

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

ELIZABETH GOMES PAULINO MENEZES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E INDUTORA DE APOPTOSE DA
GRANDISINA EM CÉLULAS LEUCÊMICAS K-562 COM FENÓTIPO DE
RESISTÊNCIA A FÁRMACOS**

**GOIÂNIA
2009**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E INDUTORA DE APOPTOSE DA
GRANDISINA EM CÉLULAS LEUCÊMICAS K-562 COM FENÓTIPO DE
RESISTÊNCIA A FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Prof (a) Dra Marize Campos Valadares Bozini

GOIÂNIA

2009

A minha mãe; Maria Elizabeth Paulino Menezes
por ter me dado a vida e condições para
estudar.

Ao meu marido; Hugo Franco de Oliveira pela
compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido chegar até aqui.

A Professora Dra Marize Campos Valadares, minha orientadora, pela competência, paciência, compreensão, carinho, dedicação e por sua excepcional capacidade científica.

A Dra Elisangela Ribeiro pelo auxílio técnico empregado no estudo da apoptose.

A Professora Aline pela competência e auxílio técnico nos testes de imunocitoquímica.

Aos colegas de pós-graduação Polyana Benfica, Alexandre Pereira dos Santos, Marcelo Vieira, Mariana Mota e Bruna, pela amizade, incentivo, colaboração, sugestão e paciência.

A toda equipe do laboratório Cepraco (Centro de Produção de Anticorpos).

A professora Ilse Franco de Oliveira por sua colaboração.

A técnica de laboratório Soraia por sua colaboração

A secretária do programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFG, Fernanda Bellato, por sua amizade e competência nos atendimentos.

Agradeço a todos os colegas do laboratório que sempre estiveram presentes incentivando.

*A aprendizagem é um simples apêndice de nós mesmos;
onde quer que estejamos , está também nossa aprendizagem.*
William Shakespeare

Reparta seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade.
Dalai Lama

RESUMO

Neste estudo, o potencial antileucêmico da grandisina, uma neolignana extraída de *Piper solmsianum*, foi investigado contra a linhagem leucêmica K-562, a qual apresenta fenótipo de resistência a fármacos. A citotoxicidade da grandisina (0,018 – 2,365 μMol) foi avaliada em K-562 e em linfócitos do sangue periférico normal utilizando os métodos de Azul de Tripano e MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]). Na investigação da atividade citotóxica da grandisina sobre células K-562 e linfócitos por 24 horas pelo método azul de tripano, a grandisina apresentou IC_{50} (concentração inibitória para cinquenta por cento) de 1,075 μMol e 0,375 μMol para linfócitos e K-562, respectivamente. Após 48 horas a citotoxicidade para as células normais se manteve e observamos aumento para as células leucêmicas IC_{50} 0,198 μMol e 0,200 μMol para K-562 e linfócitos, respectivamente. Para o teste de MTT os resultados foram semelhantes aos encontrados no ensaio anterior ($\text{IC}_{50\text{K-562}}$ 11,98 μMol $\text{IC}_{50\text{linfócitos}}$ 0,425 μMol para 24 horas e $\text{IC}_{50\text{K-562}}$ 0,685 μMol $\text{IC}_{50\text{linfócitos}}$ 0,851 μMol para 48 horas). A investigação dos mecanismos de morte celular demonstrou que o tratamento das células K-562 com 0,036 μMol de grandisina por 24 horas induz ao aumento da população de células em fase G1 do ciclo celular e uma diminuição da população de células em fase G2 e S, respectivamente, indicando que a grandisina induziu parada do ciclo celular em fase G1, o que condiz com a maioria dos antileucêmicos existentes. A investigação da morfologia destas células indicou morte celular com sinais de apoptose. Além disto, o tratamento das células leucêmicas com 0,072, 0,036, 0,018 μMol de grandisina por 24 horas promoveu a externalização da anexina V, um indicador primário de apoptose. Nestas células, a investigação da atividade das caspases 6, 8 e 9 e dos mediadores do processo de morte celular Bcl2 e Bax demonstrou que a morte celular ocorre via caspase-dependente e com indução de modulação entre Bcl2 e Bax. Coletivamente estes resultados introduzem um novo modelo capaz de induzir apoptose em uma linhagem celular leucêmica com importantes características de resistência ao processo de morte celular programada.

Palavras-chave: grandisina; citotoxicidade; apoptose; K-562

ABSTRACT

In this study the antileukemic potential of grandisin, a neolignan extracted from *Piper solmsianum*, was investigated against K-562 lymphocytic genealogy, which demonstrates a phenotype of resistance to new drugs. The cytotoxicity of grandisin (0.018 to 2.365 μMol) was evaluated in K-562 and in normal peripheral blood lymphocytes by using Blue of Trypan and MTT([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] bromide) methods. In the cytotoxic activity research about grandisin on K-562 cells and lymphocytes during 24 hours by the Blue of Trypan method, the grandisin got IC_{50} (inhibitory concentration to fifty percent) of 1.075 and 0.375 μMol to lymphocytes and K-562, respectively. After 48 hours, the cytotoxicity in normal cells remained themselves and we noticed there was an increase in IC_{50} leukemic cells of 0.198 μMol and 0.200 μMol in K-562 and lymphocytes, respectively. For the MTT test, results were similar to those found during the previous experiment ($\text{IC}_{50\text{K-562}}$ 11,98 μMol $\text{IC}_{50\text{lymphocytes}}$ 0,425 μMol for a period of 24 hours and $\text{IC}_{50\text{K-562}}$ 0,685 $\text{IC}_{50\text{lymphocytes}}$ 0,851 μMol for a period of 48 hours). The research about cell death mechanisms showed the treatment in K-562 cells joined to 0.036 μMol of grandisin during 24 hours, induces to an increase of cells population in G1 stage of cell cycle and it also induces to a decline of cells population in G2 stage and S, respectively. These factors also indicate that the grandisin was induced to a cell cycle standstill in G1 stage, which is proportionated to the most antileukemic agents existing. Cell death with apoptosis signs was showed by the research about these cells morphology. Moreover, the treatment of leukemic cells with 0.072, 0.036, 0.018 μMol of grandisin during 24 hours has promoted exposure of annexin V, wich is a first indicator of apoptosis. In these cells, the activity research of 3, 6 and 9 caspases and cell death mediators Bcl2 and Bax showed that cell death happens in dependent-caspase way and with balance induction between Bcl2 and Bax. Collectively, these results introduce a new model able to induce apoptosis in a leukemic cell genealogy with important features of resistance to the process of programmed cell death.

Key-words: grandisin; cytotoxicity; apoptosis; K-562

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008 na população brasileira.	20
Figura 2	Estimativas para o ano de 2008 em Goiás e Goiânia, das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de novos casos de câncer, em homens, segundo localização primária.	21
Figura 3	Estimativas para o ano de 2008 em Goiás e Goiânia, das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de novos casos de câncer em mulheres, segundo localização primária.	21
Figura 4	Esquema das vias de sinalização intrínseca e extrínseca da apoptose celular (adaptado de POPE, 2002).....	29
Figura 5	A planta <i>Piper solmsianum</i> nativa da mata atlântica (Foto Massuo Kato USP).....	34
Figura 6	Estrutura Molecular da Grandisina.	40
Figura 7	Células K-562. Aumento 20x. B.S.Rodrigues, 20/09/2009.....	41
Figura 8	Garrafa confluenta de células K-562. B.S.Rodrigues, 20/09/2008.	41
Figura 9	Estufa de Cultura Celular. E.G.P. Menezes, 20/09/2008.	42
Figura 10	Citômetro de Fluxo BD FACSCantoII™. E.G.P. Menezes, 26/03/2009.	46
Figura 11	Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por 24 horas. A viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do Azul de Tripano..	51
Figura 12	Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por	

48 horas. A viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do Azul de Tripiano.	52
Figura 13 Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por 24 horas. A viabilidade foi determinada pelo teste de redução do MTT.	53
Figura 14 Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por 48 horas. A viabilidade foi determinada pelo teste de redução do MTT.	53
Figura 15 (A) Índice de apoptose das células K-562 expostas a grandisina a 0,036 μ Mol por 24 horas, determinada por coloração de hematoxilina.	54
Figura 16 Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina a 0,018 μ Mol por 24 horas usando anexina V e iodeto de propídeo....	55
Figura 17 Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina a 0,036 μ Mol por 24 horas usando anexina V e iodeto de propídeo....	56
Figura 18 Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina a 0,072 μ Mol por 24 horas usando anexina V e iodeto de propídeo....	556
Figura 19 Análise do ciclo celular das células K-562 (controle) por Citometria de Fluxo..	57
Figura 20 Análise do ciclo celular das células K-562 após tratamento com grandisina a 0,036 μ Mol por 24 horas.	58
Figura 21 Atividade relativa das caspases em células K-562 (2×10^6 células/mL) tratadas grandisina 0,036 μ Mol por 24 horas.	59

- Figura 22 A e B - Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h. C - Expressão de Bcl2 em células K-562 não tratadas e tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h.... 60
- Figura 23 A e B - Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h. C - Expressão de Bax em células K-562 não tratadas e tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h.... 61
- Figura 24 A e B - Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) não tratadas e tratadas com grandisina a 0,036 μ Mol por 24h. C - Expressão de Ki67 em células K-562 tratadas com grandisina a 0,036 μ Mol por 24h 61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator ativador de proteases apoptóticas
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
Bad	BCL-2 antagonist of cell death
Bak	BCL-2 antagonist/killer
Bax	BCL-2 Associated X protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma protein 2
Bcl-xl	B-cell Lymphoma-extra large
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia
Bid	BH3-Interating domain dea
Bik	BCL-2 Interating Killer
Bim	BCL-2 interacting mediator of cell death
Blk	Lymphoid tyrosine kinase
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
Bok	BLC-2 related ovarian killer protein
BU	Bussulfano
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	Cluster differentiation
CE _{50%}	Concentração eficiente 50%

c-FLIP	Cellular FLICE Inhibitory Protein.
Ara-C	Citarabina
CO ₂	Dióxido de Carbono
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAB	Diaminobenzidina
DPG	4-demethyl-picropodophyllotoxin 7'-O-beta-D-glucopyranoside
DR3	Death receptor 3
DR4	Death receptor 4
DR5	Death receptor 5
DR6	Death receptor 6
EGL-1	Egg laying abnormal – 1
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated Death Domain
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
Hrk	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
IC _{50%}	Concentração Inibitória para 50%
INF- α	Interferon alfa
kDa	Kilodaltons
kg	Quilogramas
LMC	Leucemia mielóide crônica

MCF-7	Células de linhagem de câncer de mama humana
mEq	Miliequivalentes
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimoles
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]}
nm	Nanômetro
O ₂ ⁻	Oxigênio singleto
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Fosfatidilcolina
Ph	Cromossomo Philadélfia
IP	Iodeto de propídeo
rpm	Rotações por minuto
TKIs	Tyrosine kinase inhibitors
TMOalo	Transplante de medula óssea alogênico
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Câncer.....	18
2.2 Leucemias	22
2.3 Leucemia Mieloide Crônica	23
2.4 Linhagem K-562	26
2.5 Morte Celular por Apoptose Versus Necrose	26
2.6 Apoptose e Proteínas Reguladoras.....	27
2.6.1 Via Intrínseca	27
2.6.2 Via Extrínseca	29
2.6.3 Proteínas Reguladoras da Apoptose.....	30
2.7 A Família Piperaceae e o Gênero Piper	32
2.7.1 <i>Piper solmsianum</i>	33
2.8 Grandisina	34
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivos Específicos	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 Grandisina	40
4.2 Linhagem Celular	40
4.3 Cultura de Linfócitos.....	42
4.4 Teste de Citotoxicidade	43
4.4.1 Método de Viabilidade por Azul de Tripiano	43
4.4.2 Método de Redução do Tetrazolium (MTT).....	43
4.5 Métodos de Detecção de Morte Celular por Apoptose	44
4.5.1 Índice Apoptótico	44
4.5.2 Dupla Marcação Anexina V- FITC/PI e Análise por Citometria de Fluxo.....	44
4.5.3 Ciclo Celular	46
4.5.4 Atividade das Caspases -6 -8 e -9	487
4.5.5 Expressão de Proteínas Apoptóticas e Relacionadas.....	48

4.6 Análise Estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Testes de Citotoxicidade.....	51
5.1.1 Método de Viabilidade por Azul de Tripiano.....	51
5.1.2 Teste de Viabilidade por Redução do Tetrazolium (MTT)	52
5.2 Métodos de Detecção de Morte Celular por Apoptose	54
5.2.1 Índice Apoptótico	54
5.2.2 Marcação Anexina V- FITC/IP por Citometria de Fluxo.....	55
5.2.3 Ciclo Celular	57
5.2.4 Teste de Atividade das Caspases -6 -8 e -9.....	58
5.2.5 Expressão de Proteínas Apoptóticas e Relacionadas.....	59
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO.....	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Apesar de décadas dedicadas à pesquisa do câncer e aos estudos de novos tratamentos para essa doença, as taxas de mortalidade continuam altas, fazendo com que as neoplasias representem atualmente uma das principais causas de morte no mundo. O pouco entendimento da epidemiologia molecular dos cânceres humanos e o diagnóstico tardio são apontados como potenciais razões para a alta mortalidade (LIM, 2005).

