substrate and incubating the substrate in the absence of cells. All samples were run in triplicate.

### *2.10. Protein determination*

After the enzymatic assay, cells in the 24-well plates were dried and solubilized with 100 µL NaOH 1.0 M and frozen overnight at -20 °C. An aliquot was then removed

and the protein was measured by the Coomassie blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

### *2.11. Western blot assay*

Western blots were used to analyze the immunocontent of various proteins. After treatment for 48 or 72 h with 5, 10, 25, 50, 100 or 150 µg/mL of QAPF, cells were lysed in 4% sodium dodecylsulfate (SDS), 2 mM EDTA, 50 mM Tris buffer. Aliquots were taken for protein determination (Peterson, 1979) and β-mercaptoethanol (Sigma Chemical) was added to a final concentration of 5%. Appropriate amounts of protein (50 or 75 µg per lane) were resolved on 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry transfer apparatus (Bio- Rad, Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20, pH 7.4) and then incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody dissolved in the blocking solution. Primary antibodies against the following proteins were used: pERK42/44 (1:1000), ERK42/44 (1:1000), PTEN (1:1000), COX-1(1:1000), COX-2 (1:600) and anti-β-actin (1:1000). Next, they were washed and incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at 1:1000 dilution. Chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was detected using X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). The films were scanned and analyzed using the Optiquant software (Packard Instrument).

### 2.12. Statistical analysis

All experiments were performed at least three times in triplicate. With exception of the Western blot experiments, where the results were expressed as mean  $\pm$  SEM, all other results were expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* test, using a *GraphPad Prism Software*. The differences were considered significant in relation to the DMSO when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Anti-proliferative effect of crude extract of *Uncaria tomentosa* in T24 human bladder cancer cell line

Considering that numerous studies have shown that *Uncaria tomentosa* presents anti-inflammatory (Allen-Hall et al., 2010), antiviral activities (Aquino et al., 1989) and also inhibits the proliferation of certain cancer cells (De Martino et al., 2006; Pilarski et al., 2007; Pavei, 2010), we first investigated the anti-proliferative effect of the crude extract of *Uncaria tomentosa* in the proliferation of T24 human bladder cancer cell line. Cells were exposed to different concentrations of crude extract for 24 or 48 h. The cell count showed that the cell number was significantly decreased ( $52.02\% \pm 13.83$ ) at the highest concentration tested ( $150 \mu\text{g/mL}$ ), but only after 48 h of treatment (Fig. 1A and B).

### 3.2. Anti-proliferative effect of fractions of *Uncaria tomentosa* in human T24 bladder cancer cell line

Since the highest dose of crude extract resulted in significant decrease in the cell number when compared to the DMSO control, we decided to investigate whether the

oxindole alkaloids purified fraction (OAPF) and quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) of *Uncaria tomentosa* would be able to more effectively inhibit the proliferation of this cell line. Therefore, cells were exposed to OAPF or QAPF of *Uncaria tomentosa* in the same concentrations used to crude extract, for 24, 48 or 72 h. As shown in Fig. 2 (A), OAPF that is considered to have the most relevant biological activities of *Uncaria tomentosa* did not show significant changes in cell number in any of the times and concentrations tested. Surprisingly, the QAPF was able to significantly inhibit the T24 cell number. We found that 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$  of QAPF inhibit significantly the cell number after treatment for 24 h ( $27.93\% \pm 9.5$  and  $39.1\% \pm 3.98$ , respectively), 48 h ( $58.5\% \pm 8.68$  and  $68.5\% \pm 6.24$ , respectively) and 72 h ( $69.8\% \pm 4.34$  and  $85.3\% \pm 5.59$ , respectively). Further, after 72 h of treatment, significant effect was observed at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  with inhibition of  $37.2\% (\pm 7.96)$  (Fig. 2B).

### 3.3. Anti-proliferative effect of QAPF in RT4 human bladder cancer cell line

Considering that only the QAPF showed anti-proliferative effect on T24 cell line, we decided to evaluate whether this fraction would have similar effect in RT4 cell line, used as a model of superficial bladder cancer. A significant growth inhibition effect was observed at concentrations of 50, 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$  indicating that QAPF exerts a similar effect on RT4 human bladder cancer cell line (Fig. 3). In 24 h, it was found a reduction of  $35.03\% (\pm 16.31)$  at the highest concentration. In 48 h, QAPF was able to inhibit  $53.15\% (\pm 8.03)$  and  $60.97\% (\pm 14.17)$  at 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. When the cells were treated with the three higher concentrations (50, 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$ ) for 72 h, the inhibitory effect was observed in all these periods of treatment with an inhibition of  $42.97\% (\pm 25.77)$ ,  $53.83\% (\pm 4.82)$  and  $60.33\% (\pm 3.35)$ ,



respectively. However, the IC<sub>50</sub> values for T24 were lower than in RT4 cells in all periods (Table 2).

### 3.4 QAPF decrease the cell viability in T24 and RT4 bladder cancer cell line

Next, we evaluated the effect of the treatment with QAPF on cell viability by MTT. The results show that QAPF significantly decreased cell viability, following the same profile observed in the cell proliferation for both cell lines. At the same concentrations (50, 100 and 150 µg/mL), QAPF treatment also reduced the cell viability (Fig. 4A and B). Based on these informations, we selected the T24 cell line, the same doses and the time period of 48 and 72 h for further experiments.

### 3.5. Identification of cell death induced by QAPF

Previous works demonstrate that *Uncaria tomentosa* induces apoptosis through activation of caspases (Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009) or by inhibiting the activation of the transcription factor NF-κB (Allen-Hall et al., 2010). So, we decided to investigate the cell death of T24 human bladder cancer cell line treated with QAPF. Cells treated with 50, 100 or 150 µg/mL for 48 h were examined by annexin V and PI staining using flow cytometry. As shown in Fig. 5, the percentage of viable cells was reduced from 87.14% to 77.19% and, consequently, the percentage of early apoptotic cells increasing from 4.01% to 15.06% after this treatment. These results indicate that QAPF of *Uncaria tomentosa* inhibits cell proliferation and also induces apoptosis in T24 human bladder cancer cell line.

### *3.6. QAPF does not induce cell cycle arrest at 48 and 72 h*

Considering that QAPF induces inhibition of cell growth in T24 human bladder cancer line, we decided to assess whether this inhibition could be due to a blockade in cell cycle progression. To explore this possibility, T24 cells were treated with 50, 100 or 150  $\mu\text{g/mL}$  of QAPF for 48 or 72 h. After the treatments, cells were fixed and stained with propidium iodide. Flow cytometry analysis showed that QAPF did not alter the distribution of the DNA content neither in 48 h (Fig. 6) nor in 72 h (data not shown).

### *3.7. Ecto-5'-NT/CD73 and A3 adenosine receptor are not involved in the effects of QAPF on cell death of T24 cells*

As previously described by our group, T24 cells have high activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 (Stella et al., 2009); and considering the involvement of purinergic signalling in progression of bladder cancer, we questioned whether QAPF would be able to inhibit the activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73. Cells were treated with QAPF (25, 50, 100 or 150  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h and then incubated with substrate AMP. Moreover, to assess the direct effect, cells were simultaneously incubated with AMP and the same concentrations of QAPF, for 10 min, and the enzymatic activity was assessed. Statistical analysis revealed no change in the enzyme activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 when T24 cell line were treated with QAPF to assess the direct effect (Fig. 7A) and the treatment effect after 48 h (Fig. 7B).

Since A3 adenosine receptor has been strongly associated with MAPK pathways, which are known to be involved in cell survival and proliferation (Kim et al., 2010), we decided to verify the effect of A3 adenosine receptor antagonist (MRS 1220) in the QAPF-mediated inhibition of T24 cell line proliferation. Therefore, in an attempt to evaluate the involvement of this receptor, the culture cell was treated with 1 mM

MRS 1220 for 30 min prior to treatment with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de QAPF for 24 or 48 h. At the end of the treatment, we can observe that this antagonist did not change the anti-proliferative effect induced for the QAPF neither in 24 h (Fig. 8A) nor in 48 h (Fig. 8B).

### 3.8. *QAPF does not alter the PTEN and ERK immunocontent*

It is well described that ERK is involved in controlling a variety of cellular processes such as proliferation and differentiation, which occur via activation of nuclear transcription factors that lead to the expression of genes involved in cell growth (Neary et al., 1999; Meller et al., 2002). In order to investigate the involvement of signal transduction pathways in QAPF-induced apoptosis of bladder cancer cell, the phosphorylation/activation of ERK was analyzed by Western blot. As shown in figure 9 A, no significant change in ERK phosphorylation/activation was detected after the treatment with QAPF for 48 h. In 72 h (data not shown) also no change in ERK phosphorylation/activation was detected.

Deletions in the tumor suppressor gene PTEN have been found in a significant proportion (24-58%) of invasive bladder cancers (Knowles et al., 2009). So, considering that the PTEN is functionally deficient in T24 cell (Gildea et al., 2004), we decided to evaluate if the QAPF would be able to increase the immunocontent of this protein in T24 cell line. The results indicate that the inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in T24 human bladder cancer cell line was not due to alteration in immunocontent of PTEN, which was not affect by the treatment for 48 h (Fig. 9B). In 72 h also no change in PTEN immunocontent was detected (data not shown).

### 3.9. QAPF downregulate COX-2 in T24 cell

Cyclooxygenase (COX) 1 is constitutively expressed in a wide range of tissues, while cyclooxygenase (COX) 2 is an inducible enzyme in the tissues exposed to stimuli like cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ), growth factors (EGF, PDGF), tumor promoters and tobacco carcinogens (Shirahama, 2000; Méric et al., 2006; Huang, Chen, 2011). Considering that COX-2 promotes tumor growth by inhibition of cell apoptosis, stimulation of angiogenic development and metastatic processes (Méric et al., 2006), we were interested in determining whether QAPF could also affect the COX-2 immunocontent after treatment with different concentrations for 48 or 72 h. As observed in Fig. 10 the immunocontent of the COX-2 protein was higher in the vehicle group T24 cells than in treated cells, demonstrating that QAPF treatment resulted in a significant decrease at COX-2 immunocontent even at concentration of 25  $\mu$ g/mL (54%) after 48 h of treatment. After 72 h, we could observe that QAPF was able to inhibit the COX-2 immunocontent at concentration of 10  $\mu$ g/mL (65.69%) (Fig. 11). At the higher concentration tested (150  $\mu$ g/mL) the percentage of inhibition was 73.18% and 80.94% for 48 h and 72 h, respectively. These results suggested that COX-2 pathway is involved in the QAPF -induced cell growth inhibition. Additionally, the COX-1 immunocontent was also investigated in T24 cells, but its immunocontent was not detectable (data not shown).

## 4. Discussion

For centuries, medicinal plants represented the main source of therapeutic agents for humans (Hostettmann et al. 2003), and it was estimated that approximately 40% of medicines available in modern medical treatment have been developed from natural sources (Yunes, Calixto, 2001). The information obtained from population constitute

strategies for investigation of medicinal plants, since approximately 75% of the compounds used in the pharmaceutical industry were isolated following a claim given therapeutic effect in humans (Yunes, Calixto, 2001). Due to various side effects of therapeutic drugs, several studies try to find more effective natural drugs with lower toxicity (Ma et al., 2006). Based on these evidences, this study focused on the antitumor effect of fractions of *Uncaria tomentosa*, especially the quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) in human bladder cancer cell lines.

Bark and roots of *Uncaria tomentosa* are widely used in the traditional medicine and the standardization of commercial formulations of this plant is based on their alkaloidal content (Sandoval et al., 2002). Several groups have related that most biological actions of *Uncaria tomentosa* are related to alkaloid constituents (Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009). Considering this, and considering that crude extract was able to decrease the T24 cell number after 48 h of treatment (Fig. 1), we have investigated the cell proliferation in T24 human bladder cancer line, using oxindole alkaloids purified fraction (OAPF) and quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) as treatment. Surprisingly, the OAPF did not change the cell proliferation (Fig. 2A), while the QAPF significantly inhibit T24 cell lines (Fig. 2B). The same profile was found to RT4, when the cells were treated with QAPF (Fig. 3). Since only the QAPF demonstrate potential to inhibit the cell proliferation, we decided to evaluate the cell viability of these cell lines when treated with this fraction. The results showed that QAPF inhibited the T24 cells viability even at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by 48 h (Fig. 4A). This is consistent with previous studies that have showed the ability of *Uncaria tomentosa* to inhibit the growth in a variety of tumor cell lines (Sheng et al., 1998; Riva et al., 2001; De Martino et al., 2006; Pilarski et al., 2010).

Contradictory to many studies, our results are consistent with the study by Sandoval et al. (2002), which demonstrated that the alkaloids content did not influence the antioxidant and anti-inflammatory properties of cat's claw. In the study conducted by Sandoval et al. (2002), the biological actions of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* were compared. In *Uncaria guianensis*, which is less studied, the alkaloidal content was almost negligible when compared to *Uncaria tomentosa*. Interestingly, *Uncaria guianensis* showed more effective biological actions, showing that probably the alkaloidal constituents are not responsible for the observed actions. Another recent study also wondered about the veracity of the association among anticancer activity of *Uncaria tomentosa* and its alkaloidal content (Pilarski et al., 2010). Based on our experimental results and on literature data, probably other phytochemicals, as the quinovic acid glycosides, are also responsible for *Uncaria tomentosa* pharmacological actions, acting alone or in association.

Next, we have demonstrated that QAPF-induced cell death in T24 cells (150  $\mu\text{g/mL}$ ) occurred by apoptosis (Fig. 5), which is also in accordance with literature data (De Martino et al., 2006; Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009). Furthermore, some studies indicate that *Uncaria tomentosa* induces an arrest of the cell cycle in the G0/G1 or G2/M phases, depending on the extract, fraction or isolated compound used (Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009; Pilarski et al., 2010); and others demonstrated that *Uncaria tomentosa* did not induce arrest in cell cycle (Akesson et al., 2003; Pilarski et al., 2010). In agreement with these two last studies, we demonstrated that QAPF does not induce arrest in the cell cycle (Fig. 6). Probably the arrest in cell cycle was not found in present work since we used a purified fraction containing only quinovic acid glycosides (Table 1), differently of other researches that used alkaloidals fraction, isolated alkaloidal or different crude extracts of *Uncaria tomentosa*. In addition, direct

comparisons between studies are very difficult, since the composition of the extracts may vary by extraction method, resulting in different cellular responses. There is still the issue of regional and seasonal variability of the plant (Allen-Hall et al., 2010; Pilarski et al., 2010). Moreover, it is important to note that in most cases, the tumor cells response to a cytotoxic drug can be a cell cycle arrest, which is considered one of the most frequent reasons of the ineffectiveness of chemotherapy since the cancer cell continues its proliferation even after drug withdrawal. Based on this, currently studies have focused on the discovery of drugs that selectively induce apoptosis in cells that are replicating (Cheng et al., 2007; Pilarski et al., 2010). Taken together, these preliminary results suggest that cell toxicity of QAPF on T24 cells may be caused by apoptotic death and not by cell cycle arrest.

Ecto-5'-nucleotidase/CD73 is an extensively distributed enzyme and with high expression in many solid tumors. It is responsible to catalyze the hydrolysis of extracellular nucleoside monophosphates (AMP) to adenosine (Zimmermann, 1992; Spychala, 2000). In addition to its catalytic function it appears to be involved with the adhesion, in promoting tumor invasiveness and in the development of cancer (Sadej et al., 2006; Zhou et al., 2007; Bavaresco et al., 2008). Stella et al. (2009) demonstrated that ecto-5'-nucleotidase/CD73 is probably involved in the tumorigenesis of bladder cancer, as it was seen in other tumor cells. Thinking on that, we evaluated by the direct effect and the treatment effect after 48 h if the QAPF would be able to alter the ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity. None of the concentrations tested, at any time or conditions of treatment was able to alter the enzyme activity, excluding, therefore, its involvement in the death of T24 tumor cells (Fig. 7A and B).

Cell death can be induced through certain cell surface receptors (Ashkenazi, Dixit, 1998). It is reported that adenosine receptors can act as mediators of

angiogenesis, proliferation and may suppress the anticancer immune response (Spychala, 2000). Moreover, it is demonstrated that A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor cells, and depending on its activation, it has been associated with pro- or anti-apoptotic events and in cell cycle regulation. Thus, the A3 adenosine receptor has been considered as a potential target of cancer therapies, where both agonists and antagonists represent possible anticancer therapeutic agents (Kim et al., 2010). Within this context, we verified the involvement of A3 adenosine receptor in the QAPF -mediated inhibition of T24 cells proliferation. Our results have denoted that the A3 adenosine receptor antagonist, MRS1220, did not change the anti-proliferative effect provoked by QAPF at any time evaluated (Fig. 8A and B). So, these results rule out the involvement of the ecto-5'-nucleotidase/CD73 and the A3 receptor in the death of T24 tumor cell induced by QAPF.

In the development and progression of bladder cancer, multiple gene alterations are involved (Tanaka et al., 2000). PTEN, a tumor-suppressor gene, is a multifunctional phosphatase that antagonizes the PI3K pathway by dephosphorylation of its end product, the PIP3, being considered the most important regulatory step of this pathway (Wu et al., 2004; Saal et al., 2007; Knowles et al., 2009). Recent studies have demonstrated that reduced PTEN expression is common in bladder cancer (Knowles et al., 2009). Within this context, we verified whether apoptosis induced by QAPF in T24 cell line could be due to increase the immunocontent of PTEN. Our results have indicated that there was no change in PTEN immunocontent, indicating that this pathway is not involved in the inhibition of T24 growth, 48 h (Fig. 9B) or 72 h (data not shown) after treatment.

Another protein that we were interested to investigate was the extracellular signal-regulated kinase (ERK). Recently, it has been shown that the deregulation of the



ERK cascade results in several diseases, where mutations of the upstream components of ERK are responsible for more than half of all cancers (Wortzel, Seger, 2011). Analysis of Western blot showed that QAPF treatment is not able to change the phosphorylation/activation of this protein (Fig. 9A). So, this pathway also is not involved in the apoptosis induced by QAPF. Moreover, ERK can phosphorylate many proteins involved in cell cycle regulation (McCubrey et al., 2007) and when activated, promotes cell cycle arrest by induce p21 (Tang et al., 2002). In this view, considering that QAPF does not cause cell cycle arrest and that the immunocontent of ERK was not altered, these data are also confirmed.

Currently is clear that overexpression of COX-2 is a common feature in various tumors, including the bladder cancer (Méric et al., 2006; Huang, Chen, 2011). Numerous preclinical studies recently are demonstrating promising results with combination treatments of either chemotherapy or radiotherapy with COX inhibitors (Shimada et al., 2011). Considering that these studies encourage the use of COX inhibitors as anticancer therapy, we decided evaluate the potential possible of QAPF in inhibit the COX-2 protein. Our results indicated that QAPF have a great potential to inhibit the immunocontent of COX-2 in lower concentrations after 48 h (Fig. 10) and 72 h (Fig. 11) treatment, in the T24 human bladder cancer. Considering that smoking is a major risk factor for the development of bladder cancer, it is important to known that smoking has been shown to induce COX-2 immunocontent in a variety of cells, suggesting its influence on the progression of this cancer. Smoking can also induce the expression of the COX-2 gene regulator NF- $\kappa$ B, and changes in NF- $\kappa$ B downstream products like VEGF, MMP-9 and cyclin D1 have been linked with proliferation, angiogenesis, invasion and cell cycle in bladder cancer (Huang, Chen, 2011). So, the inhibition of these factors by use of selective COX-2 inhibitors is very important to

decrease the tumor growth. Thus, we assume that apoptosis activation by QAPF in T24 cells might be mediated through inhibition of COX-2, since many experimental studies have demonstrated the positive relationship between the overexpression of COX-2 and inhibition of apoptosis (Méric et al., 2006). In this way, it is important to evaluate the immunoccontent of cytoplasmic and nuclear NF- $\kappa$ B to verify if the QAPF would be able also to alter its immunoccontent, since this protein can induces the immunoccontent of COX-2 and a consequently inhibition of NF- $\kappa$ B can reduce the COX-2 immunoccontent (Lou et al., 2010). Nevertheless, further studies are necessary to give support to this hypothesis, since previous study has demonstrated that *Uncaria tomentosa* ethanolic extract was able to inhibit the activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B (Allen-Hall et al., 2010).

In summary, among all of the alternative mechanisms investigated, the present study demonstrated that QAPF, and not OAPF, have a great potential to inhibit the proliferation and the viability of T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. In T24 cells, QAPF induced apoptosis by the expressive inhibition of COX-2. Although further investigation of the exact molecular mechanism involved in apoptosis induced by QAPF is necessary, we hypothesized that the strong inhibition of COX-2 is due to an inhibition of NF- $\kappa$ B, which is upstream protein to COX-2 and also can promote apoptosis. So the next step is to study the NF- $\kappa$ B. Taken together, these results here presents imply that QAPF from *Uncaria tomentosa* may be a potential therapeutic agent in cancer treatment.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (Capes). F. Dietrich, L. Rockenbach, F. Figueiró and F. M. Cunha were recipients of CNPq fellowships. S. Kaiser was recipients of Capes fellowships. We thank L.R. Blazina for her technical assistance.

## References

- Akesson, C., Lindgren, H., Pero, R.W., Leanderson, T., Ivars, F., 2003. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- $\kappa$ B activity without inducing cell death. *International Immunopharmacology* 3, 1889-1900.
- Allen-Hall, L., Arnason, J.T., Cano, P., Lafrenie, R.M., 2010. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 685–693.
- Aquino, R., De, S.F., Pizza, C., Conti, C., Stein, M.L., 1989. Plant metabolites. Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovis acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products* 52, 679-685.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Bacher, N., Tiefenthaler, M., Sturm, S., Stuppner, H., Ausserlechner, M.J., Kofler, R., Konwalinka, G., 2005. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 132, 615-622.
- Bavaresco, L., Bernardi, A., Braganhol, E., Cappellari, A.R., Rockenbach, L., Farias, P.F., Wink, M.R., Delgado-Cañedo, A., Battastini, A.M.O., 2008. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 319, 61-68.

Borré, G.L., 2010. Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Dissertation.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Burnstock, G., 2004. Introduction: P2 receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 793-803.

Burnstock, G., 2011. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. *British Journal of Urology International* 107, 192-204.

Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375-380.

Cheng, A.C., Jian, C.B., Huang, Y.T., Lai, C.S., Hsu, P.C., Pan, M.H., 2007. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome *c* release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2206-2218.

De Martino, L., Martinot, J.L.S., Franceschelli, S., Leone, A., Pizza, C., De Feo, V., 2006. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 91-94.