Dentre os vários tipos de câncer as leucemias merecem especial atenção. Acometem adultos e crianças e apresenta dificuldades no tratamento. A quimioterapia aplicada ao tratamento das leucemias envolve a combinação de fármacos com o objetivo de reduzir a possibilidade de fracasso devido ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos frequentemente observado nas leucemias, além da suscetibilidade individual do paciente. Usualmente, são empregados fármacos que interferem em diferentes estágios da mitose. O tratamento quimioterápico de sucesso ocorre quando se observa a inibição da divisão celular, onde as células tumorais remanescentes morrerão por envelhecimento, sem serem repostas (WOOD, *et al.*, 1996).

Recorrer às virtudes curativas de alguns vegetais é uma das mais antigas manifestações do homem em compreender e utilizar a natureza como recurso terapêutico. Sendo assim, desde os tempos mais remotos o homem vem coletando plantas nativas ou cultivando outras nas proximidades de sua casa para usar como alimento e medicamento (BRANDÃO, 2003).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, 80% da população de países em desenvolvimento dependem dos recursos naturais como fonte de atenção primária a saúde. Estimativas mostram que o mercado de produtos farmacêuticos movimenta uma margem de US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$ 22 bilhões são oriundos de fontes naturais (BRESOLIN e FILHO, 2003).

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento associa-se a uma seqüência hierárquica de estudos que vão desde a identificação e validação

de alvos, seleção de substâncias bioativas, caracterização de moléculas líderes e derivados, esclarecimento do mecanismo de ação, perfil farmacocinético, até avaliação da eficácia e segurança (HEINRICH e BREMNER, 2006).

A pesquisa visando novos agentes antitumorais é atualmente o foco das atividades de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo. Muitas pesquisas são realizadas com o intuito de apontar novos tratamentos ou fármacos que possibilitem alternativas para a terapêutica dessa doença que depende de fatores prognósticos como a idade, classificação da doença, características citogenéticas, resposta a tratamentos anteriores, duração, dentre outras (PEREIRA, 2001).

Neste cenário, a família das lignanas tem demonstrado ser um grupo promissor de novas moléculas candidatas a fármacos antitumorais. Recentemente Valadares *et al* (2009) demonstrou que a grandisina, uma neolignana possui importante atividade antitumoral e anti angiogênica *in vivo* utilizando o modelo experimental do tumor ascístico de Ehrlich.

Considerando a continuidade da pesquisa acerca do potencial antitumoral da grandisina, a mesma foi objeto de estudo deste trabalho, que avaliou a atividade citotóxica e indutora de apoptose em células eritroleucêmicas humanas da linhagem K-562, com fenótipo de resistência a fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer hoje é claramente compreendido como uma doença genética das células somáticas. No câncer, os mecanismos que controlam as falhas para garantir que o número de células permaneça balanceado em relação ao organismo total estão subvertidos, e as células cancerosas multiplicam-se descontroladamente. Os cânceres são agregados de células, todas derivadas de uma célula fundadora aberrante que, embora rodeada de tecido normal, não está mais integrada a este ambiente. As células cancerosas em geral diferem de suas vizinhas normais por várias alterações fenotípicas específicas, tais como taxa de multiplicação rápida, invasão de novos territórios celulares, alta taxa metabólica e forma anormal (GRIFFITHS *et al.*, 2001).

O câncer é uma das principais causas de óbito em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares nos países desenvolvidos. Para as próximas décadas, já é esperado o dobro do número de pessoas diagnosticadas com câncer, aumentando a demanda por novos métodos diagnósticos e terapêuticos (DE MEJIA *et al.*, 2003).

Cancer é uma denominação atribuída a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser incontroláveis e agressivas, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 2005a).

Segundo Braz (2001) existe quatro formas de atuação dessas células cancerosas que as diferenciam das normais:

- Clonalidade – o câncer origina-se de mudanças genéticas em uma única célula e se prolifera, formando clones malignos.

- Autonomia – seu crescimento não é regulado adequadamente pelas influências bioquímicas e físicas normais do ambiente.
- Anaplasia – não ocorre diferenciação normal e coordenada das células.
- Metástases – as células do câncer desenvolvem capacidade de crescimento descontínuo e disseminação para outras células.

Os termos neoplasia, tumor e câncer, segundo Fernandes Júnior (2000), apresentam diferenças importantes. O termo **neoplasia** é utilizado mais corretamente para designar a proliferação tecidual sempre acompanhado das palavras benigna ou maligna, expressando, assim, o comportamento biológico das lesões. O termo **tumor** é bastante vago, significando uma elevação do tecido e podendo ser encontrado em processos inflamatórios, infecciosos e outros, sem que haja a obrigatoriedade da proliferação celular. Por sua vez, o termo **câncer** designa claramente as neoplasias malignas cujas principais categorias são os carcinomas, sarcomas, linfomas e leucemias (BRASIL, 1996).

As causas de seu aparecimento são variadas e podem ser de ordem externa ou interna ao organismo e estarem ou não inter-relacionadas. As causas externas estão relacionadas ao ambiente, aos costumes e hábitos de uma sociedade ou cultura. Já as internas, são na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e está intimamente ligada a capacidade de defesa do organismo (BRAZ, 2001; SMELTZER, 2002).

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Estima-se que em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que 60% desses novos casos ocorrerão nos países em desenvolvimento (INCA, 2008). Isto demonstra minimamente o crescimento expressivo da doença.

No Brasil as estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009 (Figura1), apontam para a ocorrência de 466.730 novos casos de câncer, sendo esperados 231.860 novos casos para o sexo masculino e 234.870 novos casos para o sexo feminino (INCA, 2008).

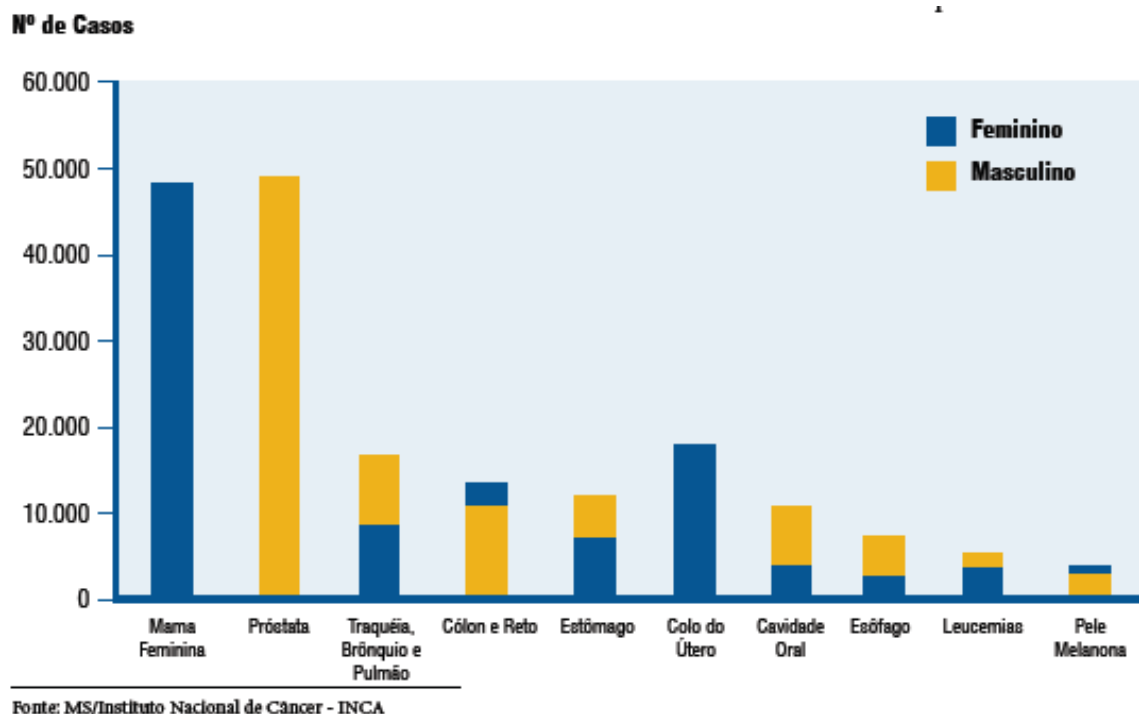


Figura 1 - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008 na população brasileira - INCA, 2008.

No caso do estado de Goiás em 2008 (Figuras 2 e 3), o INCA estimou a incidência de cancer de 14.460 novos casos em homens e 14.050 novos casos em mulheres. Especificamente relacionados à incidência de leucemia, estimou-se 360 novos casos para o sexo masculino e 290 novos casos para pessoas do sexo feminino. Quando relacionados à capital do Estado, os dados quanto à incidência de leucemia apontam para uma ocorrência de 150 novos casos para homens e 120 novos casos para mulheres (INCA, 2008).

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.290	43,58	340	55,43
Traquéia, Brônquio e Pulmão	450	15,24	110	17,66
Estômago	310	10,38	80	13,03
Cólon e Reto	280	9,44	100	15,47
Cavidade Oral	220	7,37	80	12,59
Esôfago	170	5,87	40	7,06
Leucemias	150	5,14	50	7,36
Pele Melanoma	60	1,96	20	3,88
Outras Localizações	1.630	55,00	360	58,10
Subtotal	4.560	153,86	1.180	190,45
Pele não Melanoma	1.280	43,33	410	65,55
Todas as Neoplasias	5.840	196,91	1.590	256,69

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 2 - Estimativas para o ano de 2008 em Goiás e Goiânia, das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de novos casos de câncer, em homens, segundo localização primária.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2008.

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	1.040	34,73	340	50,49
Colo do Útero	570	19,08	160	23,26
Cólon e Reto	290	9,79	120	17,97
Traquéia, Brônquio e Pulmão	290	9,59	70	10,98
Estômago	160	5,49	40	6,62
Leucemias	120	3,92	40	5,81
Cavidade Oral	110	3,80	30	5,15
Pele Melanoma	40	1,48	20	2,96
Esôfago	50	1,84	**	2,02
Outras Localizações	870	29,14	380	55,87
Subtotal	3.540	118,57	1.210	177,91
Pele não Melanoma	2.230	74,60	510	75,30
Todas as Neoplasias	5.770	193,12	1.720	252,48

Figura 3 - Estimativas para o ano de 2008 em Goiás e Goiânia, das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de novos casos de câncer, em mulheres, segundo localização primária.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2008.

2.2 Leucemias

Leucemias são desordens malignas que ocorrem no sistema hematopoiético, caracterizadas pela proliferação exagerada e irregular das células sanguíneas. Na leucemia ocorre proliferação anormal de células hematopoiéticas, nas quais os processos de diferenciação e apoptose estão desregulados (MCKENNA, 2000). Na maioria dos casos, as células leucêmicas extravasam para o sangue, onde podem ser vistas em grande número. Essas células também podem infiltrar o fígado, baço, linfonodos e outros tecidos (ROBBINS, *et al.*, 1996). Dentre os sinais e sintomas, podemos citar: fraquezas, infecções persistentes e hemorragias (OLIVEIRA, 1990).

A etiologia da maioria das leucemias é incerta. Suspeita-se que as causas estejam relacionadas com infecção viral, exposição à radiação ionizante e outros tipos de radiação eletromagnética e exposição química. Anormalidades citogenéticas têm sido demonstradas na maioria das leucemias. Alterações cromossômicas podem inativar o gene supressor de tumor ou ativar os oncogenes, permitindo a proliferação irregular de células hematopoiéticas (MCKENNA, 2000).

Geralmente o diagnóstico das leucemias inicia-se a partir de uma suspeita clínica e se baseia na avaliação do sangue periférico e medula óssea. Embora a morfologia continue sendo a base para o diagnóstico, técnicas adicionais, incluindo imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudo de genética molecular, tornam-se essenciais e em alguns casos específicos são ferramentas complementares obrigatórias. Os procedimentos de diagnóstico permitem identificar o tipo celular envolvido na leucemogênese, o que é fundamental para orientar a terapêutica e determinar até certo ponto o prognóstico das leucemias (DA SILVA *et al.*, 2006).

A terapêutica antileucêmica depende de fatores prognósticos como a idade, classificação da doença, características citogenéticas, resposta a tratamentos anteriores, duração, dentre outras (PEREIRA, 2001). A quimioterapia aplicada ao tratamento das leucemias envolve a combinação de drogas para reduzir a possibilidade de fracasso devido à resistência de determinados cânceres e a suscetibilidade individual. Podem ser utilizadas drogas que interferem em

diferentes estágios da mitose. Uma vez bem sucedido o tratamento para inibir a divisão celular, o câncer não crescerá e suas células morrerão por envelhecimento, sem serem repostas. Para minimizar os efeitos do tratamento quimioterápico, pode ser administrada dose mais baixa (WOOD *et al.*, 1996). No entanto, se faz necessário citar a baixa eficácia deste tratamento em melanoma B16 e eritroleucemia humana K-562 (VEROVSKIY *et al.*, 1990; DEGTEREV *et al.*, 1991; ROSSA *et al.*, 2003; DAGHASTANLI *et al.*, 2004), fazendo-se necessário a busca de novas alternativas terapêuticas.

2.3 Leucemia Mieloide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma desordem clonal de células tronco hematopoiéticas que resulta em incremento de células mielóides no sangue periférico e medula óssea. É uma doença mieloproliferativa, responsável por 15% a 20% das leucemias, com uma incidência de 1 a 2 casos em cada 100.000 habitante (FARDEL *et al.*, 1999). A LMC é caracterizada por uma expansão clonal de células-tronco hematopoiéticas, que possuem uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t (9; 22) (q34: q11)], referido como cromossomo Filadélfia (Ph) (DEREMER, *et al.*, 2008).

A consequência molecular desta translocação é a geração de uma proteína híbrida BCR-ABL (“breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia”) de 210 kDa, com atividade tirosina-quinase aumentada, presente em todos os casos de LMC. A atividade da proteína BCR-ABL é necessária e suficiente para a atividade oncogênica da fase inicial da LMC (DALEY *et al.*, 1990; PASTERNAK *et al.*, 1998; FARDEL *et al.*, 1999; GORDON *et al.*, 1999; GOLDMAN, 2004).

A idade média dos indivíduos afetados é de 53 anos, mas todos os grupos etários podem ser atingidos pela doença. A doença evolui em três fases. A fase crônica onde ocorre uma expansão clonal maciça de células mielóides, as quais mantêm a capacidade de diferenciação e que são bem controladas com terapias citorredutoras, como o bussulfano (BU) e a Hidroxiureia (Hi). A fase acelerada é um estágio intermediário onde os pacientes apresentam sinais de progressão da doença sem mostrarem característica de leucemia aguda. Nesta fase ocorre um

agravamento de sinais como esplenomegalia progressiva, refratariedade ao tratamento com progressiva leucocitose e/ou trombose, observa-se um aumento da porcentagem de blastos promielócitos e basófilos na medula óssea e/ou sangue periférico (O' DAWYER *et al.*, 2002). Entretanto, com o passar do tempo, este clone perde essa capacidade, e a doença progride inexoravelmente para a fase aguda denominada de crise blástica, geralmente resistente a terapia quimioterápica (CORTES *et al.*, 1996; FARDEL *et al.*, 1999).

Em 70% dos pacientes que são sintomáticos ao diagnóstico, as queixas mais freqüentes incluem cansaço, perda da sensação de bem estar, baixa tolerância a exercícios, anorexia, desconforto abdominal, saciedade precoce (devido ao aumento do tamanho do baço), perda de peso e sudorese excessiva. No exame físico palidez e esplenomegalia são sinais importantes. Sintomas mais incomuns incluem dermatose neutrofílica febril aguda, um infiltrado perivascular de neutrófilos na derme, bem como febre acompanhada de lesões maculonodular violáceas no tronco, braços, pernas e rosto. Em muitos pacientes a LMC é diagnosticada coincidentemente quando são realizados exames de rotina (LICHTMAN, 2006). A maioria dos pacientes apresenta trombocitose, consistente com a presença de um defeito em uma célula tronco hematopoiética pluripotente. Aproximadamente 40% dos pacientes são assintomáticos e neles o diagnóstico é dado somente pela contagem anormal de células. A história natural da LMC inclui a progressão de uma fase crônica benigna até uma fase acelerada. Em contraste a maturação celular durante a fase crônica, na crise blástica as células falham na sua maturação e se assemelham aos mieloblastos ou linfoblastos encontrados em pacientes com leucemia aguda (SAWYERS, 1999).

A terapia com interferon alfa (INF- α) aumenta a sobrevida em até 2 anos, quando comparado à terapia com Hidroxiureia (Hi), e ainda pode reduzir o número de células que apresentam positividade para o cromossoma Filadélfia (Ph+), o que está claramente associado a uma maior sobrevida (SILVER *et al.*, 2003). Entretanto, mesmo quando associado à terapia com Citarabina (Ara-C), não foi observada remissão molecular, ou seja, a eliminação dos transcritos BCR-ABL (KANTARJIAN *et al.*, 2003). Por isso, o transplante de medula óssea alogênico (TMOalo) tem sido considerado o único tratamento curativo para LMC. Provavelmente, 65% dos pacientes transplantados com medula de doador

relacionado e completamente compatível vão ser curados. Apenas 45% dos pacientes com LMC têm menos do que 60 anos ao diagnóstico. Destes pacientes, apenas 30% tem doador aparentado HLA compatível (PEGGS *et al.*, 2003).

O grande avanço no tratamento da LMC foi a introdução do mesilato de imatinib (Glivec®, Basel, Suíça), um agente oral bem tolerado aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2001. O imatinib ocupa o local de ligação do ATP (Adenosina Trifosfato) de várias moléculas de tirosina quinase e previne a fosforilação de substratos que são envolvidos na regulação do ciclo celular (DRUKER *et al.*, 1996; DEININGER *et al.*, 1997; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997). Um maior conhecimento da atividade desses agentes contra a oncoproteína levou aos estudos de fase I e II os quais envolvem pacientes com LMC resistentes ao IFN- α ou em fases avançadas da doença. A resposta, tanto hematológica como citogenética foi maior do que outras modalidades terapêuticas até então disponíveis (DRUKER, *et al.*, 2001). Porém frequências de mutações BCR-ABL em pacientes imatinib resistentes variavam de 40% a 90%, dependendo da fase da LMC, o que levou ao desenvolvimento de uma segunda geração de inibidores da tirosina quinase para combater a resistência ao imatinib. Os estudos iniciais da segunda geração de inibidores da tirosina quinase (dasatinib e nilotinib) encontraram taxas de resposta promissoras em pacientes com recaída ou que apresentaram baixa tolerabilidade ao tratamento com imatinib. Em junho de 2006, o FDA aprovou o Dasatinib para o tratamento de adultos com LMC (fase crônica, acelerada e blástica) logo após a obtenção dos resultados dos estudos de Fase II. Em 29 de outubro de 2007, o nilotinib recebeu aprovação do FDA para o tratamento de doentes adultos com LMC (Ph+) (fase crônica e fase acelerada), resistentes ou intolerantes ao tratamento prévio, que incluía o imatinib. Em novembro de 2007, a aprovação para a mesma indicação foi dada pela Comissão Europeia (DEREMER, *et. al.*, 2008). Estes dados em conjunto reforçam a necessidade da pesquisa por novos agentes antileucêmicos com diferentes mecanismos de ação para reduzir a resistência a fármacos pelas células tumorais.

2.4 Linhagem K-562

A linhagem K-562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com LMC onde cromossomo Filadélfia estava presente (LOZZIO e LOZZIO, 1975). Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos, em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal (HbF), ou em células megacariocíticas, com aumento de tamanho e ploidia além de marcadores de superfície específicos (revisado por TSIFTSOGLOU *et al.*, 2003). Essa plasticidade faz da linhagem celular K-562 um ótimo modelo experimental para trabalhos envolvendo o que se denomina de “terapia da diferenciação do câncer”.

2.5 Morte Celular por Apoptose Versus Necrose

Wyllie e Kerr, 1972, postularam a idéia de que a morte celular por apoptose seguia um padrão específico que incluía encolhimento da célula, pequeno dano aparente às organelas, marginalização da cromatina, fragmentação celular e nuclear e estruturas celulares fragmentadas dentro de vesículas (corpos apoptóticos) (TAMIETTI, 2006). Estas características são acompanhadas por uma série de eventos bioquímicos os quais incluem a exposição de fosfatidilserina e outras alterações que promovem o reconhecimento por células fagocitárias (EARNSHAW, MARTINS, KAUFMANN, 1999). A exposição de fosfatidilserina do folheto interno da membrana citoplasmática para o folheto externo é um evento inicial do processo de apoptose e serve possivelmente como sinal para remoção dos corpos apoptóticos por células do sistema fagocitário (MARTIN *et al.*, 1995)

Depois da descrição feita por Wyllie e colaboradores em 1972, a compreensão sobre a morte celular por apoptose foi expandida exponencialmente. Ela é essencial para o desenvolvimento embrionário e desenvolvimento de tecidos normais além da remoção de células com características genéticas instáveis (REGULA, ENS, KIRSHENBAUM, 2003).

A apoptose é um processo de autodestruição celular que se diferencia da necrose por não ocorrência de extravasamento de material citoplasmático, por

diminuição no tamanho celular e fragmentação do DNA controlada e uniforme. É um processo que dura em média, 1h. (MCCARTHY, 2002)

A morte celular programada pode ser desencadeada por uma variedade de sinais de morte. Estes consistem na interação de um ligante a um receptor de morte (via extrínseca), danos a mitocôndria (via intrínseca), perturbação no balanço entre a redução e a oxidação das células (redox), perturbação no metabolismo de energia, geração de ceramida, mobilização de Ca^{2+} , ou a ativação das proteínas membros da família da Bcl-2 (CHEN, CROSBY, ALMASAN, 2003).

A necrose é denominada morte acidental, um processo não fisiológico, onde se observam mudanças na morfologia e função mitocondrial e na habilidade da membrana plasmática de regular a pressão osmótica no interior da célula. Inicialmente ocorre aumento no volume citoplasmático em decorrência da entrada de líquido na célula, seguido pela ruptura da membrana e organelas intracelulares, ocasionando assim, extravasamento de lisossomos e material citoplasmático, culminado com fragmentação aleatória do núcleo. (AL-RUBEAI, 1998).