Gildea, J.J., Herlevsen, M., Harding, M.A., Gulding, K.M., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Theodorescu, D., 2004. PTEN can inhibit *in vitro* organotypic and *in vivo* orthotopic invasion of human bladder cancer cells even in the absence of its lipid phosphatase activity. *Oncogene*, 23, 6788-6797.

- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66, 89-98.
- Herr, H.W., Wartinger, D.D., Fair, W.R., Oettgen, H.F., 1992. Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: a 10-year followup. *The Journal of Urology* 147,1020-1023.
- Hostettmann, K., Queiroz, E.F., Viera, P.C., 2003. *Princípios ativos de plantas superiores*. São Paulo: EdUFSCar.
- Huang, R.Y., Chen, G.G., 2011. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1815, 158-169.
- Jacobs, B.L., Lee, C.T., Montie, J.E., 2011. Bladder Cancer in 2010: How far have we come? *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60, 244-272.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E., 2010. Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 60, 277-300.
- Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P., Teppner, H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 23-34.
- Kim, H., Kang, J.W., Lee, S., Choi, W.J., Jeong, L.S., Yang, Y., Hong, J.T., Yoon, D.Y., 2010. A3 adenosine receptor antagonist, truncated Thio-Cl-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. *Anticancer Research* 30, 2823-2830.
- Knowles, M.A., Platt, F.M., Ross, R.L., Hurst, C.D., 2009. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Review* 28, 305-316.

Lamm, D.L., Thor, D.E., Harris, S.C., Reyna, J.A., Stogdill, V.D., Radwin, H.M., 1980. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *The Journal of Urology* 124, 38-40.

Lou, G.G., Yao, H.P., Xie, L.P., 2010. *Brucea javanica* oil induces apoptosis in T24 bladder cancer cells via upregulation of caspase-3, caspase-9, and inhibition of NF- $\kappa$ B and COX-2 expressions. *The American Journal of Chinese Medicine* 38, 613-624.

Ma, L., Feugang, J.M., Konarski, P., Wang, J., Lu, J., Fu, S., Ma, B., Tian, B., Zou, C., Wang, Z., 2006. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. *Frontiers in Bioscience* 11, 2275-2285.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Franklin, R.A., 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1263-1284.

Meller, R., Skradski, S.L., Simon, R.P., Henshall, D.C., 2002. Expression, proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis. *Neuroscience Letters* 324, 33-36.

Memon, A.A., Chang, J.W., Oh, B.R., Yoo, Y.J., 2005. Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression. *Cancer Detection and Prevention* 29, 249-255.

Méric, J.B., Rottey, S., Olausson, K., Soria, J.C., Khayat, D., Rixe, O., Spano, J.P., 2006. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 59, 51-64.

Neary, J.T., Kang, Y., Bu, Y., Yu, E., Akong, K., Peters, C.M., 1999. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-

independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *The Journal of Neuroscience* 19, 4211-4220.

Nguyen-Khuong, T., White, M.Y., Hung, T.T., Seeto, S., Thomas, M.L., Fitzgerald, A.M., Martucci, C.E., Luk, S., Pang, S.F., Russell, P.J., Walsh, B.J., 2009. Alterations to the protein profile of bladder carcinoma cell lines induced by plant extract MINA-05 *in vitro*. *Proteomics* 9, 1883-1892.

Ozawa, A., Tanji, N., Kikugawa, T., Sasaki, T., Yanagihara, Y., Miura, N., Yokoyama, M., 2009. Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor. *British Journal of Urology International* 1-6.

Pavei, C., 2010. Obtenção e avaliação de frações purificadas e farmacologicamente ativas presentes em *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC. (unha-de-gato). Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. PhD thesis.

Pavei, C., Kaiser, S., Verza, S.G., Borré, G.L., Ortega, G.G., 2012. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis in press*.

Peterson, G.L., 1979. Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100, 201-220.

Pilarski, R., Poczekaj-Kostrzewska, M., Ciesiolka, D., Szyfter, K., Gulewicz, K., 2007. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports* 59, 565-572.

Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kurás, M., Gulewicz, K., 2010. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine* 17, 1133-1139.

Pollito, P.A.Z., Tomazello, M., 2006. Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) do estado do Acre, Brasil. *Acta Amazônica*. 36, 1-21.

Rinner, B., Li, Z.X., Haas, H., Siegl, V., Sturm, S., Stuppner, H., Pfragner, R., 2009. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Research* 29, 4519-4528.

Riva, L., Coradini, D., Di Fronzo, G., De Feo, V., De Tommasi, N., De Simone, F., Pizza C., 2001. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Research* 21, 2457-2462.

Saal, L.H., Johansson, P., Holm, K., Gruyberger-Saal, S.K., She, Q.B., Maurer, M., Koujak, S., Ferrando, A.A., Malmstro, P., Memeo, L., Isola, J., Bendahl, P.O., Rosen, N., Hibshoosh, H., Ringne, M., Borg, A., Parsons, R., 2007. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7564-7569.

Sadej, R., Sychala, J., Skladanowski, A.C., 2006. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Research* 16, 213-222.

Sandoval, M., Okuhama, N.N., Zhang, X.J., Condezo, L.A., Lao, J., Angeles, F.M., Musah, R.A., Bobrowski, P., Miller, M.J.S., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325-337.



Sheng, Y., Pero, R.W., Amiri, A., Bryngelsson C., 1998. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Research* 18, 3363-3368.

Shimada, K., Anai, S., Marco, D.A., Fujimoto, K., Konishi, N., 2011. Cyclooxygenase 2-dependent and independent activation of Akt through casein kinase 2 $\alpha$  contributes to human bladder cancer cell survival. *BioMed Central Urology* 8, 1-11.

Shirahama, T., 2000. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. *Clinical Cancer Research* 6, 2424-2430.

Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC.

Spychala, J., 2000. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacology & Therapeutics* 161-173.

Spychala, J., Lazarowski, E., Ostapkowicz, A., Ayscue, L.H., Jin, A., Mitchell, B.S., 2004. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 708-717.

Stella, J., Bavaresco, L., Braganhol, E., Rockenbach, L., Farias, P.F., Wink, M.R., Azambuja, A.A., Barrios, C.H., Morrone, F.B., Battastini, A.M.O., 2009. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urologic Oncology* 28, 260-267.

Syrimis, A., 1999. *Uncaria tomentosa*: A review. *British Journal of Phytotherapy* 5, 29-31.

Swellam, T., Anaga, N.M., Onozawa, M., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., 2003. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer

implantation model: *In vivo* and *in vitro* studies. International Journal of Urology 10, 213-219.

Tanaka, M., Koul, D., Davies, M.A., Liebert, M., Steck, P.A., Grossman, H.B., 2000. MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. Oncogene 19, 5406-5412.

Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahti, J.M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V.J., Mak, T.W., Ingram, A.J., 2002. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. The Journal of Biological Chemistry 277, 12710-12717.

Wortzel, I., Seger, R., 2011. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. Genes Cancer 2, 195-209.

Wu, X., Obata, T., Khan, Q., Highshaw, R.A., De Vere White, R., 2004. Sweeney C. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. British Journal of Urology International 93, 143-150.

Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2001. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos.

Zhou, P., Zhi, X., Zhou, T., Chen, S., Li, X., Wang, L., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., 2007. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. Cancer Biology & Therapy 6, 426-431.

Zimmermann, H., 1992. 5'-Nucleotidase-molecular structure and functional aspects. The Biochemical Journal 345-365.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** Effect of crude extract of *Uncaria tomentosa* on proliferation of T24 human bladder cell line. Semi-confluent cells were treated with crude extract (5, 10, 25, 50, 100

and 150 µg/mL) or DMSO (vehicle group) for 24 and 48 h. (A) T24 human bladder cancer cell line treated with 150 µg/mL for 48 h were observed under phase-contrast microscopy (100x) (B) Following, cells were detached with 0.05% trypsin-EDTA and counted in a haemocytometer. The values represent the means of three (24 h) and five (48 h) independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc. \*\*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.001$ ).

**Figure 2.** Effect of oxindole alkaloids purified fraction (OAPF) and quinovic acid glycosides purified fraction (QAPF) of *Uncaria tomentosa* on proliferation of T24 human bladder cancer cell line. Semi-confluent cells were treated with OAPF (A) or QAPF (B) at concentration 5, 10, 25, 50, 100 and 150 µg/mL or DMSO (vehicle group) for 24, 48 and 72 h. Following, cells were detached with 0.05% trypsin-EDTA and counted in a haemocytometer. The values represent the mean of at least three independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc. \*Significantly different from DMSO ( $p < 0.05$ ). \*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.01$ ). \*\*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.001$ ).

**Figure 3.** Effect of QAPF on proliferation of RT4 human bladder cancer cell line. Semi-confluent cells were treated with QAPF (5, 10, 25, 50, 100 and 150 µg/mL) or DMSO (vehicle group) for 24, 48 and 72 h. Following, cells were detached with 0.05% trypsin-EDTA and counted in a haemocytometer. Data represents the means of three independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc. \*Significantly different

from DMSO ( $p < 0.05$ ). \*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.01$ ). \*\*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.001$ ).

**Figure 4.** Effect of QAPF on cell viability evaluated by MTT assay in cultured T24 (A) and RT4 (B) human bladder cancer cell lines. The cells were grown on 96-well plate and, after reaching the semi-confluence, they were treated with QAPF or DMSO (vehicle group). After 24, 48 and 72 h of treatment, the cell viability was evaluated by MTT assay as described in Materials and methods. The cell viability was represented in relation to DMSO cells. Data represent the means of at least three independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc. \*Significantly different from DMSO ( $p < 0.05$ ). \*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.01$ ). \*\*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.001$ ).

**Figure 5.** Apoptotic effect of QAPF in T24 human bladder cancer cell line. T24 cells were treated with DMSO (vehicle group) or QAPF (50, 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$ ). After 48 h for treatment, cells were double-stained with annexin V and PI and analyzed by flow cytometry as described in Material and methods. The gate setting distinguish between live (bottom left), necrotic (top left), early apoptotic (bottom right) and late apoptotic (top right) cells. Data are from three independent experiments and the graphs shown refer to a representative experiment.

**Figure 6.** Effect of QAPF on cell cycle distribution of T24 human bladder cancer cell line. T24 cells were treated with DMSO (vehicle group) or QAPF (50, 100 and 150  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h and its content was analyzed by flow cytometry as described in

Material and methods. Values are the relative number of cells in the subG1, G1, S and G2/M phases of cell cycle. Data are from three independent experiments.

**Figure 7.** Effect of QAPF treatment on the ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in T24 human bladder cancer cell line. (A) Cells at confluence were pre-incubated with QAPF (25, 50, 100 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or DMSO for 10 min. Following, cells were incubated with AMP 2.0 mM for 30 min as described in Material and methods. (B) Semi-confluent cells were treated with QAPF (25, 50, 100 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or DMSO (vehicle group) for 48 h. Soon after cells were incubated with AMP 2.0 mM for 30 min as described in Material and methods. Specific activity values were expressed as nmol Pi/min/mg of protein. Data represents the mean of three independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc*.

**Figure 8.** Effect of A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonist on T24 cell proliferation inhibition induced by QAPF. T24 cells were treated for 24 h (A) and 48 h (B) with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  QAPF without or pretreated with A<sub>3</sub> antagonist MRS 1220 (1mM). Following, cells were detached with 0.05% trypsin-EDTA and counted in a haemocytometer. Data represent the mean of two independent experiments performed in triplicate  $\pm$  SD. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc*. \* Significantly different from DMSO ( $p < 0.05$ )

**Figure 9.** QAPF does not alter the ERK phosphorylation (A) and PTEN immunocontent (B) in T24 human bladder cancer cell line treated with different concentrations (DMSO, 5, 10, 25, 50, 100 or 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 48 h treatment. Representative Western blot

showing the phosphorylation levels of ERK, and immunocontent of PTEN and  $\beta$ -actin. Quantified band values represent mean  $\pm$  SEM of three experiments normalized to  $\beta$ -actin. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc*.

**Figure 10.** QAPF inhibit COX-2 immunocontent in T24 human bladder cancer cell line treated with different concentrations (DMSO, 5, 10, 25, 50, 100 or 150  $\mu$ g/mL) for 48 h treatment. (A) Representative Western blot showing the immunocontent of COX-2 and  $\beta$ -actin. (B) Quantified band values represent mean  $\pm$  SEM of three experiments normalized to  $\beta$ -actin. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc*. \*Significantly different from DMSO ( $p < 0.05$ ). \*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.01$ ).

**Figure 11.** QAPF inhibit COX-2 immunocontent in T24 human bladder cancer cell line treated with different concentrations (DMSO, 5, 10, 25, 50, 100 or 150  $\mu$ g/mL) for 72 h treatment. (A) Representative Western blot showing the immunocontent of COX-2 and  $\beta$ -actin. (B) Quantified band values represent mean  $\pm$  SEM of three experiments normalized to  $\beta$ -actin. The data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc*. \*Significantly different from DMSO ( $p < 0.05$ ). \*\*Significantly different from DMSO ( $p < 0.01$ ).

## **FIGURES AND TABLES**

**Table 1**

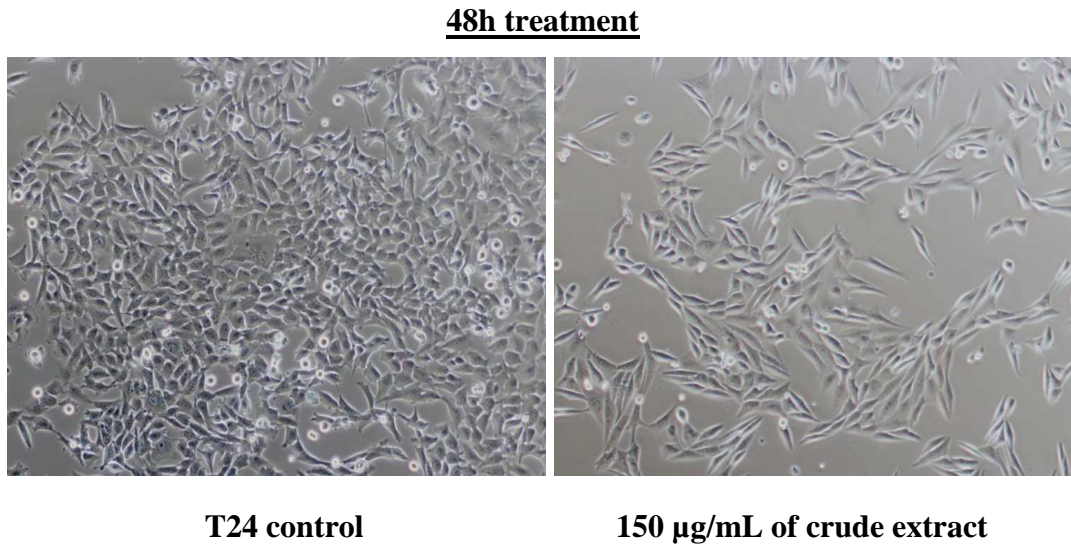
Content of oxindole alkaloids (OAPF) and quinovic acid glycosides (QAPF) in extract and purified fractions obtained from *Uncaria tomentosa*

<b>Compounds</b>	<b>Content mg%</b>		
	$\bar{X} \pm \text{SD}$		
<b>Extract</b>	<b>OAPF</b>	<b>QAPF</b>	
<b>Speciophylline<sup>a</sup></b>	0.31 ± 0.01	1.16 ± 0.10	ND
<b>Uncarine F<sup>a</sup></b>	0.05 ± 0.02	0.28 ± 0.11	ND
<b>Mitraphylline<sup>a</sup></b>	0.17 ± 0.01	0.77 ± 0.03	ND
<b>Isomitraphylline<sup>b</sup></b>	1.00 ± 0.10	0.37 ± 0.04	ND
<b>Pteropodine<sup>a</sup></b>	0.60 ± 0.04	2.48 ± 0.04	ND
<b>Isopteropodine<sup>a</sup></b>	0.30 ± 0.05	12.08 ± 0.22	ND
<b>Total petacyclic oxindole alkaloids<sup>c</sup></b>	1.53 ± 0.19	6.27 ± 0.16	ND
<b>Total quinovic acid glycosides<sup>d</sup></b>	6.78 ± 1.38	ND	21.78 ± 0.46

<sup>a</sup> expressed as mitraphylline; <sup>b</sup> expressed as isomitraphylline; <sup>c</sup> expressed as the sum of individual concentrations; <sup>d</sup> expressed as  $\alpha$ -hederin; ND: not detected

**Figure 1**

**A)**



**B)**

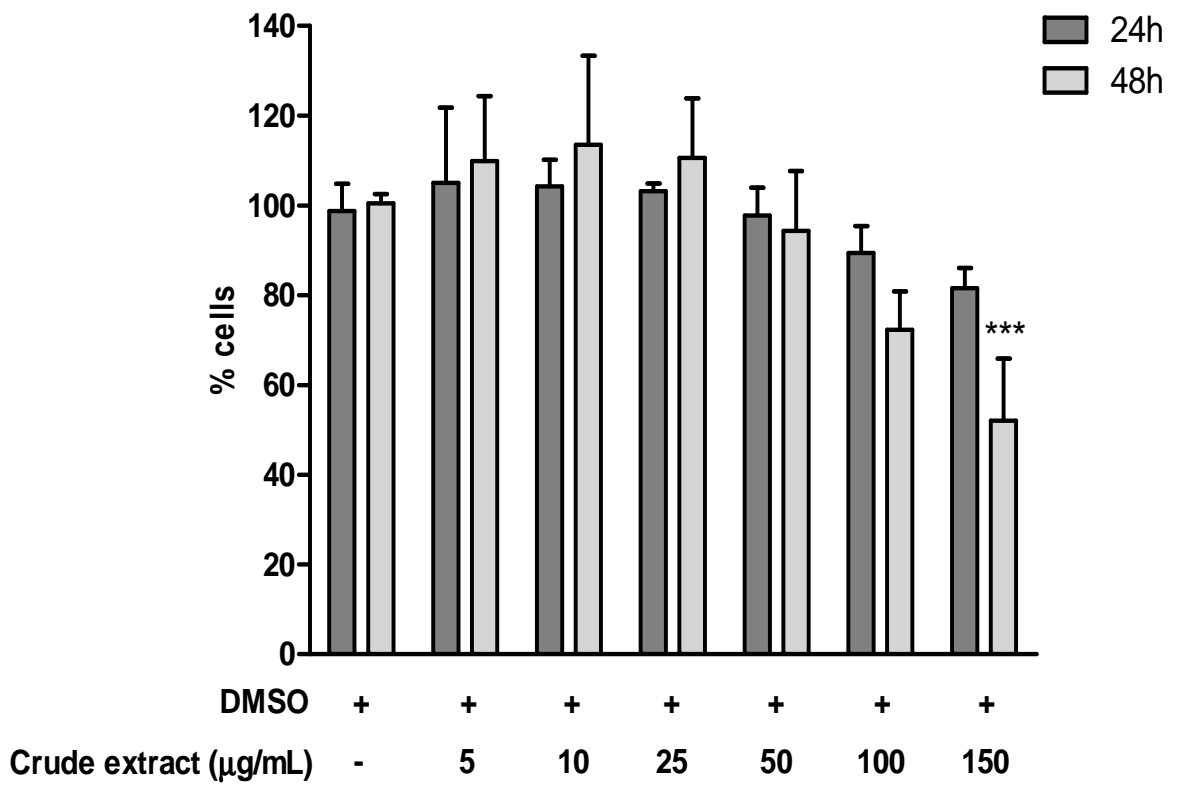
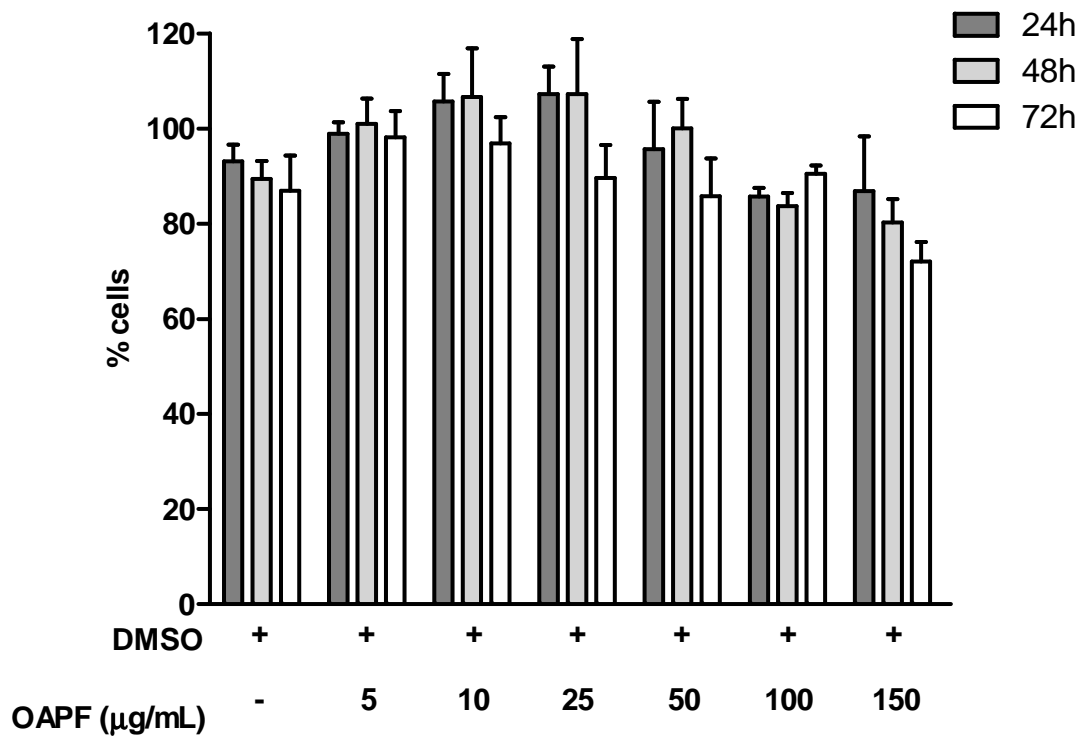




Figure 2

A)



B)