2.6 Apoptose e Proteínas Reguladoras

2.6.1 Via Intrínseca

Por mais de uma década ficou claro que a apoptose é freqüentemente controlada por um ou mais passos cruciais os quais envolvem diretamente a mitocôndria. Estudos recentes ajudaram a elucidar aspectos fundamentais deste envolvimento enquanto novas questões surgiam sobre as rotas mitocondriais de morte celular. A primeira alteração que ocorre na mitocôndria durante a apoptose é a perda do potencial de membrana mitocondrial e vazamento do citocromo C para o citossol. Quando presente no citoplasma, o citocromo C se liga a Apaf-1 (fator ativador de proteases apoptóticas) e a pro-caspase-9 para formar um complexo protéico chamado de apoptossomo levando a autoclivagem e ativação

da caspase-9, que por sua vez, cliva e ativa as caspases-3 e 6 (NOWIS *et al.*, 2005).

As caspases são uma família de cisteases, ricas em cisteínas, que clivam proteínas alvo em resíduos de ácido aspártico no lado carboxila da cadeia polipeptídica, e são divididas em duas classes de acordo com o comprimento de seus pró-domínios N-terminal: caspases iniciadoras tais como caspases-8 e 10, e caspases efetoras tais como -3,-6 e 7 (KAUFMANN e HENGARTNER, 2001; HUANG *et al.*, 2005).

A liberação de outras proteínas facilita a ativação das caspases através da inativação de inibidores destas. Sua ativação leva à apoptose como descrito anteriormente, mas a inibição delas após um estímulo apoptótico apenas protege as células transitoriamente. Uma vez que a mitocôndria é permeabilizada, a morte prosseguirá devido a mediadores tóxicos liberados da mitocôndria, ou eventual perda das funções essenciais da mesma (TAMINETTI, 2006).

No que diz respeito ao citocromo C, ela é uma proteína solúvel localizado no lado externo da membrana interna da mitocôndria ligada ao fosfolípídeo aniônico cardiolipina. Sob condições fisiológicas normais, ela funciona como um carreador de elétrons entre os complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons, necessário para a produção de ATP na célula (CHEN, 2003). Além disso, o citocromo C tem uma função protetora da célula contra os radicais de oxigênio produzidos pela cadeia respiratória, convertendo o oxigênio singlete (O_2^-) à oxigênio molecular (SKULACHEV, 1998). Evidências sugerem que a dissociação do citocromo C da cardiolipina é um passo crítico para a liberação deste para o citossol e a indução do processo apoptótico. Estudos sobre o envolvimento mitocondrial na apoptose abrange uma enorme gama de tipos celulares que variam desde células em desenvolvimento de minhocas e ovos de sapo até células tumorais indiferenciadas e outros tipos celulares como hepatócitos, enterócitos e miócitos. Embora estas linhagens apresentem ambos os tipos de sinalização, na realidade estes caminhos coexistem. O que ocorre é que, simplesmente, a produção de sinais é mais rápida em um quando comparado com o outro (TAMINETTI, 2006).

2.6.2 Via Extrínseca

A via extrínseca é ativada pela interação de receptores localizados na superfície celular, denominados receptores de morte, aos seus ligantes específicos. Esses receptores incluem o Fas (CD95), TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Esta via inicia-se pela trimerização dos DR, que no caso da interação Fas-FasL, permite o recrutamento de duas proteínas sinalizadoras, FADD (Fas-associated death domain) e pró-caspase-8, formando o complexo DISC (“Death-inducing signaling complex”). A pró-caspase – 8 ativada pelo DISC é liberada para o citoplasma, no qual poderá agir na fase efetora do processo ao ativar diretamente a caspase-3, ou então promover o desencadeamento da via intrínseca por meio da clivagem da proteína Bid, a qual se dirige à mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo C e Smac (AMARANTE-MENDES E GREEN, 1999; OPFERMAN e KORSMEYER, 2003).

O recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são reguladas pela proteína anti-apoptótica c-FLIP (“cellular FLICE inhibitory protein”). Esta molécula pode se ligar ao complexo Fas-FADD, inibindo a clivagem e ativação da pró-caspase-8 em caspase – 8 ativa, inibindo o desencadeamento do processo apoptótico (GUSTAFSSON e GOTTLIEB, 2007).

As vias intrínseca e extrínseca da apoptose estão exemplificadas na figura 4 abaixo:

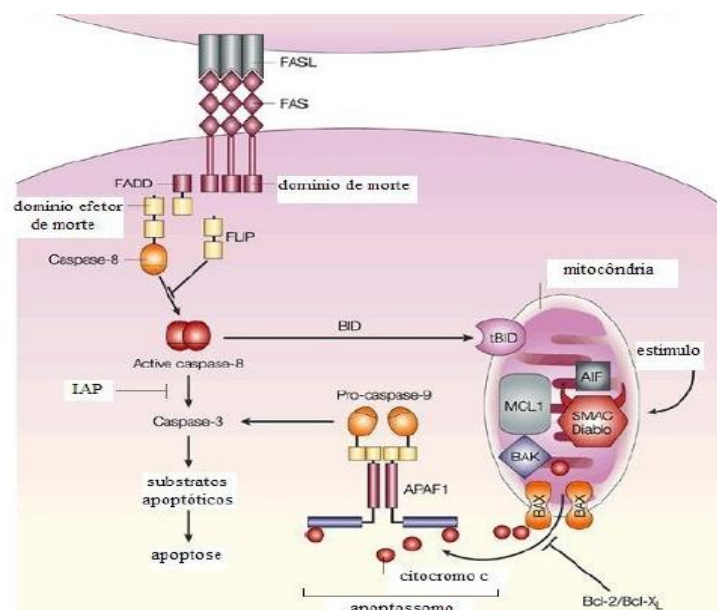


Figura 4 - Esquema das vias de sinalização intrínseca e extrínseca da apoptose celular (adaptado de POPE, 2002)

2.6.3 Proteínas Reguladoras da Apoptose

Os avanços nas investigações das alterações moleculares que ocorrem nas células submetidas à transformação maligna ajudam a desvendar os mecanismos da ocorrência e progressão dos tumores. Neste sentido, a identificação da expressão de moléculas específicas associadas ao processo carcinogênico tem conduzido ao conhecimento de um crescente número de marcadores moleculares que demonstram relação com as características das neoplasias malignas, complementando os parâmetros clínicos e histológicos tradicionalmente utilizados para identificar o grupo dos pacientes de alto risco, que possuem um curso clínico mais agressivo da doença (SCHLIEPHAKE, 2003).

Ki-67

O Ki-67 foi descrito em 1983 por GERDES *et al.* (1984). O Ki67 é anticorpo monoclonal que identifica o antígeno nuclear associado com o ciclo celular (BROWN *et al.*, 1990). O antígeno Ki-67 é expresso em G1, S, G2 e na fase M do contínuo ciclo celular, porém ausente no G0. Assim o Ki-67 prevê e mensura o imunoestadiamento da fração proliferativa dos tumores (GERDES *et al.*, 1984; BARNARD *et al.*, 1987).

YOUNG *et al.* (1987), concluíram que o crescimento e a progressão do câncer depende da alta taxa de progressão celular e baixa taxa de apoptose deste modo o Ki-67 é um marcador de proliferação celular.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, inicialmente descrito por Gerdes *et al.*, (1983) cuja expressão ocorre no núcleo, estando ausente na fase G0, apresentando-se fracamente na fase G1 e mais intensamente nas demais fases do ciclo celular. Num trabalho realizado por Teresa *et. al* (2007), o Ki-67 mostrou ser um bom marcador para carcinoma de células escamosas e leucoplasias, prestando-se inclusive para predição da progressão tumoral. Esse marcador foi capaz de demonstrar proliferações celulares diferentes para hiperplasia fibrosa inflamatória e leucoplasia, mas diferentemente dos resultados

encontrados por Liu, Klein-Szanto (2000), não foi possível discriminar leucoplasias displásicas de não displásicas.

Família Bcl-2

O bcl-2 pertence a uma família de genes aparentemente responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre proliferação e morte celular programada (KORSMAYER, 1992), mecanismo pelo qual células com DNA danificado podem ser removidas sem prejuízo. Este gene codifica uma proteína mitocondrial com peso molecular de 24 kDa, localizada no envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial externa, de vários tecidos normais e neoplásicos, com exceção de tecido muscular e hepático (EGUCHI *et al.*, 1992, LEBRUN *et al.*, 1993). Todas as células hematopoiéticas e linfóides contêm a proteína Bcl-2, além de muitas células epiteliais e neurônios (CARSON *et al.*, 1993).

A proteína Bcl-2 é uma proteína integral de membrana que atua como inibidora da apoptose, não tendo qualquer influência na proliferação celular (BROSSART *et al.*, 1995).

Recentemente foram descobertas várias outras proteínas caracterizadas como parte da família Bcl-2, com atuação direta na apoptose, seja inibindo-a ou promovendo-a. Dentre os membros antiapoptóticos dessa família, estão os seguintes: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1, Nr13, ORF 16, KS e E1B-19K. Já os membros pró-apoptóticos são os seguintes: Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim_l, Bad, Bid, EGL-1 e Bcl-x_s (Coit, 1998).

A maioria dos membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos, na ausência de um sinal de morte, se localizam em compartimentos subcelulares separados. Os membros antiapoptóticos se encontram inseridos em membranas intracelulares, principalmente a mitocondrial, enquanto alguns membros pró - apoptóticos localizam-se no citoplasma ou no citoesqueleto em uma forma inativa. Após o estímulo apoptótico, estes são ativados e migram para seu local de ação para exercerem suas funções (GROSS *et al.*, 1999).

2.7 A Família Piperaceae e o Gênero Piper

A família Piperaceae, junto com Aristolochiaceae, Hydnoraceae, Lactoridaceae e Sauraceae, estão inseridas na ordem Piperales. Apresenta 14 gêneros e, aproximadamente, 1950 espécies amplamente distribuídas em ambos os hemisférios (MABBERLEY, 1997).

Os indivíduos são de porte predominantemente herbáceo, mas alguns exemplares são arbustivos ou arbóreos. Possuem células oleíferas etéreas, folhas simples e alternas e as flores são hipóginas, sem perianto, com brácteas peltadas, pequenas, reunidas em densas espigas carnosas (BREMER *et al.*, 1996). Devido ao grande número de espécies, os gêneros *Peperomia* e *Piper* destacam-se dentro da família Piperaceae (JOLY, 1975). *Peperomia*, apesar de seu amplo uso na medicina tradicional e ornamental, tem sido menos estudada sob o ponto de vista químico em relação ao gênero *Piper*.

Constituintes voláteis como safrol, apiol, 3-hidroxi-4,5-metilenodioxililbenzeno e farneseno foram isolados de *Peperomia subespatulata*, a qual cresce na Colômbia e é utilizada na medicina popular para problemas estomacais (de DIAZ *et al.*, 1986).

Dentro da família Piperaceae encontra-se o gênero *Piper*, representado por mais de 100 espécies que estão distribuídas pantropicalmente tendo sua maior diversidade atribuída ao continente americano, seguida da Ásia (JARAMILLO E MANOS, 2001).

As espécies do gênero *Piper* são costumeiramente mais conhecidas devido ao seu uso comercial e na medicina tradicional. As sementes de *Piper nigrum* constituem a conhecida pimenta-do-reino, muito utilizada como tempero na preparação de alimentos. Na Jamaica, *Piper aduncum* e *Piper hispidum* são considerados remédios para a dor de estômago. *Piper amalago*, com distribuição do México até o Brasil, é utilizado para aliviar dores no peito, e como agentes antiinflamatório. Raízes e frutos de *Piper chaba* têm numerosas aplicações na medicina e são usados contra asma e bronquite (PARMAR *et al.*, 1997).