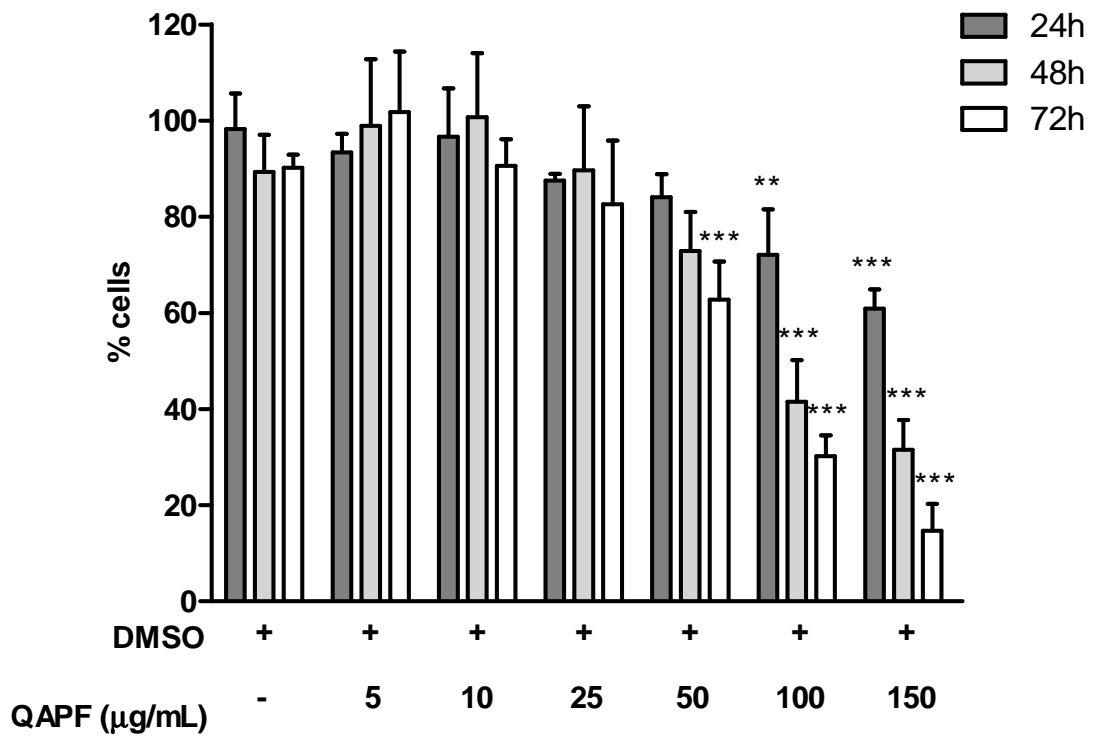
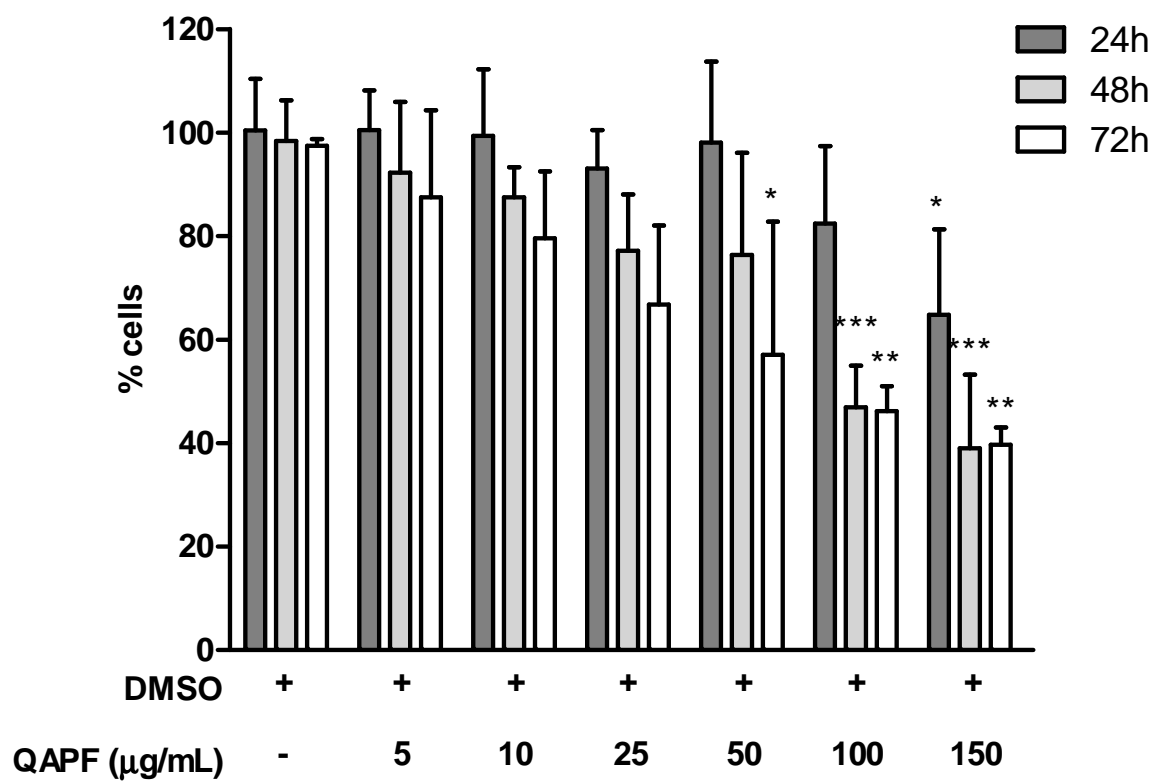


Figure 3



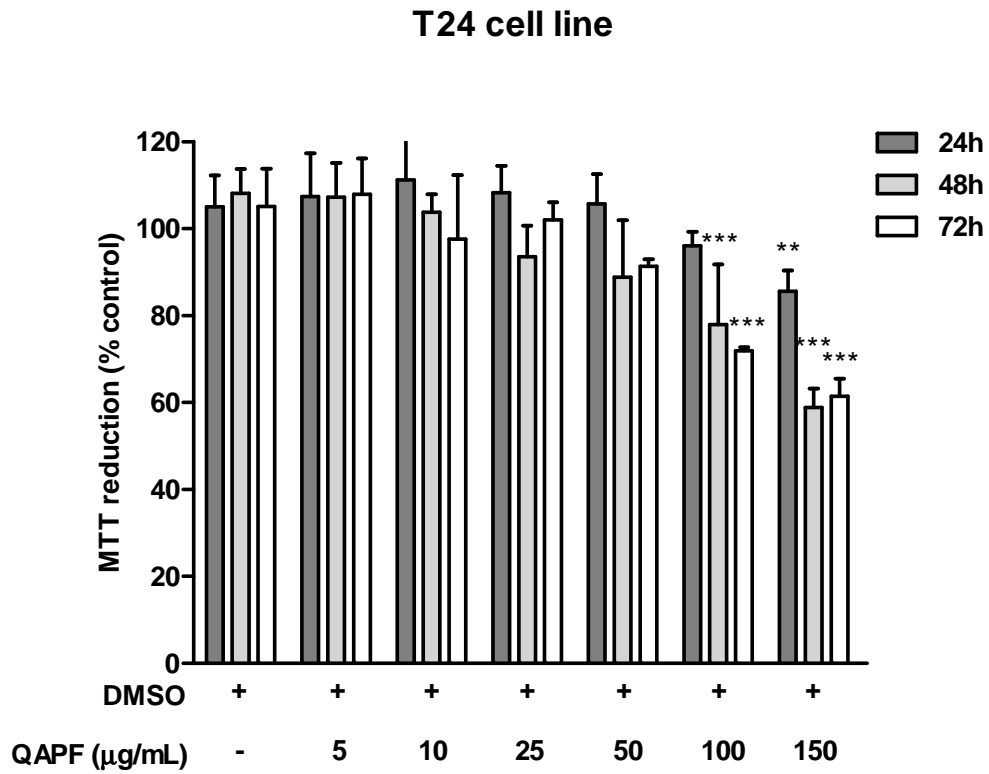
**Table 2**

The IC<sub>50</sub> values of QAPF in T24 and RT4 cells for different treatment times

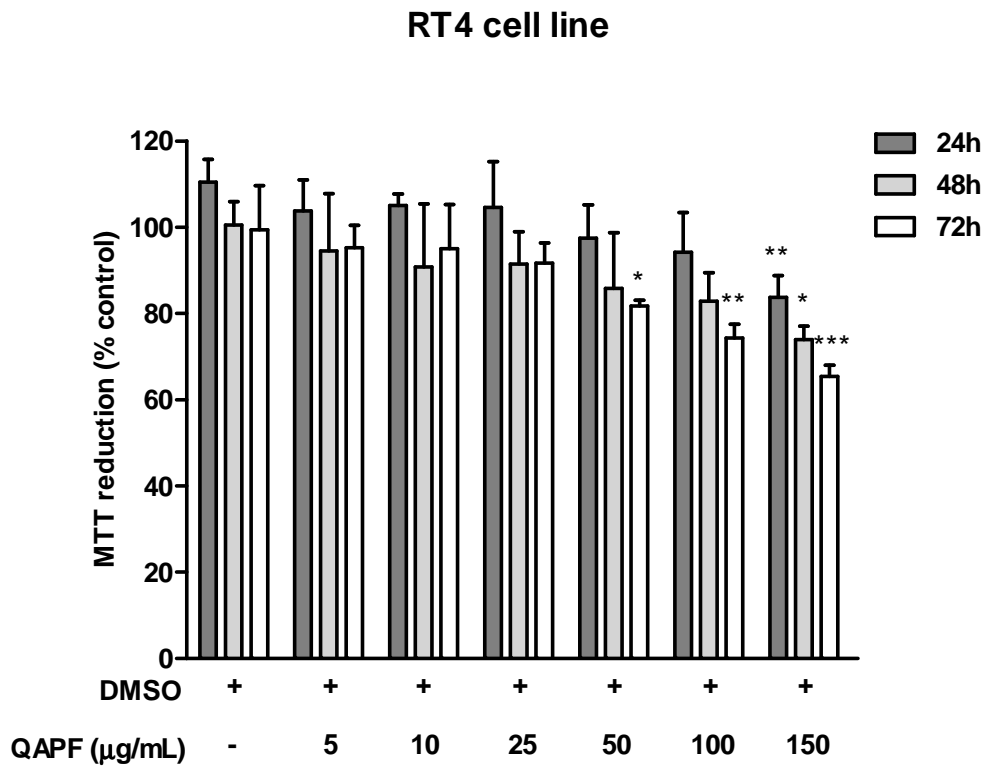
<b>Time (h)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	
	<b>T24</b>	<b>RT4</b>
<b>24</b>	192.80	233.86
<b>48</b>	85.07	109.87
<b>72</b>	78.36	99.41

Figure 4

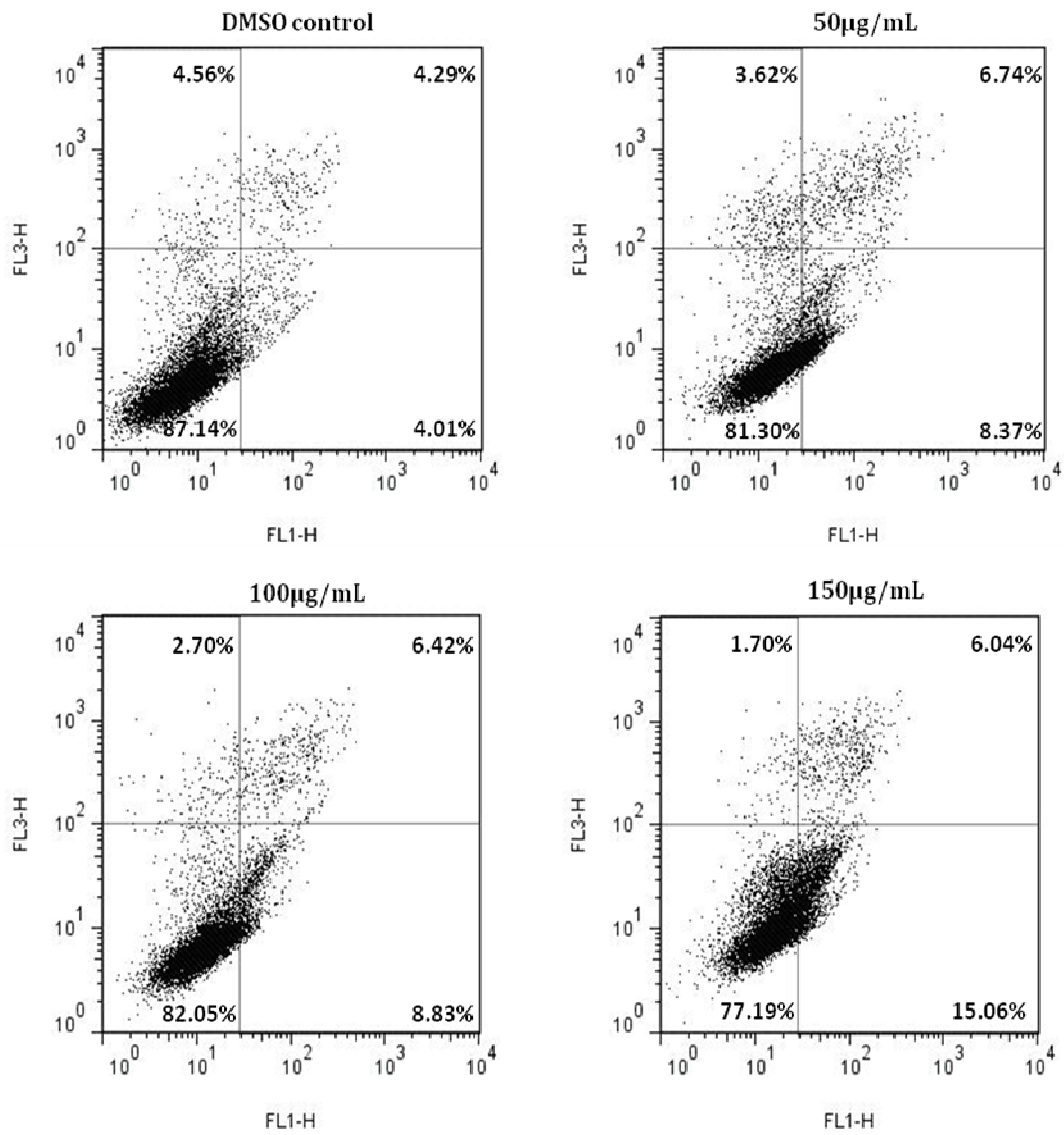
A)



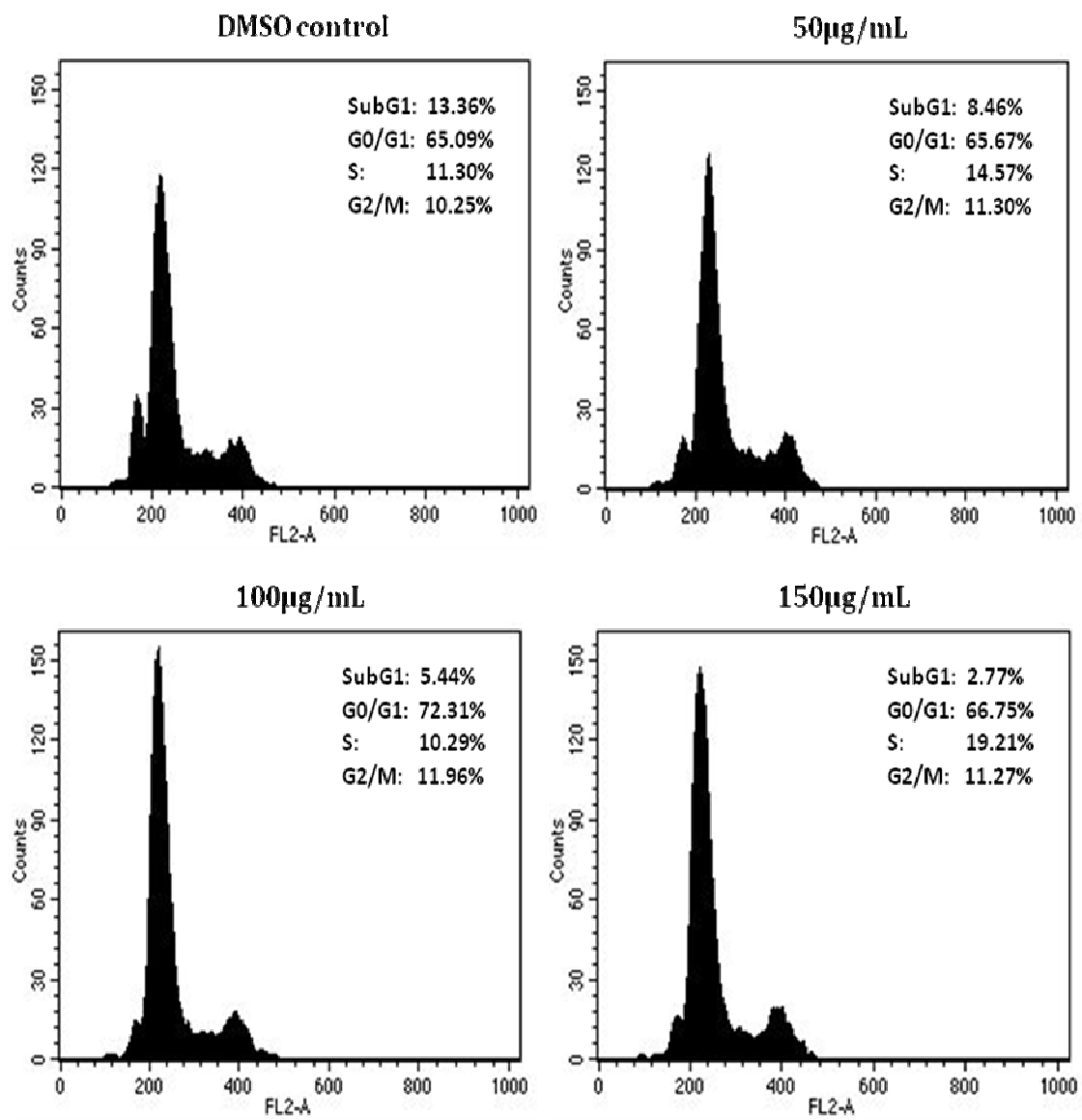
B)