Atualmente um maior interesse na identificação de novos compostos em espécies do gênero *Piper* se intensificou devido à detecção de diversas substâncias que apresentaram atividades antifúngicas, bactericida, antitumoral e

tripanomicida (TERREAUX *et al.*, 1998; BALDOQUI *et al.*, 1999; DANELUTTE *et al.*, 2003; LAGO *et al.*, 2004;).

2.7.1 *Piper solmsianum*

Segundo a classificação botânica proposta por A. Cronquist, a espécie *Piper solmsianum* (Figura 5) pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Piperales, família Piperaceae, gênero Piper (AGAREZ, 1994).

Apresenta-se como planta arbustiva, medindo de 1 a 3 metros de altura. Floresce nos meses de outubro, novembro e dezembro, frutificando nos meses de abril, junho e dezembro. É encontrada com frequência em matas, planícies alagadiças ou brejos, podendo ocorrer em capoeiras, encostas ou restingas. Possui as sinonímias *Piper leucathum* C.DC e *Piper santosanum* C.DC (JOLY, 1985; DE CANDOLLE, 2000).

A planta brasileira *Piper solmsianum* da Amazônia e da Mata Atlântica, provou ser uma rica fonte de neolignanas as quais fazem parte da composição da parede celular da planta. Estes compostos são predominantemente encontrados em arbustos e acumulam na madeira onde desempenham um papel importante agindo como antibióticos, antifúngicos e agentes inseticidas (CARVALHO *et. al.*, 2009).



Figura 5 - A planta *Piper solmsianum* nativa da amazônia (Foto Massuo Kato USP).

2.8 Grandisina

Desde os tempos antigos o homem tem explorado o reino vegetal em busca da cura de doenças (YEOMAN & YEOMAN, 1996). Tanto as civilizações antigas, como as atuais utilizam-se de extratos brutos de tecidos vegetais para fins terapêuticos (STAFFORD, 1991). Diversas são as definições para metabólitos secundários vegetais. A mais aceita define os metabólitos secundários como compostos que não desempenham um papel essencial para a vida dos indivíduos que os produzem, entretanto são importantes na interação da planta produtora com o meio ambiente (OKSMAN-CALDENTY e INZÉ, 2004). Os metabólitos secundários vegetais são utilizados em fragrâncias, temperos, corantes, perfumes, cosméticos e em bebidas (COLLIN, 2001).

Estima-se que 10% das espécies vegetais tiveram seus metabólitos secundários estudados e caracterizados (OKSMAN-CALDENTY e INZÉ, 2004). Embora este número seja relativamente pequeno, diversos fármacos foram

isolados e identificados através de estudos fitoquímicos. Adicionalmente, 25% de todos os medicamentos prescritos nos países desenvolvidos possuem compostos diretamente, ou indiretamente (semisintéticos), extraídos de espécies vegetais. Vários destes metabólitos secundários vegetais são insubstituíveis na medicina, visto que seus análogos sintéticos não apresentam a mesma eficácia (OKSMAN-CALDENTY e INZÉ, 2004). Dentre os 252 medicamentos consideradas essenciais para a organização mundial da saúde, 11% são exclusivamente extraídas de plantas (RATES, 2001).

As lignanas são compostos interessantes uma vez que possuem uma grande variedade de ações biológicas que ainda não foram totalmente elucidadas (SALEEM, *et al.*, 2005). Este espectro de atividades tem sido continuamente expandido por meio de descobertas e modificações nas lignanas ou ainda, pela triagem de novas atividades biológicas de lignanas já conhecidas (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

As lignanas são originadas como metabólitos secundários em inúmeras espécies amplamente distribuídas pelo reino vegetal (ROW, 1978; AYRES e LOIKE, 1990; MOLINARI *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004). Em geral, são formadas pela união de duas unidades de fenilpropano constituindo uma família complexa de esqueletos e funcionalizações. De acordo com a posição em que as duas unidades de fenilpropano estão ligadas, elas são classificadas em quatro grupos distintos: lignanas simples, ciclolignanas, neolignanas e lignoides misturados. Estes fitoconstituintes podem ser isolados de mais de 60 famílias de plantas, de diferentes partes da raiz, rizoma, madeira, tronco, folhas, frutos, sementes e em alguns casos do exudato e resinas (ROW, 1978; AYRES e LOIKE, 1990; GORDALIZA *et al.*, 2000). Além disso, as lignanas foram detectadas na urina humana e de outros mamíferos indicando a sua presença na dieta com vegetais e de funcionalizações ocorridas por transformação metabólica interna de fitocompostos precursores presentes na dieta (GORDALIZA *et al.*, 2000).

As lignanas são alvos de diferentes linhas de pesquisa, como a que estuda a inibição da transcriptase reversa e atividade anti-HIV (LEE *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997; HARA *et al.*, 1997; GORDALIZA *et al.*, 2004), da atividade antifúngica (ZACCHINO *et al.*, 1997), da atividade anti-reumática (RANTAPPA-

DAHLQVIST *et al.*, 1994; LERNDAL e SVENSSON, 2000), da atividade anti-psoríase, anti-malária (LEANDER e ROSEN, 1988), anti-leishmania (BARATA *et al.*, 2000), mas o que mais desperta o interesse científico é o estudo da atividade anti-viral e da citotoxicidade dessas lignanas (BEDOWS e HATFIELD, 1982; AYRES e LOIKE, 1990).

Dentre as lignanas com atividade antitumoral podemos relatar a ação do composto elenosídio, uma arilnaftaleno lignana, estruturalmente relacionada a prostalidinas, justicidinas e derivados da podofilotoxina, extraído de *Justicia hyssopifolia* L., que demonstrou citotoxicidade contra leucemia, câncer pulmonar de células pequenas, melanoma, câncer de colon, de ovário e renal (NAVARRO *et al.*, 2001). Entretanto, a lignana que mais se destaca quanto a sua atividade antitumoral é a podofilotoxina que, por apresentar níveis inaceitáveis de citotoxicidade, não é utilizada na terapia antineoplásica. Entretanto, extensivas modificações na sua estrutura foram feitas com o objetivo de encontrar agentes antitumorais mais potentes e menos tóxicos (DESBÈNE e RENAULT, 2002). Dentre seus derivados semi-sintéticos, o etoposídeo e o tenoposídeo, são utilizados no tratamento de tumores testiculares, câncer pulmonar de células pequenas e como um dos componentes do tratamento pluriterapêutico no combate a leucemia linfoblástica aguda da infância, linfoma e sarcoma de Kaposi (AYRES e LOKE, 1990; DESBÈNE e RENAULT, 2002; GORDALIZA *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual a podofilotoxina bloqueia a divisão celular está relacionado com a sua capacidade de inibir a polimerização dos microtúbulos durante a mitose (YOU, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005). No entanto, esta propriedade não foi detectada nos seus derivados, o etoposídeo e tenoposídeo, sugerindo que outros mecanismos devem estar envolvidos na importante propriedade antitumoral demonstrada por estes compostos. Já outros derivados da podofilotoxina demonstraram reter a atividade citotóxica original além de serem inibidores da topoisomerase II *in vitro* sugerindo que alguns análogos possuem um mecanismo de ação diferente até mesmo desconhecido (GORDALIZA *et al.*, 2000; 2001; 2004; FARKYA *et al.*, 2004). Um trabalho na literatura demonstrou que outro derivado da podofilotoxina o 4DPG (4-demethyl-picropodophyllotoxin 7'-O-beta-D-glucopyranoside), possui importante atividade citotóxica contra as células leucêmicas K-562 por indução de apoptose e ativação da caspase 3. O

efeito anti-proliferativo demonstrado do 4DPG foi bem maior quando comparado ao etoposídeo (QI *et al.*, 2005).

O fator limitante destes compostos é a citotoxicidade para células normais e conseqüentes efeitos colaterais oriundos de falta de seletividade. Limitações como, mielosupressão e desenvolvimento de resistência à droga são determinantes para a descontinuidade da terapêutica. Diante disto, o isolamento e a identificação química de lignanas pode ser utilizada para o entendimento de suas propriedades biológicas, além de ser uma área promissora na pesquisa com produtos naturais. O uso extensivo na clínica faz do grupo das lignanas uma família importante para o estudo de moléculas de partida para o desenvolvimento de novos agentes baseados em modificações estruturais. Neste sentido, se faz necessário buscar e investigar novos compostos mais potentes e análogos com menor toxicidade e desta forma com melhores índices terapêuticos (HARTMANN e LIPP, 2006).

A neolignana grandisina é encontrada predominantemente em arbustos e se acumulam em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de microorganismos e exibe propriedades contra insetos, como o efeito antialimentar induzido pela piperona, isolada de *Piper futokadsura* Siebold (Piperaceae), (SIMÕES *et al.*, 2004).

A grandisina foi identificada como componente majoritário no extrato bruto das raízes e das folhas de *Piper solmsianum* (MARTINS *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2003).

As atividades biológicas investigadas sobre a grandisina até o presente momento indicam atividade tripanocida contra a forma trimastigota do *Trypanossoma cruzi* (MARTINS *et al.*, 2003), atividade antimalárica (ZHANG *et al.*, 2001) e afinidade por receptores opióides humanos (CARROLL *et al.*, 2005). Essa lignana apresenta forte atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da Doença de Chagas, na sua forma tripomastigota (LOPES *et al.*, 1998), e que motivou a pesquisa de outras atividades biológicas, como na hematopoiese em ratos (FIGUEIREDO *et al.*, 2005), e ação bactericida contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*, e antifúngica contra dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton*

mentagrophytes e *Trichophyton rubrum* (CAMPOS *et al.*, 2007). Há ainda estudos preliminares de tratamento de infecções urinárias utilizando o extrato dessa espécie (BOHATCH *et al.*, 2007).

A atividade tripanocida de produtos da síntese de novos análogos da grandisina também tem sido testada por alguns grupos de pesquisa e os resultados demonstram que alguns destes produtos possuem melhor atividade quando comparada a grandisina. (BERNARDES *et al.*, 2006).

A grandisina também se mostrou eficaz no controle ao mosquito *Aedes aegypti*, o vetor transmissor da doença dengue (CABRAL *et al.*, 2008).

Grandisina é uma neolignana presente em várias espécies de plantas do Norte e Nordeste do Brasil usadas na medicina popular para o tratamento de uma variedade de transtornos, especialmente cólica, inflamações, artrite, distúrbios hepáticos e dispepsia. Estudos recentes demonstram que a grandisina, tem atividade antinociceptiva e antiinflamatória, onde a atividade antinociceptiva é resultado de um mecanismo antiinflamatório, justificando o uso na medicina popular de plantas ricas em grandisina para o tratamento dos sintomas causados pelo processo inflamatório como dor e edema (CARVALHO *et al.*, 2009).

Valadares *et al* (2009) comprovou que a grandisina, uma neolignana apresenta importante atividade antitumoral e anti angiogênica in vivo utilizando o modelo experimental do tumor ascístico de Ehrlich.

Analisando a continuidade da pesquisa acerca do potencial antitumoral da grandisina, a mesma foi objeto de estudo deste trabalho.