**Figure 5**

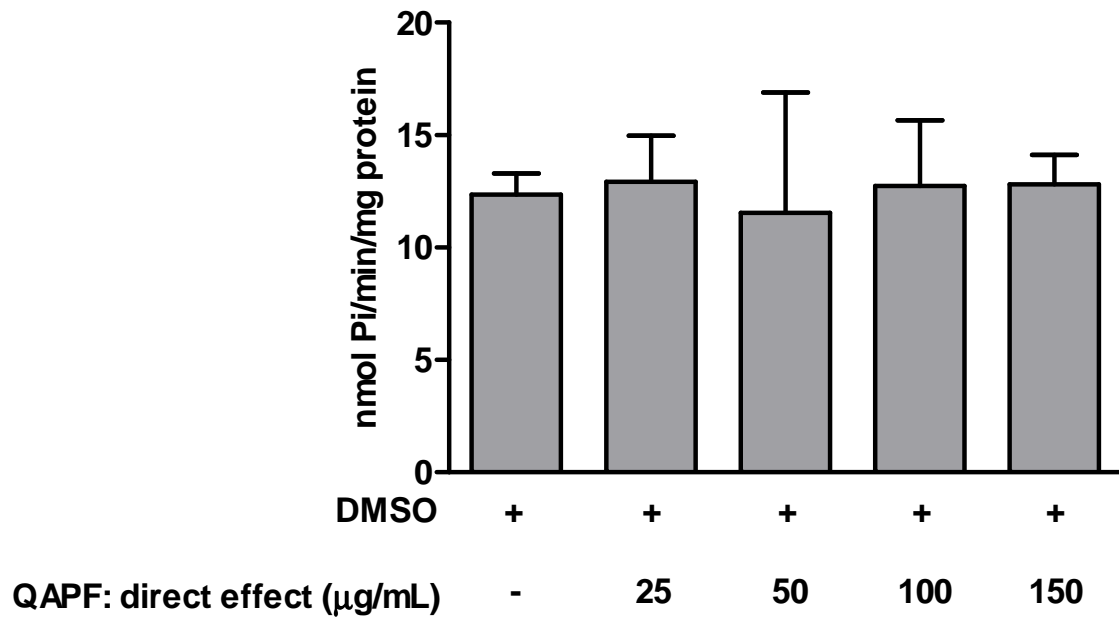


**Figure 6**

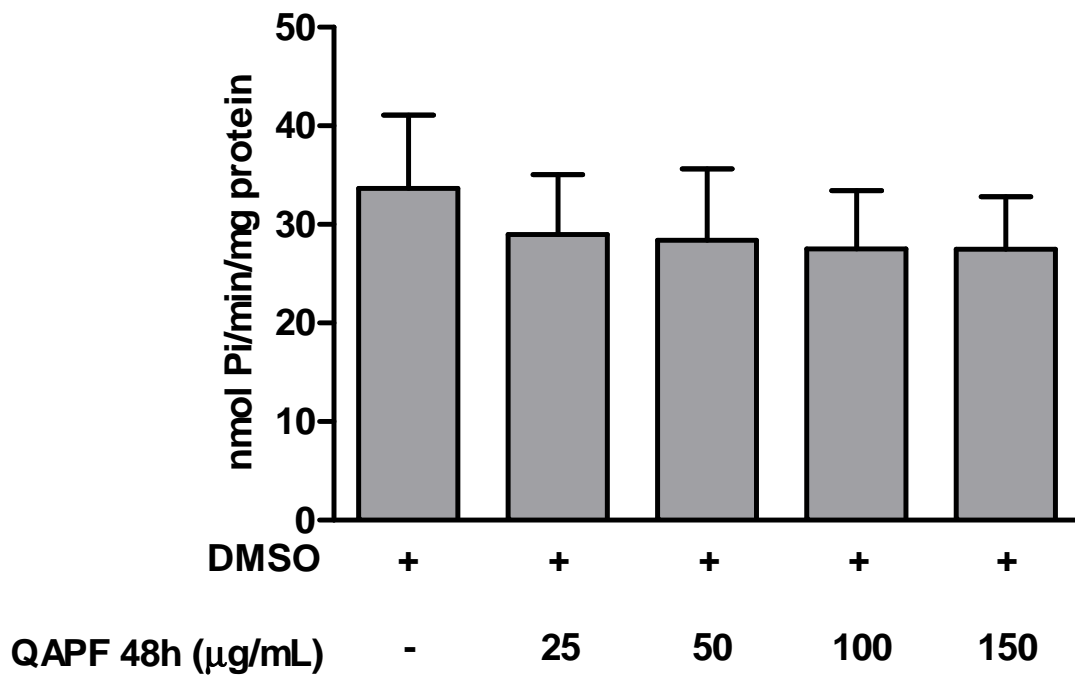


**Figure 7**

**A)**

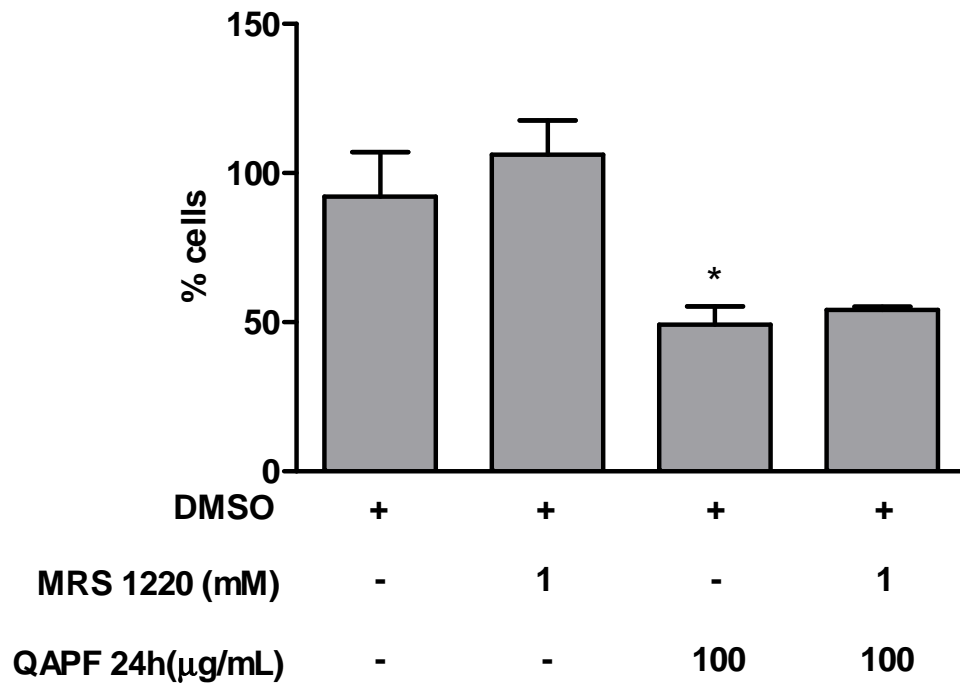


**B)**

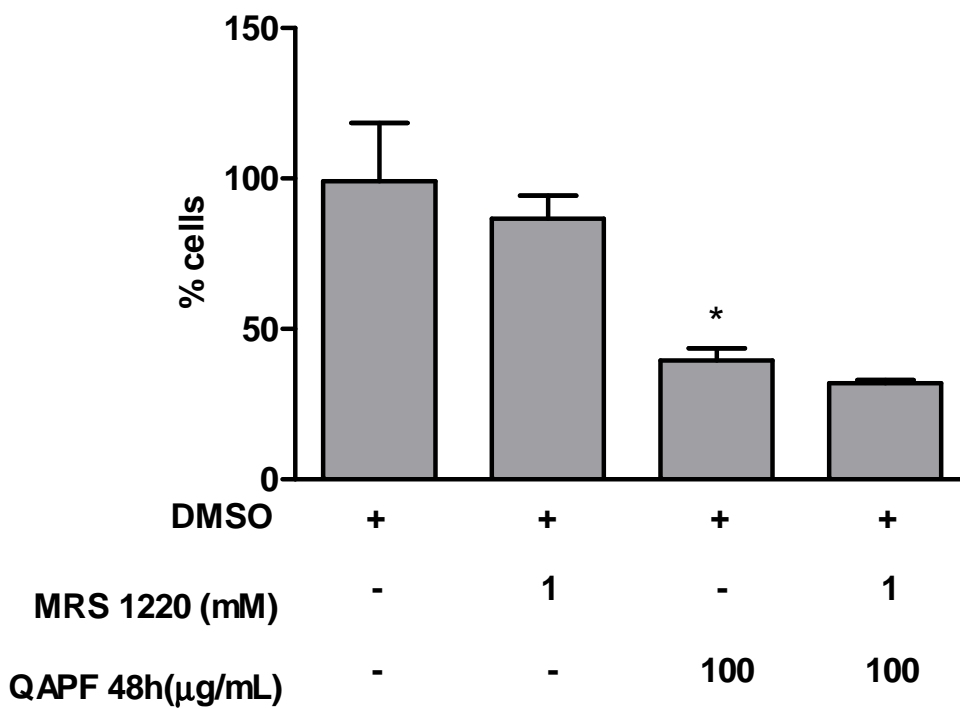


**Figure 8**

**A)**



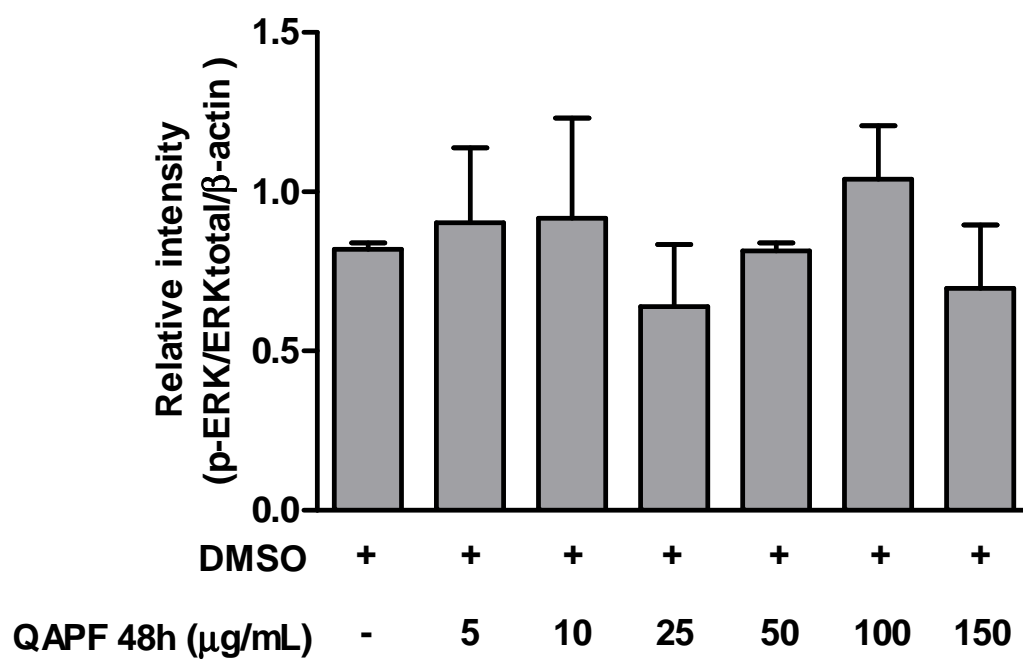
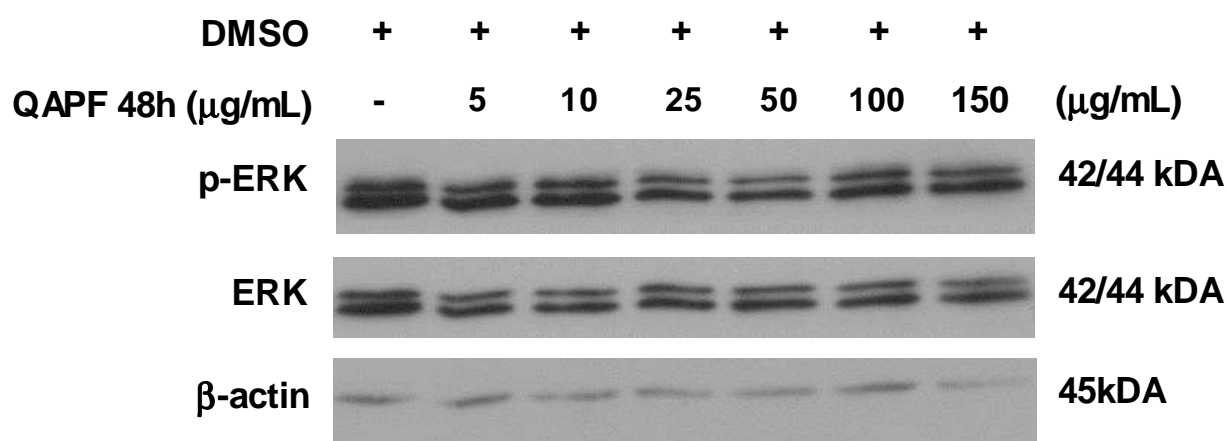
**B)**





**Figure 9**

**A)**



B)

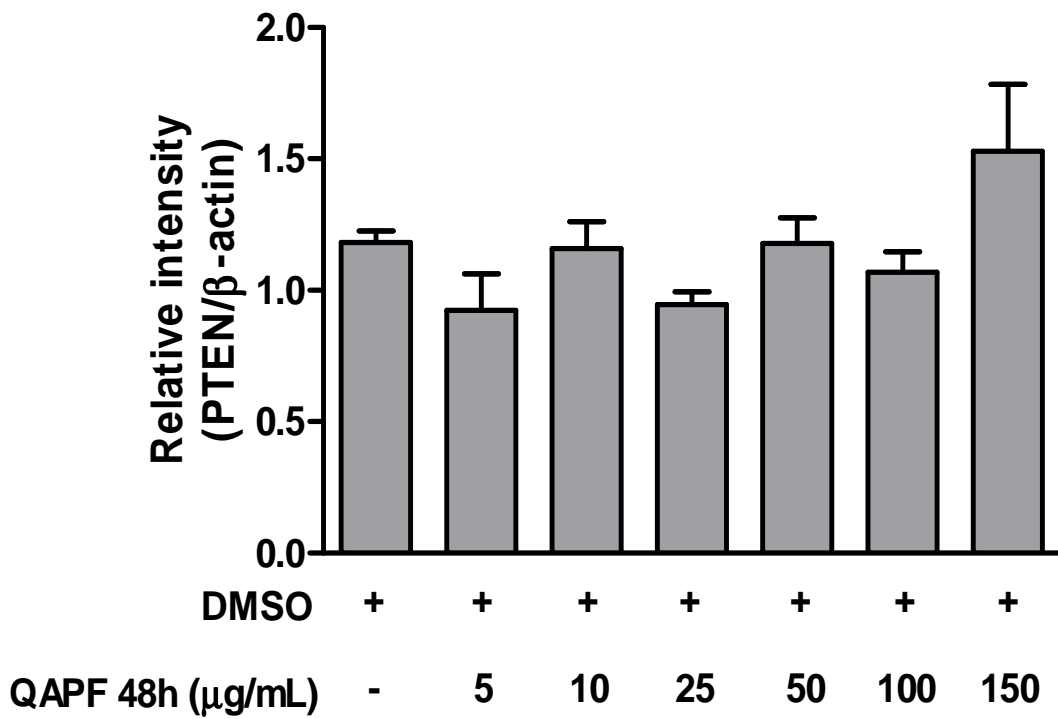
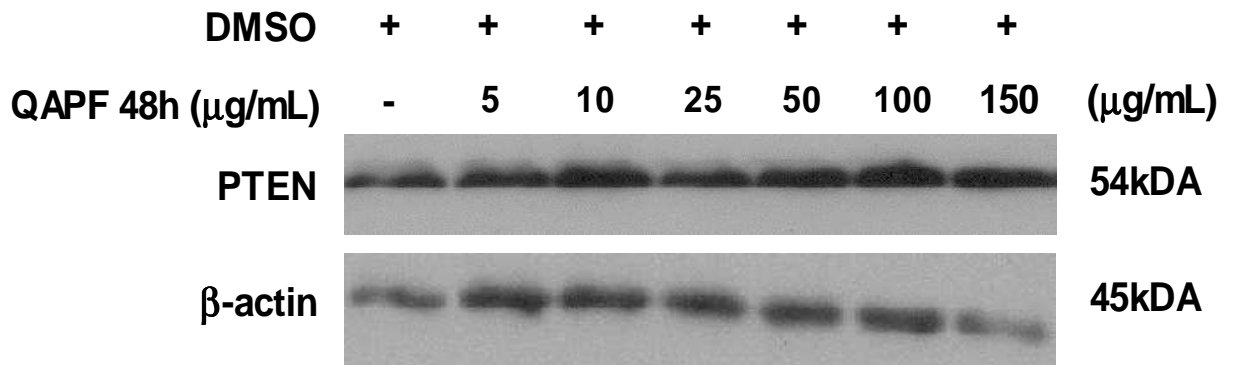


Figure 10

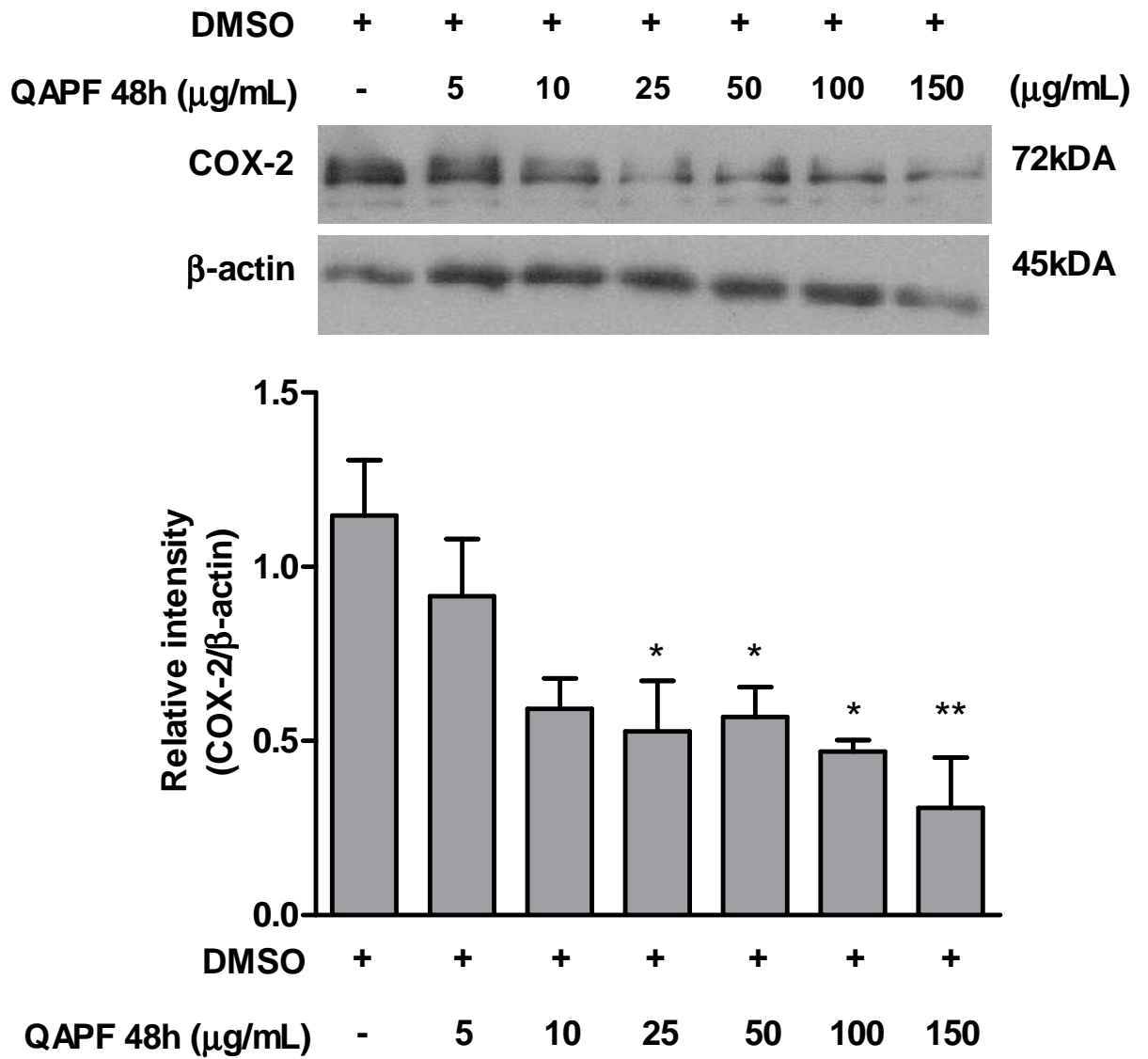
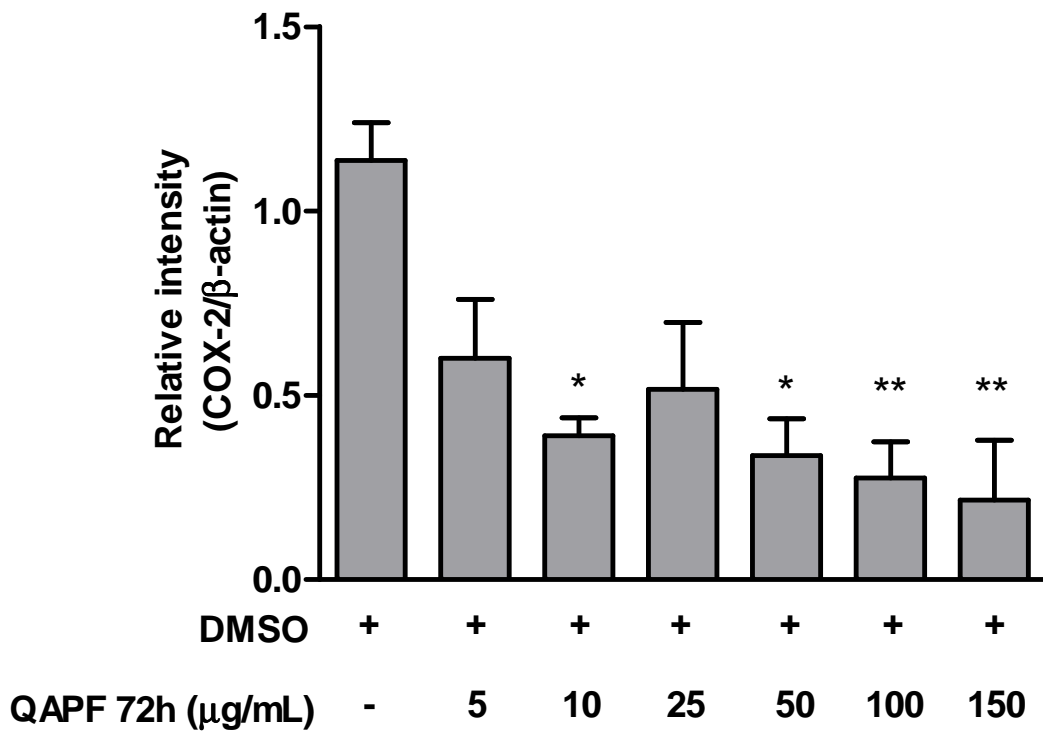
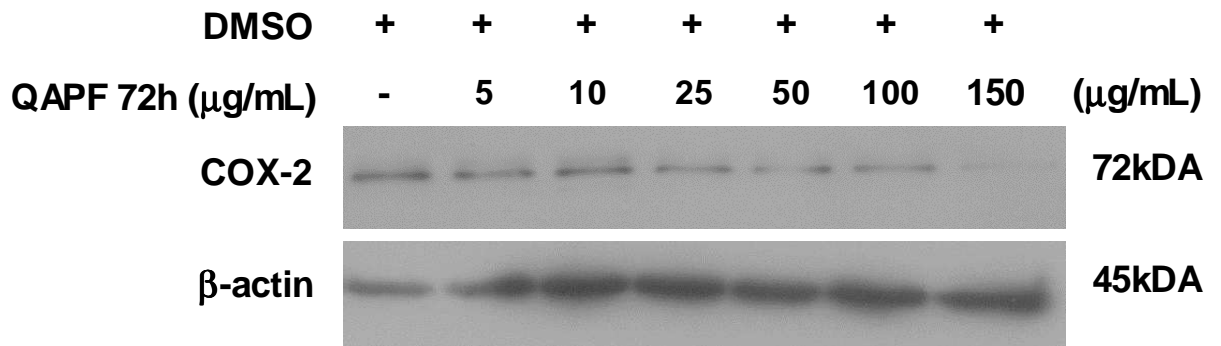


Figure 11



## **CAPÍTULO 2**

**EFEITO DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM EXTRATO BRUTO (UT),  
FRAÇÃO PURIFICADA DE ALCALÓIDES OXINDÓLICOS (FPAO) E  
FRAÇÃO PURIFICADA DE GLICOSÍDEOS DO ÁCIDO QUINÓVICO (FPAQ)  
DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. SOBRE A CISTITE HEMORRÁGICA  
INDUZIDA PELA CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS**

Artigo em preparação a ser submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia, após conclusão dos experimentos previstos. Aqui serão abordados os resultados preliminares obtidos até o momento.

## 1. Introdução

A cistite hemorrágica é uma condição inflamatória generalizada da bexiga (Manikandan et al., 2010) caracterizada por eventos inflamatórios intensos e normalmente associada ao uso de fármacos antineoplásicos como a ciclofosfamida (Bhatia et al., 2006; Bhatia et al., 2008). Para prevenção da ocorrência da cistite hemorrágica em pacientes sob tratamento com a ciclofosfamida, o fármaco Mesna tem sido utilizado (Batista et al., 2006). No entanto, este composto não tem se mostrado eficiente em lesões já estabelecidas (Morais et al., 1999; Santos Jr et al., 2010), além de apresentar efeitos adversos como dores de cabeça, diarreia e reações de hipersensibilidade, especialmente em crianças (Shepherd et al., 1991). Frente à gravidade dos quadros da cistite hemorrágica observada em pacientes sob tratamento com o quimioterápico ciclofosfamida, esta patologia permanece como um desafio terapêutico, uma vez que a eficácia dos tratamentos avaliados não é sempre suficiente. Desta forma, muitas pesquisas tentam encontrar compostos naturais que apresentem além de baixa toxicidade, eficácia para o fim ao qual se destinam (Ma et al., 2006).

*Uncaria tomentosa*, popularmente conhecida como unha-de-gato, compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que tem como finalidade gerar desenvolvimento, inovação e promover a pesquisa na área de plantas medicinais e fitoterápicos (Macedo, Gemal, 2009). A ampla gama de atividades conferida a *Uncaria tomentosa* é atribuída, principalmente à presença de três classes principais de metabólitos secundários: polifenóis, alcalóides e derivados triterpênicos (Keplinger et al., 1999), aos quais também têm sido relacionados a atividade anti-inflamatória da espécie. Os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* foram demonstrados pela redução do dano celular em brônquios de camundongos após administração de decoctos (Cisneros et al., 2005) e pela redução do edema de pata de camundongos e ratos após

administração de extratos hidroalcoólicos e de glicosídeos do ácido quinóico, respectivamente (Aguilar et al., 2002; Aquino et al., 1991). Quanto aos experimentos *in vitro*, estes relacionam a ação anti-inflamatória à capacidade da espécie em modular o fator transcripcional NF- $\kappa$ B, inibindo a secreção diferencial de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Sandoval-Chacón et al., 1998; Sandoval et al., 2000; Aguilar et al., 2002; Sandoval et al., 2002; Akesson et al., 2003; Allen-Hall et al., 2007; Allen-Hall et al., 2010).