3 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por finalidade avaliar o potencial citotóxico e indutor de apoptose da grandisina em células da linhagem K-562, as quais apresentam fenótipo de resistência a fármacos.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico da grandisina em células K-562 e linfócitos normais empregando-se as técnicas de redução do tetrazolium e azul de tripano;
- Avaliar as alterações morfológicas das células K-562 após o tratamento com a grandisina.
- Averiguar os mecanismos de morte celular através de marcação usando anexina V e Iodeto de Propídeo.
- Estudar efeito sobre o ciclo celular por marcação do conteúdo de DNA com iodeto de propídeo.
- Investigar a atividade das caspases -6 -8 e -9 por ensaio colorimétrico;
- Analisar o potencial indutor de apoptose por meio do estudo da expressão de proteínas Bcl-2 e Bax por método de imunocitoquímica;
- Pesquisar a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 por método de imunocitoquímica;

4 METODOLOGIA

4.1 Grandisina

A grandisina (Figura 6) isolada da *Piper solmsianum* foi fornecida pelo professor Dr. Massuo Jorge Kato do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, de acordo com Lopes *et al.*, 1998. A grandisina foi preparada como uma dispersão micelar de óleo em água. As micelas foram preparadas como a seguir: primeiro 50µg de fosfatidilcolina (PC), 4:1 óleo de girassol (mol/mol PC) e grandisina (10mg/mL) foram dissolvidos em 1,0 mL de clorofórmio. A mistura foi secada embaixo de uma atmosfera de nitrogênio até que todo o clorofórmio fosse removido. A película lipídica seca, foi adicionado 1 mL de água para promover a hidratação da mistura grandisina- lipídio. Depois de uma hora, a mistura foi sonicada por 10 minutos em sonificador para obter uma dispersão homogênea de pequenas micelas.

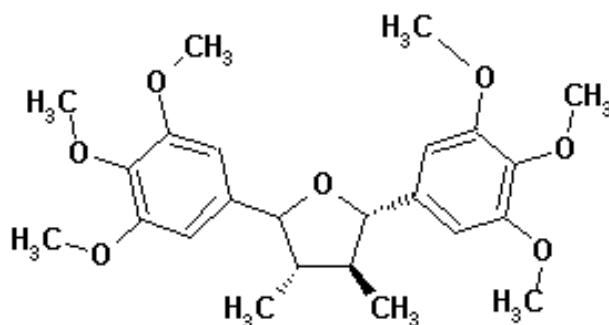


Figura 6 – Estrutura molecular da grandisina.

4.2 Linhagem Celular

A linhagem K-562 (Figura 7 e 8), uma linhagem de células eritroleucêmicas humanas, foi obtida do banco de células American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) e foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (SigmaTM, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CultilabTM) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina e mantidas em estufa (Figura 9) com 5% de CO₂ a uma temperatura constante de 37°C.

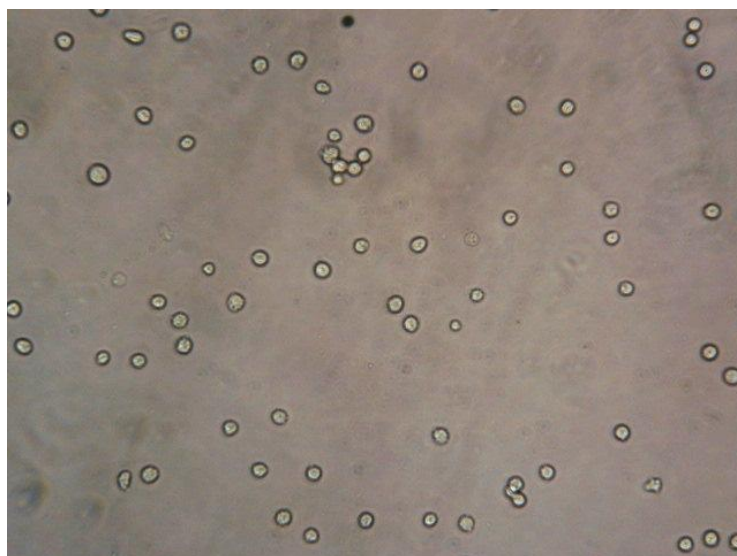


Figura 7 - Células K-562. Aumento 20x. B.S.Rodrigues, 20/09/2008.



Figura 8 - Garrafa confluyente de células K-562. B.S.Rodrigues, 20/09/2008.



Figura 9 - Estufa de Cultura Celular. E.G.P. Menezes, 20/09/2008.

4.3 Cultura de Linfócitos

O sangue periférico humano foi obtido por venipuntura de doadores adultos saudáveis, diluído em igual volume de meio RPMI 1640, colocado em camadas sobre Ficoll Hypaque solução de separação por gradiente de densidade (1.077g mL^{-1}) e centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. As células mononucleares foram removidas, lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 e ressuspensas em RPMI 1640 meio suplementado com 2mM de glutamina, antibióticos (100 IU de penicilina /mL, 100 μg de estreptomicina/mL) e 10% de soro fetal bovino. Os leucócitos foram cultivados a uma densidade de 1×10^6 com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fitohemaglutinina em microplacas de 96 poços, na presença e ausência de grandisina por 24 e 48 horas em uma atmosfera a uma temperatura de 37° com 5% de CO_2 . Os doadores consentiram em participar do estudo.

4.4 Teste de Citotoxicidade

4.4.1 Método de Viabilidade por Azul de Tripano

Neste método que avalia a integridade da membrana celular as células foram observadas por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram o corante, possuíam aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração azulada. As células foram incubadas com diferentes concentrações da grandisna (0,018 – 2,365 μMol) por um período de 24 e 48 horas, em estufa úmida com 5% de CO_2 no ar. Após esse período, as células em suspensão foram diluídas (1:10) em solução de azul de tripano e depois desse período foi feita a leitura para determinar o número de células viáveis e inviáveis (RENZI *et al.*, 1993). Cada concentração foi testada em três diferentes experimentos corridos em quatro replicatas. A proliferação e a viabilidade das células tratadas com a droga foram expressas como porcentagem da proliferação e viabilidade das células não tratadas do controle (100%).

4.4.2 Método de Redução do Tetrazolium (MTT)

O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]} pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado Formazan. As células foram incubadas em diferentes concentrações da droga em estudo (0,018 – 2,365 μMol) em estufa úmida com 5% de CO_2 no ar por 24 e 48 horas. Logo após, a solução de MTT (1mg/mL) foi adicionada e novamente as células foram incubadas durante 4 h (37°C) que é o tempo necessário para a redução deste corante. Em seguida, foi adicionado o meio solubilizante do MTT e as mesmas foram incubadas por mais 24 horas em estufa úmida com 5% de CO_2 no ar. Após esse período fez-se a leitura em ELISA a 570nm (MOSMANN, 1983, DENIZOT e LANG, 1986). Cada concentração foi testada em três diferentes experimentos corridos em quatro replicatas. A proliferação e a viabilidade das células tratadas com a droga foram

expressas como porcentagem da proliferação e viabilidade das células não tratadas do controle (100%).

O potencial citotóxico da droga em estudo foi calculado da seguinte maneira:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço}}{\text{Média da absorbância do controle}} \times 100$$

4.5 Métodos de Detecção de Morte Celular por Apoptose

4.5.1 Índice Apoptótico

Inicialmente as células K-562 foram incubadas em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂, com grandisina (0,036 µMol) por 24 e 48h. Após este período as células foram centrifugadas (citocentrífuga) para dispersão em lâmina silanizada. Em seguida foram coradas com corante hematoxilina e analisadas em aumento de 40x. O número de células apoptóticas foi expresso como o percentual do total de células. Índice apoptótico foi determinado após contagem de 100 células. As células que apresentavam características morfológicas de apoptose tais como: marginalização ou condensação da cromatina, fragmentação celular ou nuclear, estruturas celulares fragmentadas dentro de vesículas (corpos apoptóticos), foram consideradas positivas.

4.5.2 Marcação Anexina V- FITC/IP por Citometria de Fluxo

A mudança na assimetria da membrana plasmática pode ser detectada por citometria de fluxo utilizando um marcador conjugado a anexina V, uma proteína

que possui alta afinidade pela fosfatidilserina. Isso é feito, conjugando-se anexina V com fluoresceína (FITC- isotiocianato de fluoresceína) (MARTIN *et al.*, 1995).

Porém, a anexina V também se liga aos resíduos de fosfatidilserina no folheto interno da membrana plasmática de células necróticas devido à perda da integridade da membrana plasmática, possibilitando a entrada da proteína conjugada na célula. No entanto utilizando iodeto de propídeo como contra marcador para diferenciar células necróticas, é possível utilizar anexina v para diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas (PLASIER, 1999)

A avaliação foi realizada usando o kit de Detecção de Apoptose TACSTM Annexin V-FITC (R & D System) de acordo com as instruções do fabricante.

- 1) No dia anterior ao teste foram preparadas 4 garrafas com células K-562 a uma concentração de 1×10^6 células /mL. Primeira garrafa foi utilizada como controle (sem grandisina); as demais foram incubadas de modo a obter as seguintes concentrações de grandisina respectivamente: 0,018 μ Mol, 0,036 μ MoL e 0,072 μ Mol, estas garrafas foram incubadas por 24 horas.
- 2) Foi transferido de cada garrafa 3 mL da suspensão de células para cada tubo correspondente. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm.
- 3) O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com 500 μ L de PBS gelado. E centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm.
- 4) O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com 100 μ L do reagente de incubação e então incubadas por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente.

Reagente de incubação:

Buffer 10x concentrado	10 μ L
Iodeto de Propídeo	10 μ L
Anexina V-FITC	1 μ L
dH ₂ O	79 μ L
Volume total	100 μ L

- 5) Foi adicionado 400 mL de solução Buffer (0,01M Hepes, ph 7,4, 0.14M Nacl e 2.5mM CaCl₂) gelada em cada tubo.

Preparo da solução Buffer

Buffer 10x concentrado	50µL
dH ₂ O	450µL
Volume total	500µL

- 6) A leitura foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II™ Flow Cytometer (Figura 10) considerando-se 10.000 eventos.



Figura 10 - Citômetro de Fluxo BD FACSCanto II™. E.G.P. Menezes, 26/03/2009.

4.5.3 Ciclo celular

Para análise do ciclo celular as células (5×10^5) foram tratadas com e sem a grandisina (0,036 µMol) por 24 horas em meio RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino, mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após incubação as células foram lavadas duas vezes com 1mL de PBS gelado, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O botão celular foi ressuscitado por gotejamento com 1mL de solução fixadora (etanol a 70% gelado, anteriormente preparada), e incubadas a 4°C “overnight”. As células foram lavadas em PBS gelado e ressuscitadas com 1mL de solução contendo 200µg/mL de RNase A e 50µg/mL de iodeto de propídio, incubadas a 4°C, protegidas de luz por 2 horas. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson). Os

resultados foram apresentados em gráficos representando o número de células versus o conteúdo de DNA indicado pela intensidade de fluorescência.

4.5.4 Atividade das Caspases -6 -8 e -9

O ensaio é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilide (*p*NA) após a quebra das substâncias X-*p*NA, onde o X são seqüências de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas VEID-*p*NA, IETD-*p*NA, e LEHD-*p*NA para caspase, -6 -8 e -9, respectivamente.

Para avaliação da atividade das caspases foi realizada usando o kit colorimétrico de protease (R & D System) como descrito abaixo:

- 1) O número de células para indução foi de 2×10^6 células/mL em cada garrafa de 25 mL.
- 2) As células foram incubadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24 horas.
- 3) Após a incubação das células com a grandisina todo o conteúdo foi da garrafa foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e as células foram contadas.
- 4) Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 2000rpm e o botão de células foi ressuspenso com a solução de lise gelada. Para cada 1×10^6 células adicionou-se 25 μ L de solução de lise.
- 5) As células foram encubadas por 10 minutos em banho de gelo. Após a incubação, foi centrifugada por 1 minuto a 10000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e mantido gelado.
- 6) Para desenvolver a reação foi utilizado microplaca de 96 poços devidamente identificada.
- 7) Para cada reação foi requerido 50 μ L da solução de células lisadas. Cada poço representou uma reação.
- 8) Para cada poço foi acrescentado 5 μ L do substrato da caspase a ser pesquisada sendo VEID-*p*NA, IETD-*p*NA, e LEHD-*p*NA para caspase, -6 -8 e -9, respectivamente.
- 9) A placa foi incubada a 37°C por 2 horas
- 10) Após este período foi realizado a leitura na leitora de placa (ELISA) no comprimento de onda de 405nm.