Considerando as inúmeras propriedades farmacológicas atribuídas a *Uncaria tomentosa*, bem como os resultados já obtidos desta espécie frente à atividade anti-inflamatória, decidimos investigar o potencial efeito terapêutico do extrato bruto (UT), da fração purificada de alcalóides oxindólicos (FPAO) e da fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico (FPAQ) em um modelo *in vivo* de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, em comparação ao composto de referência Mesna.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram mantidos no vivário da PUCRS até atingirem o peso desejado, com temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade (60-70%) controlada, em um ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07h00min; luzes apagadas às 19h00min). Os animais, mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus em número de 05 animais por gaiola, receberam ração peletizada e água filtrada *ad libitum*. Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Aplicada I, da PUCRS. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em  $22 \pm 1$  °C. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1 h, no qual os animais continuaram com livre acesso à água e à ração. Todos os experimentos foram realizados entre 07h00min e 19h00min. Os procedimentos de imobilização, antes dos tratamentos foram realizados de acordo com os princípios descritos por Waynforth e Flecknell (1994), de forma a não produzir estresse ao animal. Não foram utilizados métodos analgésicos, pois os mesmos poderiam interferir nos parâmetros a serem avaliados. Para eutanásia, foi utilizado o método de deslocamento cervical, um método altamente recomendado, que apresenta rapidez, eficácia e facilidade necessárias para animais com menos de 100 g.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 11/00243 (Anexo 1).

## **2.2 Obtenção da matéria-prima vegetal**

As cascas de *Uncaria tomentosa*, coletadas em Ucayali (Peru), foram fornecidas pelo Laboratorios Induquimica S.A. de Chorrillos (Lima, Peru). O material vegetal utilizado foi confirmado e certificado pelo biólogo peruano José Ricardo Campos de la Cruz (Anexo 2).

A obtenção do extrato bruto e das frações purificadas foi realizada no laboratório do Prof. George González Ortega do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.



### 2.2.1 Obtenção do extrato bruto

O processo foi realizado de acordo com o preconizado por Borré (2010). Cascas de *Uncaria tomentosa*, secas e rasuradas, foram submetidas a um processo de maceração em solução hidroetanólica (40%, v/v) em uma proporção droga:solvente de 1:10 (m/v) por um período de 4 dias à temperatura ambiente. A solução extrativa obtida foi filtrada e posteriormente concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida em uma temperatura de 45°C para a eliminação do solvente orgânico. A solução resultante foi congelada e posteriormente liofilizada obtendo-se assim o extrato seco liofilizado.

### 2.2.2 Obtenção das frações

Após a obtenção do extrato, este foi pré-purificado com polivinilpirrolidona em uma razão de 1:10 (w/w) por 60 min. O extrato pré-purificado foi submetido a um processo de troca iônica usando uma coluna preenchida com resina aniônica, como segue: 300 mL de extrato pré-purificado foram vertidos na coluna e eluídos com 100 mL de solução hidroetanólica 40% (v/v), e subsequentemente com 300 mL de tampão acetato de amônio 0,3 M (pH 7,0), 300 mL de solução hidroetanólica 80% (v/v). Uma taxa de fluxo de 5,0 mL/min foi aplicada durante todo o processo. Separadamente, os eluatos obtidos no primeiro passo (eluato de resina aniônica - ARE) e a solução hidroetanólica 80% (FPAO) usada, foram reservados e em seguida concentrados e liofilizados. A ARE foi submetida a uma fracionamento de fase sólida usando uma coluna preenchida com resina de poliestireno como segue: 300 mg de amostra de ARE foram dissolvidas em 200 mL de água, vertidas no topo da coluna, e sequencialmente fracionadas com uma mistura metanol:água em gradiente de polaridade decrescente. Uma taxa de fluxo constante foi mantida em 2,5 mL/min durante todo o processo. As frações metanol:água 90% (v/v) e de metanol foram misturadas (FPAQ), concentradas e

liofilizadas. O conteúdo de alcalóides oxindólicos (dados não publicados) e de glicosídeos do ácido quinóico (Pavei et al., 2012) nas amostras liofilizadas (extrato, FPAO, FPAQ) foram determinadas por análise de HPLC-PDA usando métodos validados previamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quantidade de alcalóides e de glicosídeos do ácido quinóico presentes no extrato bruto e nas frações purificadas nas doses utilizadas para os tratamentos *in vivo*.

<b>EXTRATO BRUTO (mg/Kg)</b>		
<b>Dose</b>	<b>Alcalóides</b>	<b>Glicosídeos do ácido quinóico</b>
50	0,77	3,39
200	3,07	13,55
<b>FPAO (mg/Kg)</b>		
<b>Dose</b>	<b>Alcalóides</b>	<b>Glicosídeos do ácido quinóico</b>
20	1,25	-
50	3,14	-
100	6,27	-
<b>FPAQ (mg/Kg)</b>		
<b>Dose</b>	<b>Alcalóides</b>	<b>Glicosídeos do ácido quinóico</b>
20	-	4,36
50	-	10,89
100	-	21,78

### **2.3 Indução da cistite hemorrágica**

A indução da cistite foi realizada de acordo com a técnica descrita por Wantuch et al. (2007), através de uma única administração de ciclofosfamida (300 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Animais controle receberam solução salina (NaCl 0,9 %, 10 mL/kg, i.p.) mais o veículo necessário para solubilização do tratamento. É descrito que a administração i.p. de ciclofosfamida não produz lesão ou inflamação em outros tecidos abdominais, exceto da bexiga (Olivar, Laird, 1999).

Diferentes grupos de animais foram tratados com o extrato bruto (UT) de *Uncaria tomentosa* (50 ou 200 mg/Kg), com a fração purificada de alcalóides oxindólicos – FPAO (20, 50 ou 100 mg/Kg), com a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóvico - FPAQ (20, 50 ou 100 mg/Kg) ou com o composto de referência Mesna (60 mg/kg) (Kanat et al., 2006), 30 minutos antes e, 4 horas depois da aplicação da ciclofosfamida. Para os animais tratados com o extrato bruto, além de seguir o esquema terapêutico descrito acima, foram avaliadas duas outras formas de tratamento com a dose de 200 mg/Kg: 1 hora antes e 2 horas após a indução da cistite, e 30 minutos antes e 2 horas após a indução da cistite. Animais controle receberam veículo nos mesmos esquemas de administração.

### **2.4 Estudo comportamental**

A nocicepção associada à cistite hemorrágica foi avaliada através do método descrito por Olivar e Laird (1999), com pequenas modificações. Estes experimentos foram realizados entre 8:00 e 12:00 horas, a fim de minimizar as variações circadianas potenciais na resposta comportamental. Imediatamente após a aplicação de ciclofosfamida, os camundongos foram observados durante 2 minutos, a cada 30 minutos, em um período total de 4 horas. Os seguintes parâmetros comportamentais

foram avaliados: (i) atividade (caminhar, levantar-se nas patas traseiras, escalar, grooming); (ii) imobilidade; e (iii) comportamentos indicativos de nocicepção visceral. Também foram avaliados neste mesmo período, alguns parâmetros comportamentais que foram pontuados conforme segue: 0 = normal; 1 = piloereção; 2 = forte piloereção; 3 = respiração forçada; 4 = lambar o abdômen e 5 = estiramento ou contração do abdômen, de acordo com a metodologia descrita previamente (Olivar, Laird, 1999; Wantuch et al., 2007). Quando o animal apresentava mais de um destes comportamentos no período de observação, era feita a soma dos pontos correspondentes.

## **2.5 Análise das bexigas**

Os animais foram submetidos à eutanásia 6 horas após a administração de ciclofosfamida (300 mg/kg, i.p.) e as bexigas foram removidas para a análise macroscópica, conforme a descrição a seguir.

### **2.5.1 Análise macroscópica**

Para a análise macroscópica das bexigas foi feito um corte em “Y”, a fim de visualizar toda a parte interna da mesma. O tecido foi analisado sob uma lupa. A avaliação macroscópica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos por Gray et al. (1986). A formação de edema foi graduada como: (3) severo, quando o fluido compreendia toda a parte externa e interna da parede da bexiga; (2) moderado, quando o edema estava confinado na mucosa interna; (1) leve, quando estava entre normal e moderado; e (0) ausência de edema. Para a hemorragia, a bexiga foi graduada da seguinte forma: presença de coágulos (3); hematoma na mucosa (2); telangiectasia ou dilatação dos vasos da bexiga (1); ou aspecto normal (0). Além disso, foi avaliado o

peso úmido de cada bexiga e o resultado foi expresso como miligrama por 100 g de animal, como uma medida adicional de edema da bexiga.

## **2.6 Análise estatística**

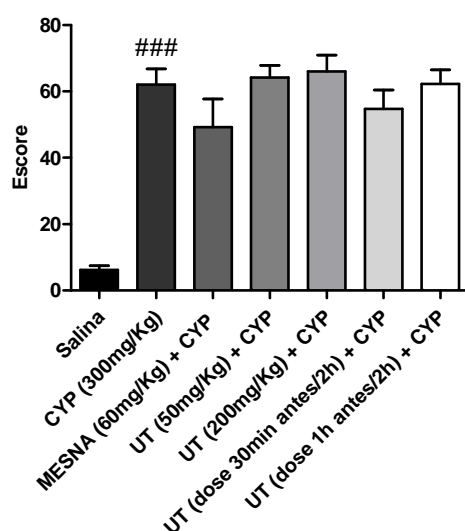
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP e analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, usando o *GraphPad Prism Software*. As diferenças foram consideradas significativas em relação ao controle veículo quando  $p < 0,05$ .

## **3. Resultados**

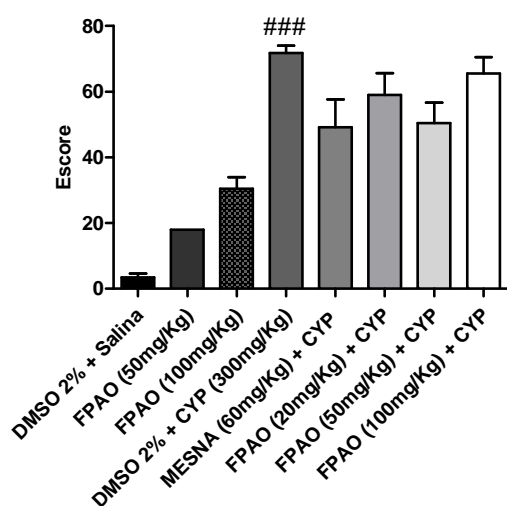
### **3.1 Comportamento nociceptivo induzido pela CYP**

A administração i.p. de CYP (300 mg/Kg) foi capaz de induzir modificações significativas no escore nociceptivo comportamental dos camundongos, quando comparado ao grupo salina (Fig. 1A-C), corroborando com os resultados prévios da literatura (Olivar, Laird, 1999). Porém, a análise estatística dos nossos resultados demonstrou que nenhum dos tratamentos administrados aos animais reduziu de forma significativa as alterações comportamentais induzidas pela CYP como a piloereção, a dor e a respiração forçada. No entanto, uma redução parcial foi observada quando as frações foram administradas, conforme demonstrado na figura 1 (B-C).

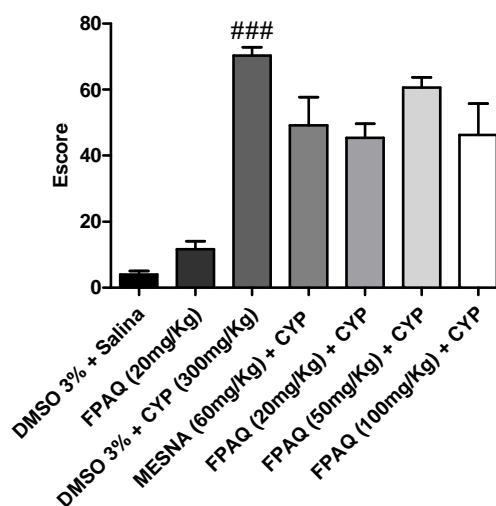
A)



B)



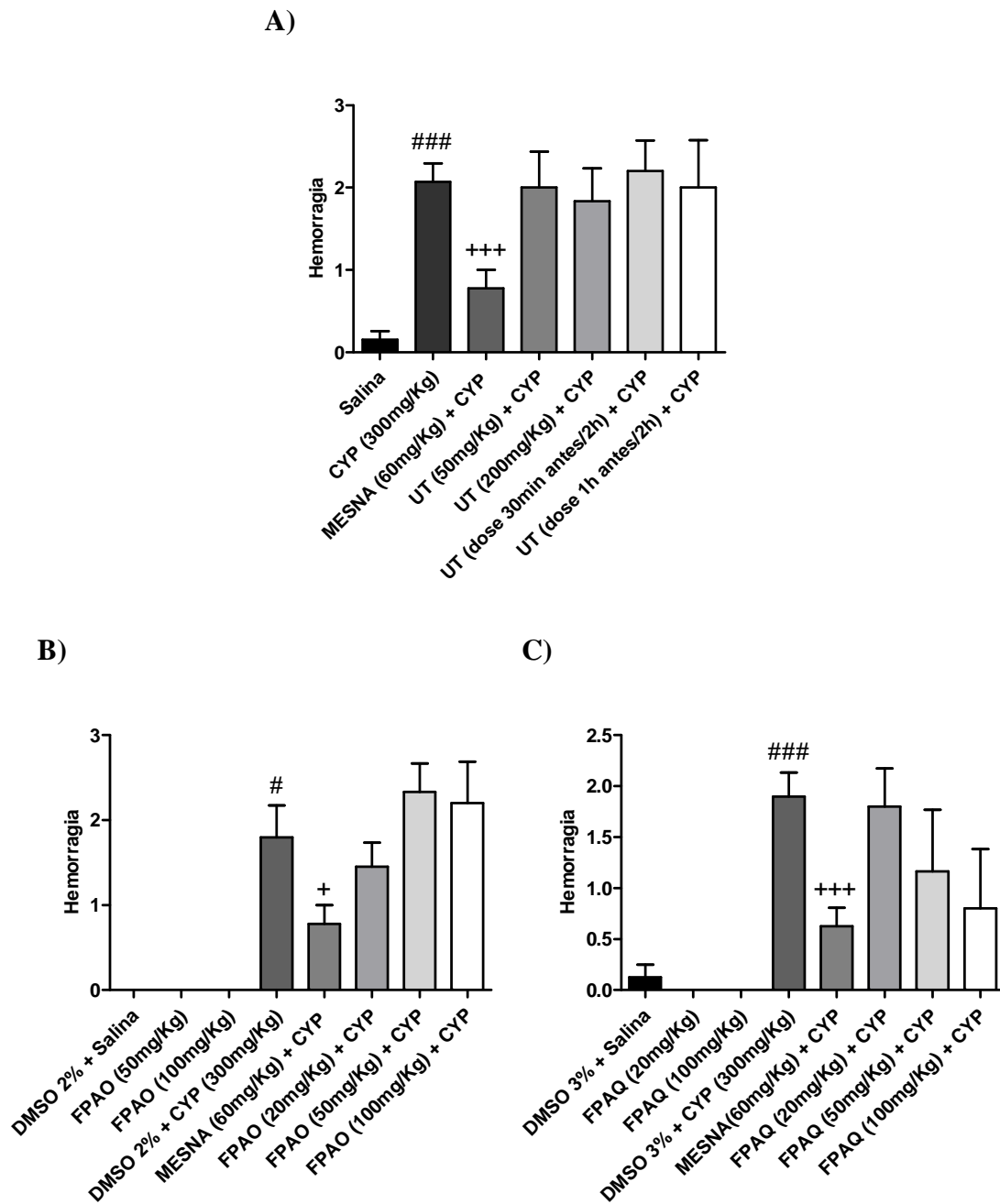
C)



**Fig. 1.** Efeito do extrato bruto (A), FPAO (B) e FPAQ (C) de *Uncaria tomentosa* na resposta nociceptiva induzida pela CYP na cistite hemorrágica. Cada coluna representa a média de seis a oito animais e as linhas verticais demonstram o EP. ### $p < 0,001$  denota o valor de significância da CYP em comparação ao controle salina + veículo DMSO.

### 3.2 Avaliação bruta da bexiga

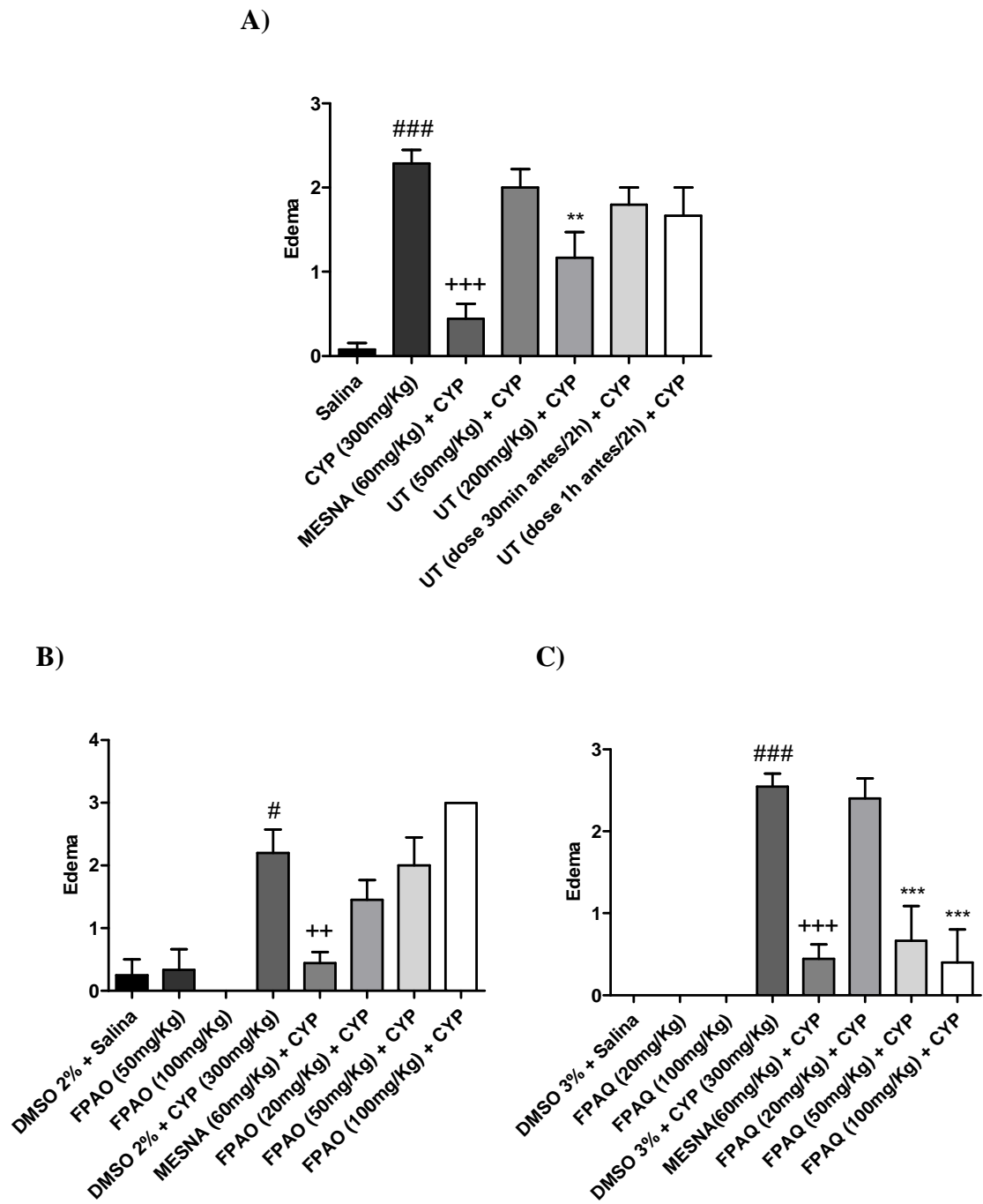
Conforme demonstrado na figura 2 e 3 (A-C), a administração i.p da CYP (300 mg/Kg) resultou em severa hemorragia e edema à bexiga dos camundongos quando comparados ao grupo salina. De acordo com a avaliação macroscópica da bexiga, o composto de referência Mesna causou uma inibição significativa da hemorragia ( $62,44\% \pm 10,7$ ;  $56,79 \pm 12,34$ ;  $67,11 \pm 9,63$ ) induzida pela CYP (Fig. 2A-C, respectivamente). No entanto, o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* não seguiu este mesmo perfil, demonstrando que nas doses e nos esquemas terapêuticos testados o extrato não foi capaz de reverter este parâmetro. Em relação à FPAO observou-se um aumento no quadro hemorrágico, que apesar de não ser significativo foi evidenciado à medida que a dose era aumentada (Fig. 2B). Considerando, que dois grupos de animais foram tratados somente com a FPAO nas doses de 50 ou 100 mg/Kg (Fig. 2B) e que nenhuma alteração hemorrágica foi detectada na bexiga destes animais, a hipótese destas doses estarem sendo tóxicas à bexiga, foi excluída. Quanto a FPAQ, devido à grande variação intra-amstral, não se observou redução significativa, apesar de haver uma diminuição superior a 50% na dose de 100 mg/Kg (Fig. 2C). Portanto, o que se observa após o tratamento com a FPAQ é uma tendência à diminuição da hemorragia, que deverá ser confirmada com a repetição dos experimentos. Ainda, nenhuma alteração foi ocasionada na bexiga dos animais, quando estes foram tratados somente com a FPAQ nas doses de 20 ou 100 mg/Kg.



**Fig. 2.** Efeito do extrato bruto (A), FPAO (B) e FPAQ (C) de *Uncaria tomentosa* na hemorragia induzida pela CYP. Cada coluna representa a média de seis a oito animais e as linhas verticais demonstram o EP. # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$  denota o valor de significância da CYP em comparação ao controle salina + veículo DMSO; + $p < 0,05$ ; +++ $p < 0,001$  denota o valor de significância do composto de referência Mesna em comparação ao CYP.



Com relação à avaliação macroscópica do edema, observamos que o composto de referência Mesna foi capaz de reverter significativamente o efeito causado pela CYP, promovendo uma redução em torno de 80%. Interessantemente, observamos que o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* foi também capaz de promover redução do edema na dose de 200 mg/Kg ( $48,95\% \pm 13,4$ ); porém, somente no mesmo esquema terapêutico seguido para os demais tratamentos (30 minutos antes e 4 horas após a aplicação de CYP) (Fig. 3A). Quanto à FPAO, novamente observamos um perfil semelhante àquele obtido para o parâmetro da hemorragia, onde a FPAO foi incapaz de reverter as ações da CYP, sendo que na maior dose, este efeito inclusive foi mais pronunciado que o efeito da ciclofosfamida, apesar de não ser significativamente diferente (Fig. 3B). Mais uma vez, não observamos nenhuma alteração nas bexigas dos animais tratados somente com a FPAO. Surpreendentemente, a FPAQ reverteu significativamente os efeitos provocados pela CYP nas doses de 50 ou 100 mg/Kg ( $73,80\% \pm 16,6$  e  $84,28\% \pm 15,7$ , respectivamente), apresentando um efeito similar àquele desencadeado pelo composto de referência Mesna ( $82,54\% \pm 6,9$ ). Na menor dose (20 mg/Kg), a FPAQ não protegeu a bexiga dos danos causados pela CYP (Fig. 3C). Ademais, nenhuma alteração foi observada na bexiga dos animais, quando tratados somente com a FPAQ.

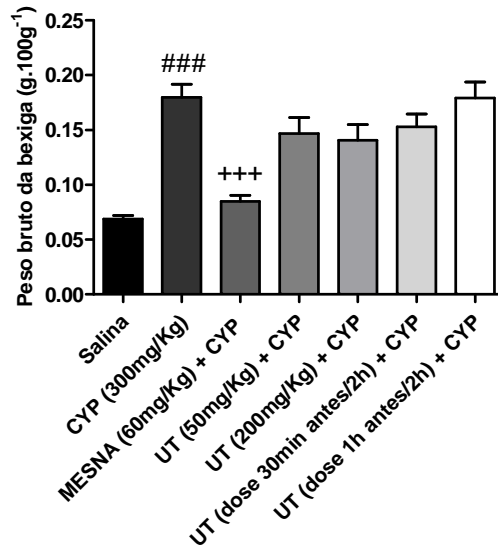


**Fig. 3.** Efeito do extrato bruto (A), FPAO (B) e FPAQ (C) de *Uncaria tomentosa* no edema induzido pela CYP. Cada coluna representa a média de seis a oito animais e as linhas verticais demonstram o EP. # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$  denota o valor de significância da CYP em comparação ao controle salina + veículo DMSO; ++ $p < 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  denota o valor de significância do composto de referência Mesna em comparação ao

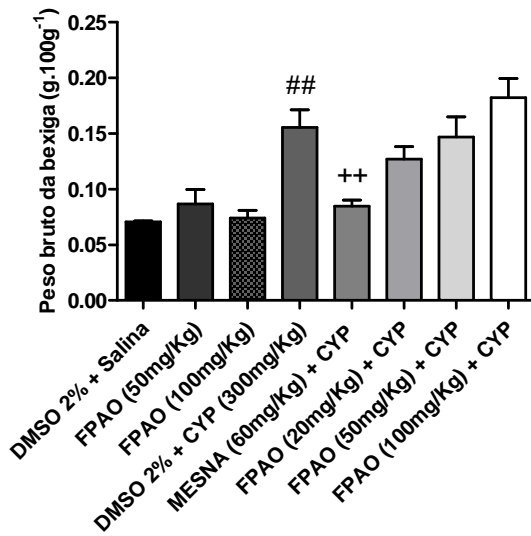
CYP; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 denotam o grau de significância dos grupos tratados em comparação aos valores de CYP.

O edema induzido pela CYP também foi avaliado através da determinação do peso da bexiga vazia por 100 g de peso corporal. Os animais tratados com o extrato bruto não demonstraram redução significativa no peso das bexigas, em nenhuma das doses avaliadas (Fig. 4A). Em relação aos animais tratados com a FPAO, o mesmo perfil observado para a hemorragia (Fig. 2B) e para o edema (Fig. 3B) foi observado para o peso das bexigas destes animais (Fig. 4B), demonstrando que com o aumento da dose houve um aumento crescente no peso destas bexigas. Quanto à FPAQ, este ensaio de determinação do peso da bexiga (Fig. 4C) confirmou os resultados obtidos para a redução do edema (Fig. 3C), demonstrando que nas doses de 50 mg/Kg ou 100 mg/Kg ( $34,54\% \pm 4,9$  e  $45,33\% \pm 11,6$ , respectivamente) os pesos das bexigas dos animais tratados com esta fração praticamente retornaram aos níveis do peso de uma bexiga normal, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com Mesna ( $52,08\% \pm 3,0$ ).

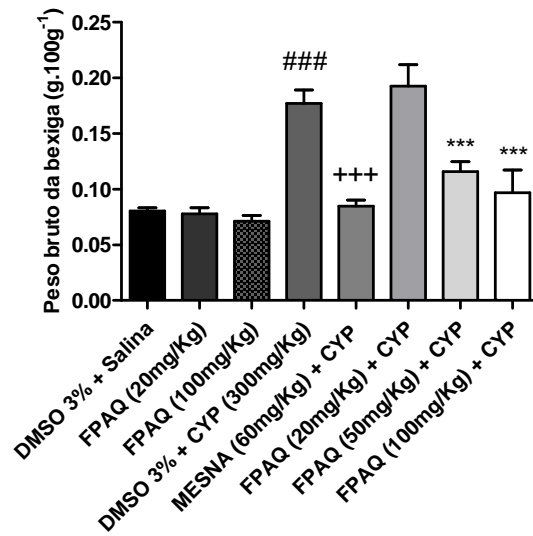
A)



B)



C)



**Fig.4.** Efeito do extrato bruto (A), FPAO (B) e FPAQ (C) de *Uncaria tomentosa* no peso da bexiga dos animais no modelo de cistite hemorrágica, induzida pela CYP. Cada coluna representa a média de seis a oito animais e as linhas verticais demonstram o EP. ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  denota o valor de significância da CYP em comparação ao controle salina + veículo DMSO; ++ $p < 0,01$ ; +++ $p < 0,001$  denota o valor de significância do composto de referência Mesna em comparação ao CYP; \*\*\* $p < 0,001$  denotam o grau de significância dos grupos tratados em comparação aos valores de CYP.

### 3. Discussão

Considerando a ampla utilização de cascas e raízes de *Uncaria tomentosa* para inflamações crônicas e doenças do trato urinário, decidimos investigar o efeito do extrato bruto, da fração purificada de alcalóides oxindólicos (FPAO) e da fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico (FPAQ) desta espécie nos eventos inflamatórios e nociceptivos em um modelo de cistite hemorrágica induzida pela CYP em camundongos. Frente ao comportamento nociceptivo induzido pela CYP, demonstramos que nenhum dos tratamentos administrados foi capaz de reduzir as alterações comportamentais (Fig. 1A-C). Quanto à análise macroscópica das bexigas, observamos que o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* somente foi eficaz em reduzir o edema induzido pela CYP na maior dose testada (200 mg/Kg) (Fig. 3A). No entanto, este parâmetro não foi confirmado quando o peso das bexigas foi analisado (Fig. 4A).

Para nossa surpresa, a FPAO também não demonstrou redução dos demais parâmetros avaliados, contradizendo muitos dados da literatura, os quais mostram que muitas das ações biológicas da *Uncaria tomentosa* estão relacionadas aos seus constituintes alcaloídicos (García Prado et al., 2007; Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009). Ademais, observamos que os animais tratados com a dose de 50 ou 100 mg/Kg da FPAO apresentaram hemorragia acentuada (Fig 2B), bem como o edema (Fig 3B) e o peso das bexigas (Fig 4B) foram potencializados, em comparação ao grupo CYP + salina. No entanto, excluímos a hipótese das dosagens avaliadas serem tóxicas *per se* em nível de sistema urinário, pois 2 grupos de animais foram tratados somente com esta fração, nas doses de 50 ou 100 mg/Kg, sendo que a hemorragia, o edema e o peso das bexigas não foram alterados de forma significativa. Assim, é possível inferir que de alguma forma os constituintes da FPAO interagem com a CYP, aumentando os parâmetros inflamatórios decorrentes da cistite hemorrágica.

Com base na tabela 1, observamos que o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* apresenta praticamente a mesma quantidade de glicosídeos do ácido quinóico (13,55 mg/Kg) na dose de 200 mg/Kg, semelhante à quantidade encontrada na FPAQ na dose de 50 mg/Kg (10,89 mg/Kg). Contudo, a FPAQ demonstrou intensa atividade quando comparado ao extrato bruto. Atribuímos esta ausência de atividade do extrato bruto à presença de alcalóide, os quais podem estar impedindo a ação dos glicosídeos do ácido quinóico, uma vez que observamos que a FPAQ em altas concentrações demonstrou efeito contrário ao descrito na literatura, quando a avaliação bruta da bexiga foi realizada. Além disso, se analisarmos o conteúdo de alcalóides no extrato bruto na dose de 200 mg/Kg (3,07 mg/Kg), observaremos que a quantidade de alcalóides presentes na FPAQ na dose de 50 mg/Kg é semelhante (3,14 mg/Kg), dando suporte à nossa hipótese.

Em relação à atividade anti-inflamatória observada em outros artigos para o extrato bruto, observamos diferença quanto ao método extrativo empregado, bem como a concentração e o tipo de solvente utilizados, dificultando uma comparação entre os estudos.

Quanto à FPAQ, esta se mostrou uma boa candidata para dar prosseguimento aos estudos *in vivo*, uma vez que foi observada redução significativa do edema (Fig. 3C) e do peso bruto das bexigas (Fig. 4C), resultando em atividade similar àquela obtida com o composto de referência Mesna. Quanto à hemorragia (Fig. 2C), observamos uma tendência à diminuição deste parâmetro, porém este resultado ainda precisa ser confirmado.

Recentemente, tem sido sugerido que o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a COX-2 estão diretamente envolvidos na patogênese da cistite (Kiuchi et al., 2009). Considerando que no estudo *in vitro* com células tumorais de bexiga demonstramos que a FPAQ exibiu

um forte potencial de inibição da proteína COX-2 e, tendo em vista, que todos estes mediadores inflamatórios citados anteriormente são rigorosamente regulados pelo NF- $\kappa$ B, este novamente se torna um marcador atrativo para provavelmente, *in vivo*, prevenir os efeitos colaterais induzidos pela CYP. Mais estudos estão sendo realizados a fim de comprovar esta proposição.

## Referências

- Aguilar J.L., Rojas P., Marcelo A., Plaza A., Bauer R., Reininger E., Klaas C.A., Merfort I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 271-276, 2002.
- Akesson C., Lindgren H., Pero R.W., Leanderson T., Ivars F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- $\kappa$ B activity without inducing cell death. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1889–1900, 2003.
- Allen-Hall L., Cano P., Arnason J.T., Rojas R., Lock O., Lafrenie R.M. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.312–317, 2007.
- Allen-Hall L., Arnason J.T., Cano P., Lafrenie R.M. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.685–693, 2010.
- Aquino R., De Feo V., De Simone F., Pizza C., Cirino G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of natural products**, v.54, n.2, p.453-459, 1991.
- Batista C.K.L.P., Brito G.A.C., Souza M.L.P., Leitão B.T.A., Cunha F.Q., Ribeiro R.A. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.1475-1481, 2006.
- Bhatia K., Kaur M., Atif F., Ali M., Rehman H., Rahman S., Raisuddin S. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1744-1750, 2006.



Bhatia K., Ahmad F., Rashid H., Raisuddin S. Protective effect of *S*-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3368-3374, 2008.

Borré G.L. **Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFRGS.

Cisneros F.J., Jayo M., Niedziela L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.355-364, 2005.

García Prado E., García Gimenez M.D., De La Puerta Vázquez R., Espartero Sánchez J.L., Sáenz Rodríguez M.T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa*, on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v.14, n.4, p. 280-284, 2007.

Gray K.J., Engelmann U.H., Johnson E.H., Fishman I.J. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (Cytosan) therapy. **The Journal of Urology**, v.136, n.2, p.497-500, 1986.

Kanat O., Kurt E., Yalcinkaya U., Evrensel T., Manavoglu O. Comparison of uroprotective efficacy of mesna and amifostine in Cyclophosphamide- induced hemorrhagic cystitis in rats. **Indian Journal of Cancer**, v.43, n.1, p.12-15, 2006.

Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M.P., Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.23-34, 1999.

Kiuchi H., Takao T., Yamamoto K., Nakayama J., Miyagawa Y., Tsujimura A., Nonomura N., Okuyama A. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model

by inhibiting nuclear factor-kB phosphorylation. **The Journal of Urology**, v.181, p.2339-2348, 2009.

Ma L., Feugang J.M., Konarski P., Wang J., Lu J., Fu S., Ma B., Tian B., Zou C., Wang Z. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.2275-2285, 2006.

Macedo E.V., Gemal A.L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n.4, p.290-297, 2009.

Manikandan R., Kumar S., Dorairajan L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian Journal of Urology**, v.26, n.2, p.159-166, 2010.

Morais M.M., Belarmino-Filho J.N., Brito G.A.C., Ribeiro R.A. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.10, p.1211-1215, 1999.

Olivar T., Laird J.M. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflammation. **European Journal of Pain**, v.3, n.2, p141-149, 1999.

Pavei C., Kaiser S., Verza S.G., Borré G.L. Ortega G.G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *in press*, 2012.

Pilarski R., Poczekaj-Kostrzewska, M., Ciesiolka D., Szyfter K., Gulewicz K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacological Reports**, v.59, p.565-572, 2007.

Rinner B., Li Z.X., Haas H., Siegl V., Sturm S., Stuppner H., Pfragner R. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. **Anticancer Research**, v.29, p.4519-4528, 2009.

Sandoval-Chacón M., Thompson J.H., Zhang X.J., Liu X., Mannick E.E., Sandowska-Krowicka H., Charbonnet R.M., Clark D.A., Miller M.S.J. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF- $\kappa$ B. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p.1279-1289, 1998.

Sandoval M., Charbonnet R.M., Okuhama N.N., Roberts J., Krenova Z., Trentacosti A.M., Miller M.J.S. Cat's Claw inhibits TNF- $\alpha$  production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.1, p.71-78, 2000.

Sandoval M., Okuhama N.N., Zhang X.J., Condezo L.A., Lao J., Angeles F.M., Musah R.A., Bobrowski P., Miller M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v.9, p.325-337, 2002.

Santos Jr A.A., Leal P.C., Edelweiss M.I.A., Lopes T.G., Calixto J.B., Morrone F.B., Campos M.M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.382, n.5-6, p.339-407, 2010.

Shepherd J.D., Pringle L.E., Barnett M.J., Klingemann H.G., Reece D.E., Phillips G.L. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v.9, n.11, p.2016-2020, 1991.

Wantuch C., Piesla M., Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. **Neuroscience Letters**, v. 421, p.250–252, 2007.

Waynforth H.B., Flecknell P.A. **Experimental and Surgical Technique in the Rat.** 2  
ed. London: Academic Press Limited, p.230, 1994.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Durante séculos, as plantas medicinais representaram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem (Hostettmann et al., 2003). De fato, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna são desenvolvidos de fontes naturais e, se considerarmos os fármacos antitumorais e antimicrobianos, estes constituem aproximadamente 70% das drogas desenvolvidas a partir de produtos da mesma natureza (Yunes, Calixto, 2001). Informações obtidas a partir do conhecimento popular constituem estratégias para investigação de plantas medicinais, uma vez que em torno de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo alegação de um dado efeito terapêutico em humanos (Yunes, Calixto, 2001). Corroborando com estes dados, uma análise criteriosa da origem de todos os fármacos anticâncer aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) entre os anos de 1940 a 2006 apontou que o conhecimento sobre produtos naturais e que os constituintes das plantas tiveram grande influência na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (Newman, Cragg, 2007). Portanto, frente a vários efeitos colaterais dos fármacos atualmente disponíveis, muitas pesquisas tentam encontrar compostos naturais com baixa toxicidade (Ma et al., 2006). Nesse contexto, este estudo focou na investigação do potencial efeito antitumoral (Capítulo 1) e do potencial efeito anti-inflamatório (Capítulo 2) do extrato e das frações purificadas de *Uncaria tomentosa*, especialmente da fração de glicosídeos do ácido quinóvico.

Cascas e raízes da espécie *Uncaria tomentosa* são amplamente utilizadas na medicina tradicional e a padronização das formulações comerciais desta planta é baseada no seu conteúdo de alcalóides oxindólicos, uma vez que estes metabólitos

representam a classe mais abundante (Keplinger et al., 1999; Sandoval et al., 2002). Considerando que vários grupos de pesquisa têm relatado que muitas das ações biológicas de *Uncaria tomentosa* estão relacionadas a seus constituintes alcaloídicos (García Prado et al., 2007; Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009), e após observarmos redução significativa do número de células tumorais quando tratadas com o extrato bruto por 48 h (Fig. 1A e B) (Capítulo 1), decidimos investigar a proliferação celular em linhagem de câncer de bexiga humano T24 usando uma fração purificada de alcalóides oxindólicos (FPAO) e uma fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico (FPAQ). Surpreendentemente a FPAO não alterou a proliferação celular (Fig. 2A), enquanto que a FPAQ significativamente inibiu o crescimento da linhagem celular T24 (Fig. 2B). O mesmo perfil foi encontrado para a linhagem RT4, quando as células foram tratadas com a FPAQ (Fig. 3). Como somente a FPAQ demonstrou potencial para inibir a proliferação celular, decidimos avaliar a viabilidade destas duas linhagens celulares quando tratadas com esta fração, com o intuito de confirmar nossos resultados. Os resultados obtidos demonstraram que a FPAQ inibiu a viabilidade celular em ambas as linhagens testadas, sendo que na T24 uma inibição significativa foi observada na concentração de 100 µg/mL após 48 h de tratamento (Fig. 4A). Este resultado está de acordo com estudos prévios onde a *Uncaria tomentosa* tem demonstrado habilidade em inibir o crescimento de uma variedade de linhagens tumorais (Sheng et al., 1998; Riva et al., 2001; De Martino et al., 2006; García Prado et al., 2007; Pilarski et al., 2010).

Contraditoriamente a muitos estudos, nossos resultados são consistentes com o estudo realizado por Sandoval et al. (2002), os quais demonstraram que o conteúdo de alcalóides não influencia nas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de *Uncaria tomentosa*. No estudo conduzido por Sandoval et al. (2002), as ações biológicas de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* foram comparadas, demonstrando que nesta

última, o conteúdo de alcalóides presentes é praticamente negligenciável (em torno de 35 vezes menor) quando comparado a *Uncaria tomentosa*. Interessantemente, *Uncaria guianensis* demonstrou ações biológicas superiores, dificultando o entendimento de que estes efeitos sejam resultado de seus constituintes alcaloídicos. Ademais, neste mesmo estudo, frações não-alcaloídicas de *Uncaria tomentosa* foram avaliadas e apresentaram atividade biológica (inibição da produção de TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico), demonstrando que tais efeitos parecem estar sendo mediados por substâncias distintas dos alcalóides oxindólicos. Outro estudo recente, também questionou a veracidade da associação entre a atividade anticâncer de *Uncaria tomentosa* e o seu conteúdo de alcalóides (Pilarski et al., 2010). Com base em nossos resultados experimentais aliados aos dados da literatura, a explicação da atividade anticâncer estar somente associada ao conteúdo de alcalóides presentes na espécie *Uncaria tomentosa* pode ser equivocada. Provavelmente, outros metabólitos como os glicosídeos do ácido quinóico também são responsáveis pelas ações farmacológicas de *Uncaria tomentosa*, agindo sozinhos ou em associação com outros grupos químicos como demonstrado no presente trabalho.

Uma característica importante para um potencial fármaco antitumoral é a habilidade de induzir apoptose nas células cancerígenas (Cheng et al., 2007; Lee et al., 2009). A apoptose é um processo bioquímico essencial e ativo que se caracteriza por morte celular programada para a manutenção da homeostasia necessária e para a defesa contra inúmeras doenças (Sheng et al., 2000a; Cheng et al., 2007). Com o intuito de investigar o tipo de morte induzido pela FPAQ, analisamos por citometria de fluxo o mecanismo que poderia explicar a diminuição da proliferação celular observada na linhagem T24. Observamos que a linhagem T24 tratada na dose de 150  $\mu\text{g/mL}$  com a FPAQ apresentou morte celular apoptótica (Fig. 5), estando de acordo com os dados demonstrados previamente na literatura (Bacher et al., 2006; De Martino et al., 2006;

Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009). Estudos indicam que *Uncaria tomentosa* promove bloqueio no ciclo celular na fase G0/G1 ou G2/M, dependendo do extrato, da fração ou do composto isolado utilizado (Bacher et al., 2006; Cheng et al., 2007; Rinner et al., 2009; Pilarski et al., 2010). Outros autores, por sua vez, demonstram que esta espécie não induz parada no ciclo celular (Akeesson et al., 2003a; Pilarski et al., 2010). De acordo com estes dois últimos estudos, nós demonstramos que a FPAQ de *Uncaria tomentosa* não induz parada no ciclo celular (Fig. 6). Provavelmente não observamos parada no ciclo celular no presente estudo porque utilizamos uma fração purificada contendo somente glicosídeos do ácido quinóico (Tabela 1), diferentemente dos demais estudos onde foram utilizados alcalóides isolados, frações de alcalóides ou diferentes extratos de *Uncaria tomentosa*. Além disso, uma comparação direta entre estudos é muito difícil, uma vez que a composição dos extratos pode variar conforme o método extrativo empregado, resultando em diferentes respostas celulares. Ainda há a questão da variabilidade sazonal e regional da planta (Allen-Hall et al., 2010; Pilarski et al., 2010). Ademais, é importante ressaltar que, na maioria das vezes, a resposta da célula tumoral a uma droga citotóxica é uma parada no ciclo celular, o que é considerado uma das razões mais frequentes da ineficácia da quimioterapia, uma vez que a célula cancerígena pode continuar sua atividade proliferativa após a retirada da droga. Com base nessas evidências, as pesquisas têm focado na descoberta de drogas que seletivamente induzam a apoptose em células tumorais que estão em proliferação (Cheng et al., 2007; Pilarski et al., 2010). Dessa forma, nossos resultados preliminares sugerem que a toxicidade celular da FPAQ sobre as células T24 pode ser causada por morte apoptótica e não por parada no ciclo celular, trazendo perspectivas para a continuidade do estudo.