- 11) O nível de atividade enzimática é diretamente proporcional a cor da reação.

4.5.5 Expressão de Proteínas Apoptóticas e Relacionadas

Este ensaio tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos contra a proteína que se pretende identificar e localizar numa dada célula. A proteína em questão funciona como antígeno (SIMERLY, 2003).

Para realização desse ensaio foi utilizado o kit NovoLink Polymer Detection Systems. NovoLink é a terceira geração dos sistemas de detecção à base de polímeros, para uso na técnica de imunocitoquímica. O kit NovoLink utiliza um polímero compacto, associado a um inibidor de ligações inespecíficas. Este ensaio permite a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica.

A atividade endógena da peroxidase é neutralizada através da aplicação de Novocastra TM Peroxidase Block. Segue-se a isto a aplicação do Novocastra TM Protein Block, para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e do polímero. Subseqüentemente a secção é incubada com um anticorpo primário a uma diluição ótima. Novocastra TM Post Primary Block é empregado para ativar a penetração do reagente polímero subseqüente. O NovoLink TM Polymer detecta quaisquer anticorpos primários ligados aos tecidos. As secções são incubadas com o substrato/cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB), um produto da combinação de Novocastra TM DAB Chromogen com NovoLink TM DAB Substrate Buffer (Polymer). A reação com a peroxidase produz um precipitado vizível de cor castanha, no local do antígeno. Os resultados são interpretados por meio de microscópio óptico.

Primeira Etapa - Incubar as células K-562 com grandisina:

- 1) O número de células para indução de apoptose foi de 1×10^4 células/mL em cada garrafa de 25 mL.
- 2) As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂, com grandisina 0,036 µMol por 24h.

Segunda Etapa – Preparo das Lâminas Cito Spin:

- 1) As células K-562 foram contadas na câmara de Neubauer a fim de obter a concentração de 1×10^4 células/mL;
- 2) Foram utilizadas lâminas silanizadas e filtros de papel os quais foram montados no suporte;
- 3) Foram adicionados 250µL da suspensão de células para cada lâmina e centrifugada a 800 rpm por 5 minutos;
- 4) As lâminas foram retiradas do suporte, secas e os filtros desprezados;
- 5) As lâminas foram conservadas envolvidas em papel alumínio no freezer a -20°C até a data de seu uso;

Terceira Etapa – Procedimento:

- 1) As lâminas foram descongeladas e deixadas até atingir a temperatura ambiente;
- 2) A área onde as células estavam foi delimitada com caneta de silicone (hidrofóbica);
- 3) A câmara úmida foi preparada e as lâminas dispostas sobre ela devidamente identificadas;
- 4) Acetona gelada foi gotejada sobre a área delimitada por 5 minutos;
- 5) As lâminas foram lavadas com tampão TBS;
- 6) Foi adicionado Peroxidase Block, do kit NovoLink, e deixado agir por 5 minutos;
- 7) As lâminas foram lavadas com tampão TBS;
- 8) Foi adicionado Protein Block, do kit NovoLink e deixado agir por 5 minutos;
- 9) As lâminas foram então lavadas com tampão TBS e cuidadosamente secas;
- 10) Foi adicionado 100µL do anticorpo específico previamente diluído e incubado por 2 horas;
- 11) As lâminas foram lavadas com tampão TBS;
- 12) Foi adicionado Post Primary Block, do Kit NovoLink, e deixado agir por 30 minutos para os anticorpos Ki67, Bax e Bcl2.
- 13) As lâminas foram lavadas com tampão TBS;

- 14) Foi adicionado Polymer, do Kit NovoLink e deixado agir por 45 minutos para os anticorpos Ki67, Bax e Bcl2.
- 15) As lâminas foram lavadas com tampão TBS;
- 16) Foi adicionado 100µL da solução DAB e deixado agir por 5 minutos;
- 17) As lâminas foram lavadas com água destilada;
- 18) Foi adicionado Hematoxylin, do Kit NovoLink e deixado agir por 15 minutos e depois enxaguado em água corrente;

Quarta Etapa – Desidratação das lâminas:

- 1) As lâminas foram mergulhadas nas cubas na seguinte ordem: álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto 1 e álcool absoluto 2;
- 2) As lâminas foram montadas utilizando-se resina e lamínula.
- 3) A leitura foi realizada em microscopia óptica e a percentagem de expressão das proteínas foi determinada pela contagem de no mínimo 300 células.

4.6 Análise Estatística

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por três experimentos independentes. Os resultados foram transformados em porcentagem do controle e IC₅₀ (concentração que produz um efeito inibitório de 50% sobre o parâmetro avaliado) foram obtidas graficamente a partir da curva concentração-resposta. Os resultados são expressos como média ± S.D. de quatro repetições. Para os parâmetros índice apoptótico, caspases, Bcl-2 e Bax a análise estatística foi realizada utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando os grupos tratados com os controles e Kruskal-Wallis entre os grupos tratados. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$. O software utilizado foi o Modfit.

5 RESULTADOS

5.1 Testes de Citotoxicidade

5.1.1 Método de Viabilidade por Azul de Tripano

O efeito da grandisina no crescimento e viabilidade das células K-562 e linfócitos foi examinado após 24 horas de exposição em cultura. Os resultados estão apresentados na figura 11. A inibição de 50% (IC_{50}) foi obtida com a concentração de 1,075 μ Mol para as células K-562 e 0,375 μ Mol para os linfócitos. À proliferação das células K-562 e dos linfócitos foi inibida de maneira concentração - dependente em resposta ao aumento das concentrações (0,018 – 2,365 μ Mol).

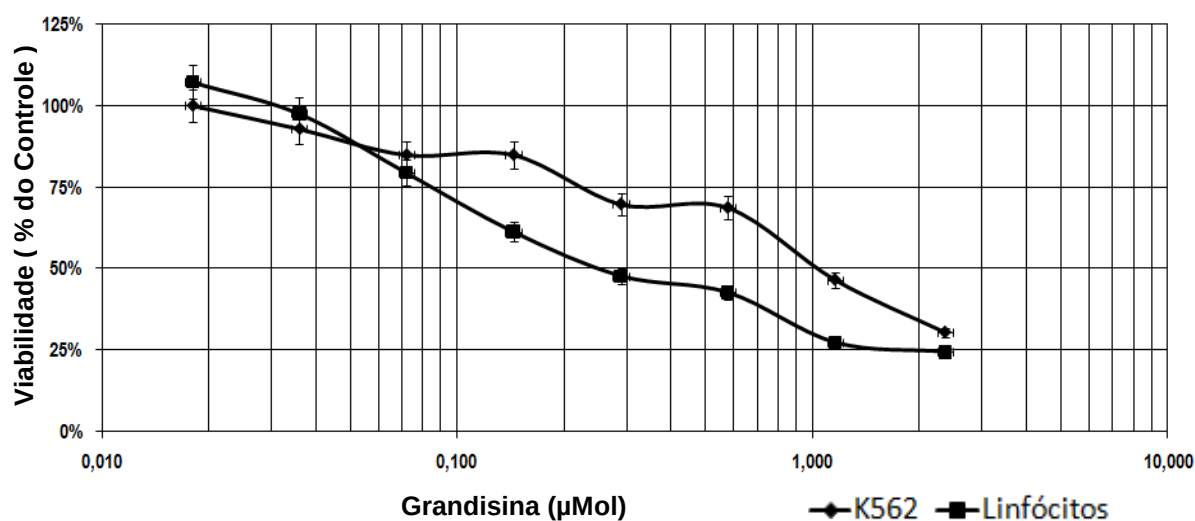


Figura 11 - Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por **24 horas**. A viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do **Azul de Tripano**. Na ausência da grandisina a viabilidade foi considerada como 100%. Os resultados representam a média de +/- do desvio padrão de três experimentos corridos em quatro replicatas.

Já a exposição por 48h (figura 12) das células K-562 a concentrações crescentes da grandisina, usando o método de exclusão de azul de tripano, apresentou IC_{50} de 0,198 μ Mol para K-562 e IC_{50} 0,200 μ Mol para linfócitos.

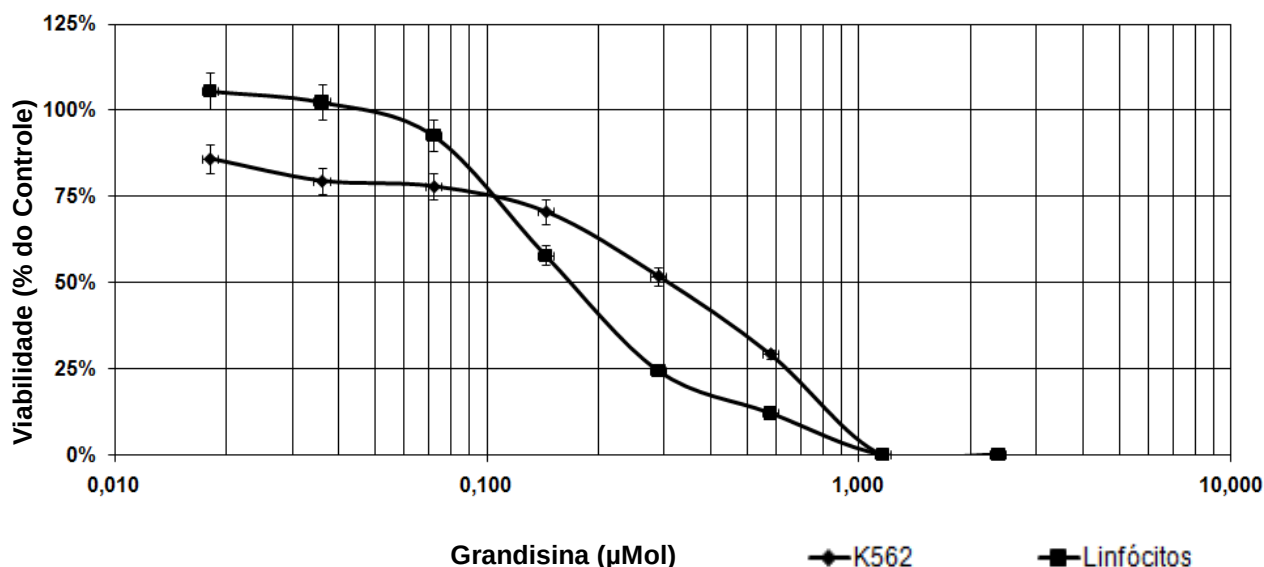


Figura 12 - Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 µMol) por **48 horas**. A viabilidade foi determinada pelo método de exclusão do **Azul de Tripiano**. Na ausência da grandisina a viabilidade foi considerada como 100%. Os resultados representam a média de $\pm$ do desvio padrão de três experimentos corridos em quatro replicatas.

5.1.2 Teste de Viabilidade por Redução do Tetrazolium

A citotoxicidade da grandisina em células eritroleucêmicas K-562 foi investigada após incubar pelos períodos de 24 e 48 horas (figura 13 e 14), usando o método colorimétrico MTT. Da mesma forma que no teste de citotoxicidade anterior, com o MTT, observamos uma inibição da proliferação celular concentração tempo – dependente após o tratamento com a grandisina. A inibição de 50% (IC_{50}) no período de 24 horas foi obtida com a concentração 11,98 µMol para K-562 e 0,425 µMol para linfócito. No período de 48 horas de exposição foi de 0,685 µMol para K-562 e 0,851 µMol para linfócitos.