Uma enzima amplamente distribuída e com alta expressão em muitos tumores sólidos é a ecto-5'-nucleotidase/CD73. Esta enzima é responsável por catalisar a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados à adenosina (Zimmermann, 1992; Spychala, 2000). Além de sua função catalítica, esta enzima parece estar envolvida com eventos de adesão, promovendo invasão tumoral e o desenvolvimento do câncer (Sadej et al., 2006; Zhou et al., 2007; Bavaresco et al., 2008). Stella et al. (2009) demonstraram que a ecto-5'-nucleotidase/CD73 provavelmente está envolvida na tumorigênese do câncer de bexiga, como já evidenciado em outras células tumorais. Nesse contexto, avaliamos se a FPAQ seria capaz de alterar a atividade desta enzima. No entanto, nenhuma das concentrações testadas, em nenhum tempo ou condição de tratamento avaliado foi capaz de alterar a atividade enzimática da ecto-5'-nucleotidase/CD73, excluindo, desta maneira, seu envolvimento na morte das células tumorais T24 (Fig. 7A e B).

Como já demonstrado, a morte celular pode ser induzida através de certos receptores de superfície celular (Ashkenazi, Dixit, 1998). É relatado que receptores de adenosina podem agir como mediadores de angiogênese, de proliferação e podem também suprimir a resposta imunológica anticâncer (Spychala, 2000). Além disso, tem sido demonstrado que receptores de adenosina A3 são altamente expressos em células tumorais e, dependendo de sua ativação, têm sido associados a eventos pró- e antiapoptóticos, além da regulação do ciclo celular. Assim, receptores de adenosina A3 são considerados potenciais marcadores para terapia do câncer, uma vez que tanto agonistas quanto antagonistas podem representar um possível agente terapêutico anticâncer (Kim et al., 2010). Neste contexto, avaliamos o envolvimento do receptor de adenosina A3 na inibição mediada pela FPAQ na proliferação das células T24. Nossos resultados demonstraram que o antagonista do receptor de adenosina A3, o MRS 1220, não alterou o efeito antiproliferativo induzido pela FPAQ em nenhum dos tempos

avaliados (Fig.8A e B). Assim, estes resultados excluem o envolvimento da enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 e do receptor de adenosina A3 na morte das células tumorais T24, induzida pela FPAQ.

No desenvolvimento e na progressão do câncer de bexiga múltiplas alterações genéticas estão envolvidas (Tanaka et al., 2000). PTEN, um gene supressor tumoral, é uma fosfatase multifuncional que antagoniza a via da PI3K por desfosforilar seu produto final, o PIP3, sendo considerado um passo regulatório muito importante (Wu et al., 2004; Saal et al., 2007; Knowles et al., 2009), uma vez que a perda de atividade da PTEN leva à permanente ativação da via de sinalização da PI3K/Akt (Osaki et al., 2004). Estudos têm demonstrado que a expressão reduzida da PTEN é comum em câncer de bexiga (Knowles et al., 2009). Considerando esta informação, investigamos se a apoptose induzida pela FPAQ nas células T24 poderia estar relacionada ao aumento do imunoconteúdo da PTEN. Contudo, nossos resultados evidenciaram que não houve alteração no imunoconteúdo da proteína PTEN, indicando que esta via não está envolvida na inibição das células T24 depois de 48 h (Fig. 9B) e 72 h (dados não mostrados) de tratamento.

Outra proteína investigada foi a ERK (cinase reguladora de sinal extracelular). Recentemente, tem sido demonstrado que a desregulação da cascata da ERK resulta em várias doenças, cujas mutações de componentes *upstream* da ERK são responsáveis por mais da metade de todos os cânceres (Wortzel, Seger, 2011). A análise de *Western blot* demonstrou que o tratamento com a FPAQ não foi capaz de alterar a fosforilação/ativação desta proteína (Fig. 9A). Desta forma, esta via também não está envolvida na apoptose induzida pela FPAQ. Além disso, a ERK pode fosforilar muitas proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (McCubrey et al., 2007) e quando ativada, promover parada no ciclo por indução da p21 (Tang et al., 2002). Neste sentido,

considerando que a FPAQ não causou parada no ciclo celular e que o imunocontéudo da ERK não foi alterado, estes dados se confirmam.

Atualmente é amplamente estabelecido que a superexpressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma característica comum em vários tumores, incluindo o câncer de bexiga (Méric et al., 2006; Huang, Chen, 2011). Numerosos estudos pré-clínicos têm demonstrado resultados promissores com tratamentos combinados de quimioterápicos e/ou radioterápicos com inibidores da COX (Shimada et al., 2011). Uma vez que tais estudos encorajam o uso de inibidores da COX como terapia anticâncer, decidimos avaliar o possível potencial da FPAQ em inibir a proteína COX-2. Nossos resultados indicaram que a FPAQ exerce um potencial efeito inibitório sobre a COX-2 em baixas concentrações depois de 48 e 72 h de tratamento, no câncer de bexiga humano T24 (Fig. 10 e 11). Uma vez que o tabaco é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga, é importante salientar que tem sido evidenciado que o tabagismo induz o imunocontéudo da COX-2 em uma variedade de células, sugerindo sua influência na progressão deste câncer. Tabagismo também pode induzir o imunocontéudo do gene regulador da COX-2, o NF- $\kappa$ B, e alterações nos produtos *downstream* deste gene, como VEGF, MMP-9 e ciclina D1 têm sido associados com proliferação, angiogênese, invasão e ciclo celular no câncer de bexiga (Huang, Chen, 2011). De fato, a inibição destes fatores pelo uso de inibidores seletivos da COX-2 é essencial para diminuir o crescimento tumoral. Assim, assumimos que a ativação da apoptose pela FPAQ nas células T24 pode ser mediada pela inibição da COX-2, uma vez que muitos estudos experimentais têm demonstrado a relação positiva entre a superexpressão da COX-2 e a inibição da apoptose (Méric et al., 2006). Contudo, no momento se torna necessário avaliar o imunocontéudo do NF- $\kappa$ B nuclear e citoplasmático para verificar se a FPAQ também seria capaz de alterar seu

imunoconteúdo, uma vez que esta proteína pode induzir o imunoconteúdo da COX-2 e, uma consequente inibição do NF-κB poderia levar a uma redução no imunoconteúdo desta ciclooxigenase (Lou et al., 2010), conduzindo, desta forma, à morte apoptótica. Estudos prévios têm demonstrado que o extrato etanólico de *Uncaria tomentosa* foi capaz de inibir a ativação do fator nuclear transcripcional NF-κB (Allen-Hall et al., 2010). Assim, uma vez que observamos que tanto o extrato bruto quanto a FPAQ de *Uncaria tomentosa* inibem a proliferação de células tumorais de bexiga, supomos que estes possam estar interferindo com alguma via maior de transdução de sinal, como o NF-κB, controlando o crescimento celular e/ou divisão. Sugerimos que a inibição deste gene poderia, ao menos parcialmente, causar a inibição da proliferação celular, uma vez que no câncer, a proliferação ocorre via produção local de fatores de crescimento, os quais são eventos regulados por vários fatores de transcrição, como o NF-κB (Sandoval et al., 2002). No entanto, estudos complementares são necessários para dar suporte a esta hipótese.

Em resumo, no Capítulo 1, demonstramos que a FPAQ, e não a FPAO, tem um grande potencial para inibir a proliferação e a viabilidade das linhagens celulares de câncer de bexiga humano T24 e RT4. Nas células T24, a FPAQ induziu apoptose por inibição da proteína COX-2. Embora mais investigações sejam necessárias para a compreensão do exato mecanismo molecular envolvido na apoptose induzida pela FPAQ, nós hipotetizamos que o forte efeito inibitório da COX-2 seja devido a uma inibição do NF-κB, o qual é uma proteína *upstream* da COX-2 e também pode promover a apoptose.

Conforme comentando anteriormente, devido à ampla utilização de cascas e raízes de *Uncaria tomentosa* para inflamações crônicas e doenças do trato urinário, no Capítulo 2, decidimos investigar o efeito do extrato bruto, da FPAO e da FPAQ de

*Uncaria tomentosa* nos eventos inflamatórios e nociceptivos em um modelo de cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida em camundongos. Frente ao comportamento nociceptivo induzido pela CYP, demonstramos que nenhum dos tratamentos administrados foi capaz de reduzir as alterações comportamentais (Fig. 1A-C). Quanto à análise macroscópica das bexigas, observamos que o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* somente foi eficaz em reduzir o edema induzido pela CYP na maior dose testada (200 mg/Kg) (Fig. 3A). No entanto, este parâmetro não foi confirmado quando o peso das bexigas foi analisado (Fig. 4A).

Assim como nos experimentos *in vitro* apresentados no Capítulo 1, a FPAO novamente não demonstrou redução dos demais parâmetros avaliados, contradizendo muitos dados da literatura, os quais mostram que muitas das ações biológicas da *Uncaria tomentosa* estão relacionadas aos seus constituintes alcaloídicos (García Prado et al., 2007; Pilarski et al., 2007; Rinner et al., 2009). Ademais, observamos que os animais tratados com a dose de 50 ou 100 mg/Kg da FPAO apresentaram hemorragia acentuada (Fig 2B), bem como o edema (Fig 3B) e o peso das bexigas (Fig 4B) foram potencializados, em comparação ao grupo CYP + salina. No entanto, excluímos a hipótese das dosagens avaliadas serem tóxicas *per se* em nível de sistema urinário, pois 2 grupos de animais foram tratados somente com esta fração, nas doses de 50 ou 100 mg/Kg, sendo que a hemorragia, o edema e o peso das bexigas não foram alterados de forma significativa. Assim, é possível inferir que de alguma forma os constituintes da FPAO interagem com a CYP, aumentando os parâmetros inflamatórios decorrentes da cistite hemorrágica.

Com base na Tabela 1, observamos que o extrato bruto de *Uncaria tomentosa* apresenta praticamente a mesma quantidade de glicosídeos do ácido quinóico (13,55 mg/Kg) na dose de 200 mg/Kg, semelhante à quantidade encontrada na FPAQ na dose

de 50 mg/Kg (10,89 mg/Kg). Contudo, a FPAQ demonstrou intensa atividade quando comparado ao extrato bruto. Atribuimos esta ausência de atividade do extrato bruto à presença de alcalóides, os quais podem estar impedindo a ação dos glicosídeos do ácido quinóico, uma vez que observamos que a FPAQ em altas concentrações demonstrou efeito contrário ao descrito na literatura, quando a avaliação bruta da bexiga foi realizada. Além disso, se analisarmos o conteúdo de alcalóides no extrato bruto na dose de 200 mg/Kg (3,07 mg/Kg), observaremos que a quantidade de alcalóides presentes na FPAQ na dose de 50 mg/Kg é semelhante (3,14 mg/Kg), dando suporte à nossa hipótese.

Em relação à atividade anti-inflamatória observada em outros artigos para o extrato bruto, observamos diferença quanto ao método extrativo empregado, bem como a concentração e o tipo de solvente utilizados, dificultando uma comparação entre os estudos.

Quanto à FPAQ, esta se mostrou uma boa candidata para dar prosseguimento aos estudos *in vivo*, uma vez que foi observada redução significativa do edema (Fig. 3C) e do peso bruto das bexigas (Fig. 4C), resultando em atividade similar àquela obtida com o composto de referência Mesna. Quanto à hemorragia (Fig. 2C), observamos uma tendência à diminuição deste parâmetro, porém este resultado ainda precisa ser confirmado.

Recentemente, tem sido sugerido que o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a COX-2 estão diretamente envolvidos na patogênese da cistite (Kiuchi et al., 2009). Considerando que no estudo *in vitro* com células tumorais de bexiga (Capítulo 1) demonstramos que a FPAQ exibiu um forte potencial de inibição da proteína COX-2 (Fig. 10 e 11) e, tendo em vista, que todos estes mediadores inflamatórios citados anteriormente são rigorosamente regulados pelo NF- $\kappa$ B, este novamente se torna um marcador atrativo

para provavelmente, *in vivo* (Capítulo 2), prevenir os efeitos colaterais induzidos pela CYP. Apesar de mais estudos estarem sendo realizados a fim de comprovar esta proposição, os resultados aqui apresentados sugerem que a FPAQ de *Uncaria tomentosa* pode, no futuro, se tornar um agente terapêutico potencial no tratamento de tumores e inflamações da bexiga.

## 5. CONCLUSÕES

- As frações purificadas de *Uncaria tomentosa* apresentaram perfis distintos, sendo a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico (FPAQ) mais efetiva que a fração purificada de alcalóides oxindólicos (FPAO), tanto para as avaliações realizadas no modelo *in vitro* de tumor de bexiga quanto para as avaliações realizadas no modelo *in vivo* de cistite hemorrágica;

- A FPAQ inibiu a proliferação e a viabilidade celular das linhagens T24 e RT4 de tumor de bexiga humana com indução de apoptose e sem parada no ciclo celular na linhagem T24;

- A FPAQ causou inibição expressiva da proteína COX-2 sem promover alteração no imunconteúdo das proteínas PTEN e ERK na linhagem T24;

- O tratamento das células T24 com a FPAQ não alterou a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase/CD73 nem a sinalização do receptor de adenosina A3;

- Na avaliação da atividade nociceptiva e anti-inflamatória em modelo de cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida em camundongos, a FPAQ foi a mais efetiva promovendo uma redução significativa do edema e do peso das bexigas dos animais tratados.



## 6. PERSPECTIVAS

Com o intuito de elucidarmos os mecanismos pelos quais a FPAQ exerce suas ações, nossas perspectivas para a continuação do presente estudo são:

### *Linhagens celulares de tumor de bexiga:*

- Avaliar o efeito da FPAQ no ciclo celular, no tipo de morte e no imunocontéudo das proteínas PTEN, ERK e COX-1/COX-2 da linhagem RT4, a fim de realizarmos uma comparação entre as duas linhagens celulares de câncer de bexiga;

- Avaliar na linhagem T24 o imunocontéudo das proteínas PTEN e ERK em tempos mais iniciais aos tempos aqui avaliados, uma vez que nos tempos de 48 e 72 h essas proteínas já podem ter retornado aos níveis basais;

- Avaliar o imunocontéudo citoplasmático e nuclear de NF- $\kappa$ B na linhagem T24, com o intuito de tentar elucidar o mecanismo pelo qual a FPAQ está levando a morte celular;

- Avaliar o envolvimento da via da PI3K/Akt, considerando que vários estudos têm demonstrado mutações e alterações gênicas nesta via no câncer de bexiga.

### *Modelo de cistite hemorrágica induzida pela CYP:*

- Analisar através de análise histológica a migração celular de neutrófilos e macrófagos e as camadas teciduais da bexiga após o tratamento com a FPAQ;

- Avaliar a produção local de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , após tratamento com a FPAQ;

- Avaliar o imunocontéudo da COX-2 (imuno-histoquímica e *Western blot*) e do NF- $\kappa$ B (*Western blot*) na bexiga dos animais tratados;

- Avaliar a expressão da enzima ecto-5' nucleotidase/CD73 na bexiga dos animais com cistite hemorrágica induzida pela CYP e após tratamento com a FPAQ.

## 7. REFERÊNCIAS

AGUILAR J.L.; ROJAS P.; MARCELO A.; PLAZA A.; BAUER R.; REININGER E.; KLAAS C.A.; MERFORT I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 271-276, 2002.

AKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.W.; LEANDERSON T.; IVARS F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- $\kappa$ B activity without inducing cell death. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1889–1900, 2003a.

AKESSON C.; PERO R.W.; IVARS F. C-Med 100, a hot water extract of *Uncaria tomentosa*, prolongs lymphocyte survival *in vivo*. **Phytomedicine**, v.10, p.23-33, 2003b.

AKESSON C.; LINDGREN H.; PERO R.W.; LEANDERSON T.; IVARS F. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100<sup>®</sup>. **International Immunopharmacology**, v.5, p.219–229, 2005.

ALLEN-HALL L.; CANO P.; ARNASON J.T.; ROJAS R.; LOCK O.; LAFRENIE R.M. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.312–317, 2007.

ALLEN-HALL L.; ARNASON J.T.; CANO P.; LAFRENIE R.M. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.685–693, 2010.

AMARAL S.; MIRA L.; NOGUEIRA J.M.F.; DA SILVA A.P.; FLORENÇIO M.H. Plant extracts with anti-inflammatory properties - A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure–antioxidant activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.1876–1883, 2009.

AQUINO R.; DE S.F.; PIZZA C.; CONTI C.; STEIN M.L. Plant metabolites. Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovis acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.52, n.4, p.679-685, 1989.

AQUINO R.; DE FEO V.; DE SIMONE F.; PIZZA C.; CIRINO G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.2, p.453-459, 1991.

ASHKENAZI A.; DIXIT V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, n.5381, p. 1305-1308, 1998.

BACHER N.; TIEFENTHALER M.; STURM S.; STUPPNER H.; AUSSERLECHNER M.J.; KOFLER R.; KONWALINKA, G. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, v.132, p.615–622, 2005.

BACHER N.; TIEFENTHALER M.; STURM S.; STUPPNER H.; AUSSERLECHNER M.J.; KOFLER R.; KONWALINKA, G. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1 –arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, v.132, n.5, p.615-622, 2006.

BAI Y.; MAO Q.Q.; QIN J.; ZHENG X.Y.; WANG Y.B.; YANG K.; SHEN H.F.; XIE L.P. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Japanese Cancer Association**, v. 101, n.2, p.488-493, 2010.

BATISTA C.K.L.P.; BRITO G.A.C.; SOUZA M.L.P.; LEITÃO B.T.A.; CUNHA F.Q.; RIBEIRO R.A. A model of hemorrhagic cystitis induced with acrolein in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.1475-1481, 2006.

BAVARESCO L.; BERNARDI A.; BRAGANHOL E.; CAPPELLARI A.R.; ROCKENBACH L.; FARIAS P.F.; WINK M.R.; DELGADO-CAÑEDO A.; BATTASTINI A.M.O. The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n.319, p.61-68, 2008.

BHATIA K.; KAUR M.; ATIF F.; ALI M.; REHMAN H.; RAHMAN S.; RAISUDDIN S. Aqueous extract of *Trigonella foenum-graecum* L. ameliorates additive urotoxicity of buthionine sulfoximine and cyclophosphamide in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1744-1750, 2006.

BHATIA K.; AHMAD F.; RASHID H.; RAISUDDIN S. Protective effect of S-allylcysteine against cyclophosphamide-induced bladder hemorrhagic cystitis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3368-3374, 2008.

BLADDER CANCER. Disponível em: < [http://www.iamaguchi.com/page\\_15.html](http://www.iamaguchi.com/page_15.html) >  
Acesso em: 04 fev. 2012.

BURNSTOCK G. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. **British Journal of Urology International**, v. 107, p. 192-204, 2011.

CHENG A.C.; JIAN C.B.; HUANG Y.T.; LAI C.S.; HSU P.C.; PAN M.H. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome *c* release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2206–2218, 2007.

CHEUK D.K.; LEE T.L.; CHIANG A.K.; HA S.Y.; LAU Y.L.; CHAN G.C. Risk factors and treatment of hemorrhagic cystitis in children who underwent hematopoietic stem cell transplantation. **Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 20, n.1, p.73-81, 2007.

CISNEROS F.J.; JAYO M.; NIEDZIELA L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.355-364, 2005.

COTRAN R.S.; KUMAR V.; COLLINS T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CROCITTO L.E.; SIMPSON J.F.; WILSON T.G. Bladder augmentation in the prevention of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in the rats model. **British Journal of Urology**, v.78, n.4, p.530-533, 1996.

DANTAS A.C.B.; BATISTA-JÚNIOR F.F.A.; MACEDO L.F.; MENDES M.N.C.; AZEVEDO I.M.; MEDEIROS A.C. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemohrragic cystitis in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n.1, p.43-46, 2010.

DE MARTINO L.; MARTINOT J.L.S.; FRANCESCHELLI S.; LEONE A.; PIZZA C.; DE FEO V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p.91-94, 2006.

DREIFUSS A.A.; BASTOS-PEREIRA A.L.; ÁVILA T.V.; SOLEY B.S.; RIVERO A.J.; AGUILAR J.L.; ACCO A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an *in vivo* carcinoma model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.127-133, 2010.

EBERLIN S.; DOS SANTOS L.M.; QUEIROZ M.L. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected

with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v.5, n.7-8, p.1235-1246, 2005.

FARIAS I.; ARAÚJO M.C.; ZIMMERMANN E.S.; DALMORA S.L.; BENEDETTI A.L.; ALVAREZ-SILVA M.; ASBAHR A.C.C.; BERTOL G.; FARIAS J.; SCHETINGER M.R.C. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p.856-863, 2011.

GARCÍA PRADO E.; GARCÍA GIMENEZ M.D.; DE LA PUERTA VÁZQUEZ R.; ESPARTERO SÁNCHEZ J.L.; SÁENZ RODRÍGUEZ M.T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa*, on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v.14, n.4, p. 280-284, 2007.

GIMÉNEZ D.G.; PRADO E.G.; RODRÍGUEZ T.S.; ARCHE A.F.; DE LA PUERTA R. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark on human Ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. **Planta Medica**, v.76, p.133-136, 2010.

HARDIN S.R. Cat's claw: An Amazonian vine decreases inflammation in osteoarthritis. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.13, p.25-28, 2007.

HEITZMAN M.E.; NETO C.C.; WINIARZ E.; VAISBERG A.J.; HAMMOND G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p.89-98, 2005.



HERR H.W.; WARTINGER D.D.; FAIR W.R.; OETTGEN H.F. Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: a 10-year followup. **The Journal of Urology**, v.147, n.4, p.1020-1023, 1992.

HOSTETTMANN K.; QUEIROZ E.F.; VIERIA P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Paulo: EdUFSCar, 2003.

HUAN S.K.H.; LEE H.H.; LIU D.Z.; WU C.C.; WANG C.C. Cantharidin-induced cytotoxicity and cyclooxygenase 2 expression in human bladder carcinoma cell line. **Toxicology**, v. 223, p.136-143, 2006.

HUANG R.Y.; CHEN G.G. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1815, p.158-169, 2011.

INCA: **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR> Acesso em: 15 dez. 2011.

JACOBS B.L.; LEE C.T.; MONTIE J.E. Bladder Cancer in 2010: How far have we come? **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.60, n.4, p.244-272, 2011.

JEMAL A.; SIEGEL R.; XU J.; WARD E. Cancer Statistics, 2010. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, n.5, v.60, p.277-300, 2010.

KEPLINGER K.; LAUS G.; WURM M.; DIERICH M.P.; TEPPNER H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.23-34, 1999.

KIM H.; KANG J.W.; LEE S.; CHOI W.J.; JEONG L.S.; YANG Y.; HONG J.T.; YOON D.Y. A3 adenosine receptor antagonist, truncated Thio-CI-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. **Anticancer Research**, v.30, p.2823-2830, 2010.

KIUCHI H.; TAKAO T.; YAMAMOTO K.; NAKAYAMA J.; MIYAGAWA Y.; TSUJIMURA A.; NONOMURA N.; OKUYAMA A. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kB phosphorylation. **The Journal of Urology**, v.181, p.2339-2348, 2009.

KNOWLES M.A.; PLATT F.M.; ROSS R.L.; HURST C.D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. **Cancer Metastasis Review**, v.28, p.305-316, 2009.

LAMM D.L.; THOR D.E.; HARRIS S.C.; REYNA J.A.; STOGDILL V.D.; RADWIN H.M. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. **The Journal of Urology**, v.124, n.1, p.38-40, 1980.

LEE S.J.; KIM H.M.; CHO Y.H.; PARK K.; KIM E.J.; JUNG K.H.; KIM C.H.; KIM W.J.; MOON S.K. Aqueous extract of *Magnolia officinalis* mediates proliferative

capacity, p21WAF1 expression and TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activity in human urinary bladder cancer 5637 cells; involvement of p38 MAP kinase. **Oncology Reports**, v. 18, p.729-736, 2007.

LEE S.J.; CHO Y.H.; PARK K.; KIM E.J.; KANG B.S.; JUNG K.H.; KIM C.H.; KIM W.J.; MOON S.K. Inhibitory effects of the aqueous extract of *Magnolia officinalis* on the responses of human urinary bladder cancer 5637 cells *in vitro* and mouse urinary bladder tumours induced by *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p.20-27, 2009.

LEMAIRE I.; ASSINEWE V.; CANO P.; AWANG D.V.C.; ARNASON J.T. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.109-115, 1999.

LOU G.G.; YAO H.P.; XIE L.P. *Brucea javanica* oil induces apoptosis in T24 bladder cancer cells via upregulation of caspase-3, caspase-9, and inhibition of NF- $\kappa$ B and COX-2 expressions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.38, n.3, p.613-624, 2010.

MA L.; FEUGANG J.M.; KONARSKI P.; WANG J.; LU J.; FU S.; MA B.; TIAN B.; ZOU C.; WANG Z. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.2275-2285, 2006.

MACEDO F.Y.B.; BALTAZAR F.; MOURÃO L.C.; ALMEIDA P.R.C.; MOTA J.M.S.C.; SCHMITT F.C.; RIBEIRO R.A. Induction of COX-2 expression by acrolein in the rat model of hemorrhagic cystitis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.59, p.425-430, 2008.

MANIKANDAN R.; KUMAR S.; DORAIRAJAN L.N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. **Indian Journal of Urology**, v.26, n.2, p.159-166, 2010.

MCCUBREY J.A.; STEELMAN L.S.; CHAPPELL W.H.; ABRAMS S.L.; WONG E.W.T.; CHANG F.; LEHMANN B.; TERRIAN D.M.; MILELLA M.; TAFURI A.; STIVALA F.; LIBRA M.; BASECKE J.; EVANGELISTI C.; MARTELLI A.M.; FRANKLIN R.A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, n.8, p.1263-1284, 2007.

MEMON A.A.; CHANG J.W.; OH B.R.; YOO Y.J. Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression. **Cancer Detection and Prevention**, v.29, p.249-255, 2005.

MÉRIC J.B.; ROTTEY S.; OLAUSSEN K.; SORIA J.C.; KHAYAT D.; RIXE O.; SPANO J.P. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. **Oncology Hematology**, v.59, p.51-64, 2006.

MORAIS M.M.; BELARMINO-FILHO J.N.; BRITO G.A.C.; RIBEIRO R.A. Pharmacological and histopathological study of cyclophosphamide-induced

hemorrhagic cystitis - comparison of the effects of dexamethasone and Mesna. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.10, p.1211-1215, 1999.

MUHAMMAD I.; DUNBAR D.C.; KHAN R.A.; GANZERA M.; KHAN I.A. Investigation of Unã De Gato I. 7-Deoxyloganin acid and <sup>15</sup>N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.57, n.5, p.781-785, 2001.

NEHEMAN A.; NATIV O.; MOSKOVITZ B.; MELAMED Y.; STEIN A. Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis. **British Journal of Urology International**, v.96, n.1, p.107-109, 2005.

NETTO JUNIOR, N. R. **Urologia Prática**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

NEWMAN D.J.; CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NGUYEN-KHUONG T.; WHITE M.Y.; HUNG T.T.; SEETO S.; THOMAS M.L.; FITZGERALD A.M.; MARTUCCI C.E.; LUK S.; PANG S.F.; RUSSELL P.J.; WALSH B.J. Alterations to the protein profile of bladder carcinoma cell lines induced by plant extract MINA-05 *in vitro*. **Proteomics**, v.9, p.1883-1892, 2009.

OSAKI M.; OSHIMURA M.; ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v.9, n.6, p.667-676, 2004.

OZAWA A.; TANJI N.; KIKUGAWA T.; SASAKI T.; YANAGIHARA Y.; MIURA N.; YOKOYAMA M. Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor. **British Journal of Urology International**, p.1-6, 2009.

PAVEI C. **Obtenção e avaliação de frações purificadas e farmacologicamente ativas presentes em *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC. (unha-de-gato)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2010. Tese de Doutorado.

PHILIPS B.J.; COYLE C.H.; MORRISROE S.N.; CHANCELLOR M.B.; YOSHIMURA N. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins. **Biomedical Research**, v.30, n.4, p.207-215, 2009.

PILARSKI R.; POCZEKAJ-KOSTRZEWSKA, M.; CIESIOLKA D.; SZYFTER K.; GULEWICZ K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacological Reports**, v.59, p.565-572, 2007.

PILARSKI R.; FILIP B.; WIETRZYK J.; KURÁS M.; GULEWICZ K. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v.17, n.14, p.1133-1139, 2010.

POLLITO P.A.Z. **Dendrologia, anatomia do lenho e status de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre,**

**Brasil.** São Paulo: Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2004. Tese de Doutorado.

POLLITO P.A.Z.; TOMAZELLO M. Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v.36, n.2, p.169-176, 2006.

POLLOCK R.E.; DOROSHOW J.H.; KHAYAT D.; NAKAO A.; O'SULLIVN B. **Manual de Oncologia Clínica da UICC.** 8 ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006.

PORTH C.M. **Fisiopatologia.** 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

QIAN Y.; DENG J.; XIE H.; GENG L.; ZHOU L.; WANG Y.; YIN S.; FENG X.; ZHENG S. Regulation of TLR4-induced IL-6 responses in bladder cancer cells by opposing actions of MAPK and PI3K signaling. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**, v.135, p.379-386, 2009.

QIN J.; XIE L.P.; ZHENG X.Y.; WANG Y.B.; BAI Y.; SHEN H.F.; LI L.C.; DAHIYA R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.354, p.852-857, 2007.

QUINTERA J.C.; UGAZ O.L. Uña de gato – *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Revista de Fitoterapia**, v.3, p.5-16, 2003.

RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J.M.; MOORE P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

REIS S.R.I.N.; VALENTE L.M.M.; SAMPAIO A.L.; SIANI A.C.; GANDINI M.; AZEREDO E.L.; D'AVILA L.A.; MAZZEI J.L.; HENRIQUES M.G.M.; KUBELKA C.F. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v.8, p.468-476, 2008.

RINNER B.; LI Z.X.; HAAS H.; SIEGL V.; STURM S.; STUPPNER H.; PFRAGNER R. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. **Anticancer Research**, v.29, p.4519-4528, 2009.

RIVA L.; CORADINI D.; DI FRONZO G.; DE FEO V.; DE TOMMASI N.; DE SIMONE F.; PIZZA C. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, v.21, p.2457-2462, 2001.

RIZZI R.; RE F.; BIANCHI A.; DE FEO V.; DE SIMONE F.; BIANCHI L.; STIVALA L.A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.38, p.63-77, 1993.



SAAL L.H.; JOHANSSON P.; HOLM K.; GRUYBERGER-SAAL S.K.; SHE Q.B.; MAURER M.; KOUJAK S.; FERRANDO A.A.; MALMSTRO P.; MEMEO L.; ISOLA J.; BENDAHL P.O.; ROSEN N.; HIBSHOOSH H.; RINGNE M.; BORG A.; PARSONS R. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.18, p.7564-7569, 2007.

SADEJ R.; SPYCHALA J.; SKLADANOWSKI A.C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. **Melanoma Research**, v.16, n.3, p.213-222, 2006.

SANDOVAL-CHACÓN M.; THOMPSON J.H.; ZHANG X.J.; LIU X.; MANNICK E.E.; SANDOWSKA-KROWICKA H.; CHARBONNET R.M.; CLARK D.A.; MILLER M.S.J. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF- $\kappa$ B. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p.1279-1289, 1998.

SANDOVAL M.; CHARBONNET R.M.; OKUHAMA N.N.; ROBERTS J.; KRENOVA Z.; TRENTACOSTI A.M.; MILLER M.J.S. Cat's claw inhibits TNF- $\alpha$  production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.1, p.71-78, 2000.

SANDOVAL M.; OKUHAMA N.N.; ZHANG X.J.; CONDEZO L.A.; LAO J.; ANGELES F.M.; MUSAH R.A.; BOBROWSKI P.; MILLER M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria*

*guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v.9, p.325-337, 2002.

SANTOS JR A.A.; LEAL P.C.; EDELWEISS M.I.A.; LOPES T.G.; CALIXTO J.B.; MORRONE F.B.; CAMPOS M.M. Effects of the compounds MV8608 and MV8612 obtained from *Mandevilla velutina* in the model of hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v.382, n.5-6, p.339-407, 2010.

SHENG Y.; PERO R.W.; AMIRI A.; BRYNGELSSON C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v.18, n.5, p.3363-3368, 1998.

SHENG Y.; BRYNGELSSON C.; PERO R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.115-126, 2000a.

SHENG Y.; PERO R.W.; WAGNER H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v.7, n.2, p.137-143, 2000b.

SHENG Y.; AKESSON C.A.; HOLMGREN K.; BRYNGELSSON C.; GIAMAPA V.; PERO R.W. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p.577-584, 2005.

SHIMADA K.; ANAI S.; MARCO D.A.; FUJIMOTO K.; KONISHI N. Cyclooxygenase 2-dependent and independent activation of Akt through casein kinase 2 $\alpha$  contributes to human bladder cancer cell survival. **BioMed Central Urology**, v.8, p.1-11, 2011.

SPENCE R.A.J.; JOHNSTON P.G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacology & Therapeutics**, n.87, p.161-173, 2000.

STEARNS V.; SCHNEIDER B.; HENRY N.L.; HAYES D.F.; FLOCKHART D.A. Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.11, p.886-893, 2006.

STELLA J.; BAVARESCO L.; BRAGANHOL E.; ROCKENBACH L.; FARIAS P.F.; WINK M.R.; AZAMBUJA A.A.; BARRIOS C.H.; MORRONE F.B.; BATTASTINI A.M.O. Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. **Urologic Oncology** v.28, p.260-267, 2009.

STUPPNER H.; STURM S.; GEISEN G.; ZMIAN U.; KONWALINKA G. A differential sensitivity of oxindole alkaloids to normal and leukemic cell lines. **Planta Medica**, v.59, 1993.

SWELLAM T.; ANAGA N.M.; ONOZAWA M.; HATTORI K.; KAWAI K.; SHIMAZUI T.; AKAZA H. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: *In vivo* and *in vitro* studies. **International Journal of Urology**, v.10, p.213-219, 2003.

SYRIMIS A. *Uncaria tomentosa*: A review. **British Journal of Phytotherapy**, v.5, n.1, p.29-31, 1999.

TANAKA M.; KOUL D.; DAVIES M.A.; LIEBERT M.; STECK P.A.; GROSSMAN H.B. MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. **Oncogene**, v.19, p.5406-5412, 2000.

TANG D.; WU D.; HIRAO A.; LAHTI J.M.; LIU L.; MAZZA B.; KIDD V.J.; MAK T.W.; INGRAM A.J. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.15, p.12710-12717, 2002.

TRAXER O.; DESGRANDCHAMPS F.; SEBE P.; HAAB F.; LE DUC A.; GATTEGNO B.; THIBAUT P. Cystite hémorragique: étiologie et traitement. **Progrès in Urologie**. v.11, n.4, p.591-601, 2001.

VALENTE L.M.M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa*] (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.: Um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. **Revista Fitos**, v.2, n.1, p.48-48, 2006.

WAGNER H.; KREUTZKAMP B.; JURCIC K. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytose-steigernde Wirkung. **Planta Medica**, v.51, n.5, p.419-423, 1985.

WONG T.M.; YEO W.; CHAN L.W.; MOK T.S. Hemorrhagic pyelitis, ureteritis, and cystitis secondary to cyclophosphamide: case report and review of the literature. **Gynecologic Oncology**, v.76, n.2, p.223–225, 2000.

WORTZEL I.; SEGER R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. **Genes & Cancer**, v.2, n.3, p.195-209, 2011.

WU X.; OBATA T.; KHAN Q.; HIGHSHAW R.A.; DE VERE WHITE R.; SWEENEY C. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. **British Journal of Urology International**, v.93, p.143-150, 2004.

YOHAN N.L.; BINGAMAN C.N.; DUMONT A.L.; YOO L.I. Phosphatidylinositol 3'-kinase, mTOR, and Glycogen synthase kinase-3 beta mediated regulation of p21 in human urothelial carcinoma cells. **BioMed Central Urology**, v.24, p.11-19, 2011.

YUNES R.A., CALIXTO J.B. **Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZENG K.; THOMPSON K.E.; YATES C.R.; MILLER D.D. Synthesis and biological evaluation of quinic acid derivatives as anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p.5458-5460, 2009.

ZHOU P.; ZHI X.; ZHOU T.; CHEN S.; LI X.; WANG L.; YIN L.; SHAO Z.; OU Z. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. **Cancer Biology & Therapy**, v.6, n.3, p.426-431, 2007.

ZIMMERMANN H. 5'-Nucleotidase-molecular structure and functional aspects. **The Biochemical Journal**, n.285, p.345-365, 1992.

ZUPANCIC D.; JEZERNIK K.; VIDMAR G. Effect of melatonin on apoptosis, proliferation and differentiation of urothelial cells after cyclophosphamide treatment. **Journal of Pineal Research**, v. 44, p.299-306, 2008.

## 8. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Camadas que compõem a bexiga .....	1
<b>Figura 2.</b> Metabolismo da ciclofosfamida.....	3
<b>Figura 3.</b> Extensão do câncer de bexiga.....	7
<b>Figura 4.</b> <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC.....	13

## 9. LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos tumores de bexiga segundo a classificação TNM.....	9
---	---



## 10. ANEXOS

### 1. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 127/11 – CEUA

Porto Alegre, 03 de outubro de 2011.

Senhora Pesquisadora:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 11/00243 intitulado: **“Efeito do tratamento in vivo com frações purificadas bioativas de Uncaria Tomentosa (WILLD) DC. sobre a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida”.**

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.  
Prof. Fernanda Bueno Morrone  
FFARM  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

## 2. LAUDO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA E AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO

### CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz. Biólogo Colegiado. C. B. P. # 2796

#### **Certifica:**

Que, la muestra vegetal conocida como “uña de gato”, proporcionada por LABORATORIOS INDUQUIMICA S. A. con RUC # 20101364152., ha sido estudiada y determinada científicamente como: Uncaria tomentosa (Willdenow ex Roemer & Schultes.) DC. Y en base al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981 se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

**DIVISIÓN** : MAGNOLIOPHYTA  
**CLASE** : MAGNOLIOPSIDA  
**SUBCLASE** : ASTERIDAE  
**ORDEN** : RUBIALES  
**FAMILIA** : RUBIACEAE  
**GENERO** : Uncaria Schreb.  
**ESPECIE** : Uncaria tomentosa (Willd. ex. Roem. & Schult.) DC.

Nombre vulgar: “Uña de gato”

Se expide la presente certificación a solicitud de la empresa para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 junio del 2006

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urbanización Santa Luzmila



REPÚBLICA DEL PERÚ



MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO NACIONAL DE RECURSOS NATURALES  
INRENA

Nº 007892 -AG-INRENA

### PERMISO PARA FAUNA Y FLORA SILVESTRE

Este permiso debe adjuntarse con los especímenes y/o productos a exportar, importar o re-exportar.

EXPORTACION     IMPORTACION     RE-EXPORTACION

Válido por 60 días calendarios

Nombre : LABORATORIOS INDUQUIMICA S.A.  
Domicilio : Calle Santa Lucía N° 152-154 Urb. Villa Marina, Chorrillos.  
Lima - Perú  
Documento de Identidad : RUC N° 20101364152  
Producto (s) :

UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*)

Cantidad: 5 kg de corteza molida de uña de gato.

PRODUCTO CON FINES COMERCIALES\*\*\*\*\*

Los derechos otorgados sobre los recursos biológicos no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos (Art. 1, inciso f del Decreto Supremo 014-2001-AG).

Lugar de Procedencia : Ucayali.  
Destinatario : George Gonzáles Ortéga  
Dirección : Avenida Ipiranga 2752, 90610.000 Porto Alegre - RS  
BRASIL

Lima, 03 de 07 del 2006

Sello y firma del representante de la Autoridad  
INRENA  
FECHA: 13/07/06  
HORA: 11:35

Sello y firma del representante de la Autoridad  
CITES - PERÚ  
INRENA

Acta n° 340-06  
S.A n° 6559971154

El titular del presente permiso conoce las disposiciones legales vigentes en la materia y es responsable de su cumplimiento y sujeto a las sanciones correspondientes en caso del incumplimiento total o parcial.



### 3. NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY



## JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0378-8741

#### DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of indigenous medical knowledge,
- scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. **Clinical studies** on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

## AUDIENCE

---

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

## IMPACT FACTOR

---

2010: 2.466 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

AGRICOLA  
BIOSIS  
CAB Abstracts  
Cambridge Scientific Abstracts  
Chemical Abstracts  
Current Contents/Life Sciences  
EMBASE  
EMBiology  
International Pharmaceutical Abstracts  
MEDLINE®  
NAPRALERT (Natural Products Alert)  
Science Citation Index  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief:*

**R. Verpoorte**, Gorlaeus Laboratorium, HB024, Universiteit Leiden, Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden, Netherlands,  
**Email:** [verpoort@chem.leidenuniv.nl](mailto:verpoort@chem.leidenuniv.nl)

### *Editor:*

**P.J. Houghton**, King's College London, London, UK

### *Associate Editor:*

**D. Guo**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China  
**Y.S. Kim**, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea  
**P.K. Mukherjee**, Jadavpur University, Kolkata, India  
**G. Schmeda Hirschmann**, Universidad de Talca, Talca, Chile  
**J. van Staden**, University of KwaZulu-Natal, Scottsville, South Africa  
**E. Yesilada**, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey

### *Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews):*

**M. Heinrich**, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK,  
**Email:** [michael.heinrich@pharmacy.ac.uk](mailto:michael.heinrich@pharmacy.ac.uk)

### *Editorial Board:*

**S. Alban**, Kiel, Germany  
**M.J. Balick**, Bronx, NY, USA  
**R. Bauer**, Graz, Austria  
**G. Bourdy**, Cayenne, French Guiana  
**J.B. Calixto**, Florianópolis, Brazil  
**C-T. Che**, Hong Kong, Hong Kong  
**G.A. Cordell**, Evanston, IL, USA  
**J. Ding**, Shanghai, China  
**V.M. Dirsch**, Vienna, Austria  
**T. Efferth**, Heidelberg, Germany  
**E. Elisabetsky**, Porto Alegre, Brazil  
**J. Fleurentin**, Metz, France

**B.L. Furman**, Glasgow, UK  
**M.P. Germano**, Messina, Italy  
**J. Gertsch**, Bern, Switzerland  
**A.H. Gilani**, Karachi, Pakistan  
**M.P. Gupta**, Panama City, Panama  
**A. Hensel**, Münster, Germany  
**Z. Ismail**, Penang, Malaysia  
**W. Jia**, Kannapolis, NC, USA  
**T. Johns**, Ste. Anne de Bellevue, QC, Canada  
**A.K. Jäger**, Copenhagen, Denmark  
**G. Kavalali**, Istanbul, Turkey  
**H-S. Kim**, Cheongju, South Korea  
**J. Kim**, Seoul, South Korea  
**Y. Kimura**, Ehime, Japan  
**M.A. Lacaille-Dubois**, Dijon, France  
**M. Leonti**, Cagliari, Italy  
**G. Lin**, Hong Kong, Hong Kong  
**E. Matteucci**, Pisa, Italy  
**I. Merfort**, Freiburg, Germany  
**J.J.M. Meyer**, Pretoria, South Africa  
**D.E. Moerman**, Ypsilanti, MI, USA  
**D.A. Mulholland**, Guildford, England, UK  
**A. Panthong**, Chiang Mai, Thailand  
**X. Peigen**, Beijing, China  
**A. Pieroni**, Pollenzo/Bra, Italy  
**D.D. Soejarto**, Chicago, IL, USA  
**E. Speroni**, Bologna, Italy  
**A.M. Viljoen**, Pretoria, South Africa  
**A.J. Vlietinck**, Antwerpen, Belgium  
**H. Wagner**, München, Germany  
**C.S. Weckerle**, Zurich, Switzerland  
**C.W. Wright**, Bradford, UK  
**S. Zacchino**, Rosario, Argentina  
**V.S. da S. Bolzani**, Araraquara, Brazil

***Founding Editors:***

**J.G. Bruhn**, Tomelilla, Sweden  
**L. Rivier**, Lausanne, Switzerland  
**C. Christoffel**,

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

**Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited.** It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

### Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

#### *The "rules of 5"*

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

#### *Types of paper*

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the

papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor [j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk](mailto:j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk) with an outline.

7. Conference announcements and news.

## BEFORE YOU BEGIN

### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### **Policy and ethics**

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

**Animal and clinical studies** - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

**Biodiversity rights** - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.



### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### **Additional information**

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has

been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302. [Click here.](#)

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research*. J Ethnopharmacol 2008,115: 163-172. [Click here.](#)

T.SA. Froede and Y.S. Medeiros *Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 173-183. [Click here.](#)

## **PREPARATION**

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings Ethnopharmacological relevance, Materials and Methods, Results, and Conclusions.**

Click [here](#) to see an example.

### Graphical abstract

Authors must supply a graphical abstract for all types of articles at the time the paper is first submitted. The graphic should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership and for compilation of databases. Carefully drawn figures that serve to illustrate the theme of the paper are desired. The dimensions of the graphical abstract are: 5 cm by 17 cm and 200 x 500 pixels. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. For an example of a graphical abstract please [click here](#).

### Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).



### Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

**Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

*Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

**Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print



- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>