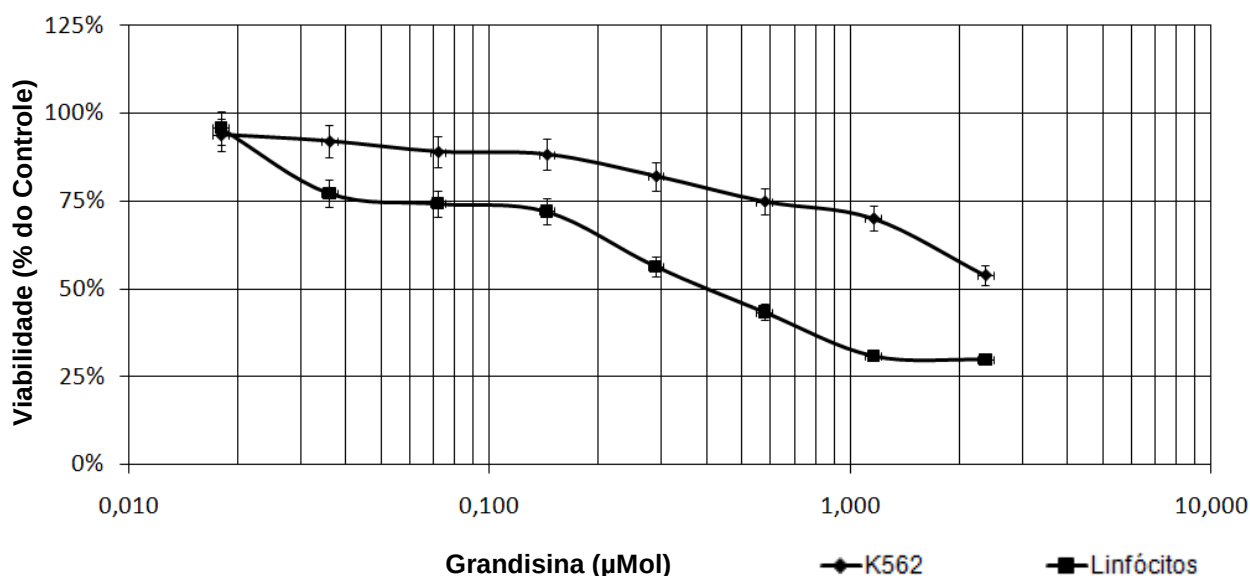


Figura 13 - Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por **24 horas**. A viabilidade foi determinada pelo teste de redução do **MTT**. Na ausência da grandisina a redução do sal foi considerada como 100%. Os resultados representam a média de $\pm$ do desvio padrão de três experimentos corridos em quatro replicatas.

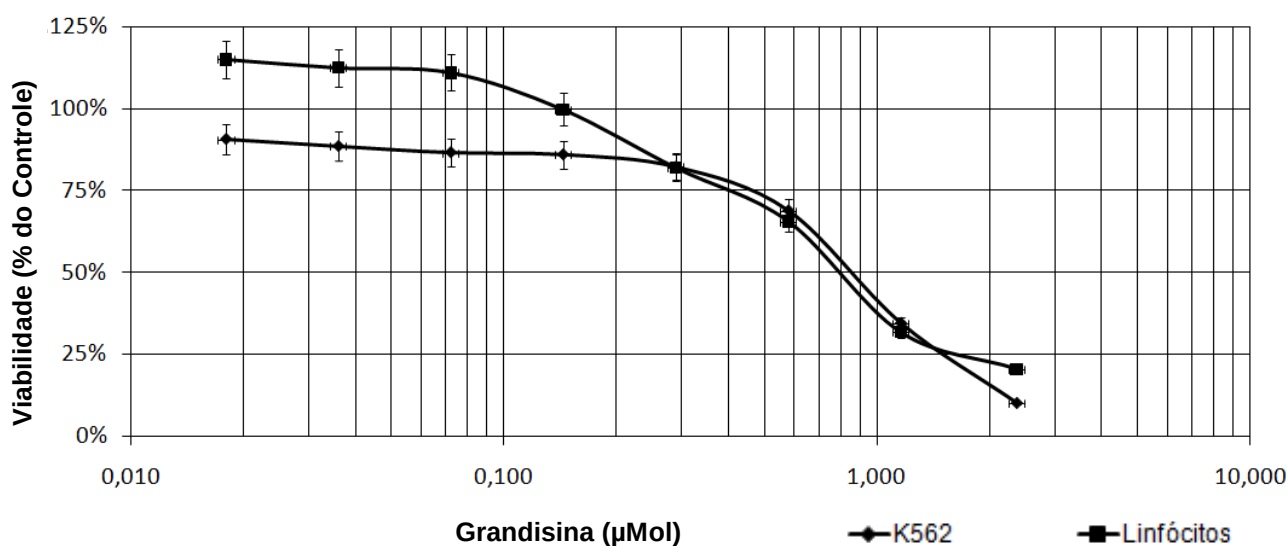


Figura 14 - Citotoxicidade em células K-562 e Linfócitos (1×10^6 células/mL) tratadas com diferentes concentrações de grandisina (0,018 – 2,365 μ Mol) por **48 horas**. A viabilidade foi determinada pelo teste de redução do **MTT**. Na ausência da grandisina a redução do sal foi considerada como 100%. Os resultados representam a média de $\pm$ do desvio padrão de três experimentos corridos em quatro replicatas.

5.2 Métodos de Detecção de Morte Celular por Apoptose

5.2.1 Índice Apoptótico

Uma vez detectada a capacidade citotóxica da grandisina sobre as células K-562, estudamos na sequência alguns mecanismos envolvidos na morte celular, em especial os mecanismos apoptóticos. Para entender o mecanismo pelo qual a grandisina promove a perda de viabilidade em células K-562, iniciamos nossos estudos com a análise morfológica das células com intuito de caracterizar apoptose. Os efeitos da grandisina sobre a morfologia das células K-562 foram examinados 24 horas após o tratamento com 0,036 μMol de grandisina. Os resultados estão apresentados na figura 15. Os quais mostraram um aumento do número de células em apoptose de quatro vezes, em relação ao controle. Como indicado nas fotomicrografias abaixo as principais características estudadas foram: cromatina condensada, vacúolos, fragmentação de DNA e membrana.

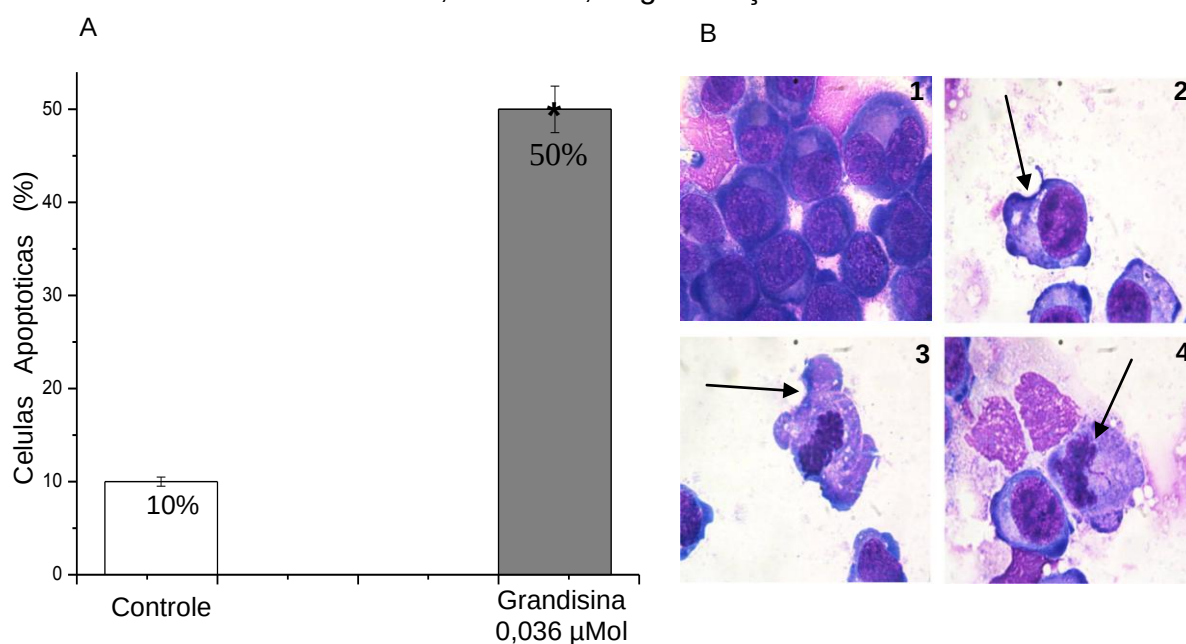


Figura 15 - (A) Índice de apoptose das células K-562 expostas a grandisina a 0,036 μMol por 24 horas, determinada por coloração de hematoxilina. (B) (1) Características morfológicas de células viáveis do controle. (B) (2 a 4) Características morfológicas apoptóticas das células K-562 tratadas com grandisina a 0,036 μMol por 24 horas. Mostrando formação de vacúolos, fragmentação de membrana e cromatina condensada, respectivamente.

5.2.2 Marcação Anexina V- FITC/IP por Citometria de Fluxo

A morte celular foi analisada também por citometria de fluxo após a marcação das células com anexina V e iodeto de propídeo. O tratamento com a grandisina foi realizada em três concentrações (0,018 μMol , 0,036 μMol , 0,072 μMol), no período de 24 horas. As células tratadas com grandisina na concentração de 0,018 μMol apresentou apoptose recente sete vezes superior e apoptose tardia duas vezes superior em relação ao controle (figura 16). Na concentração intermediária de 0,036 μMol , as células K-562 apresentaram apoptose recente vinte e sete vezes superior e apoptose tardia dezesseis vezes superior em relação ao controle (figura 17). Por fim, quando as células foram tratadas com grandisina na concentração de 0,072 μMol apresentou apoptose recente quinze vezes superior e apoptose tardia dezoito vezes superior em relação ao controle (figura 18).

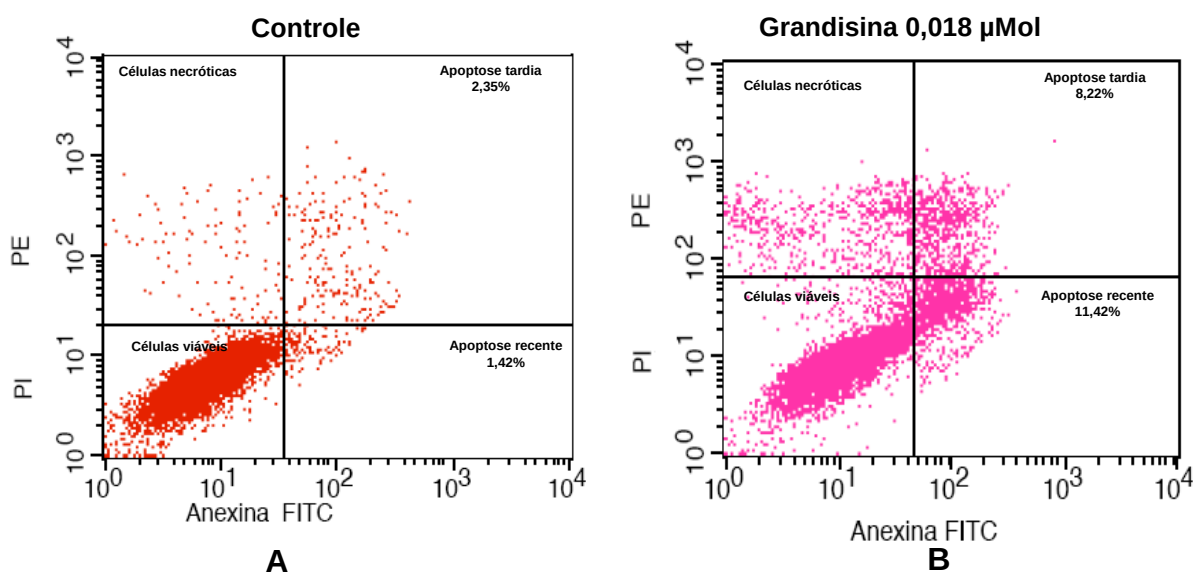


Figura 16 - Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina usando anexina V e iodeto de propídeo. **(A)** Células K-562 não tratadas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente e apoptose tardia ou necrótica. **(B)** Células K-562 tratadas com grandisina 0,018 μMol por 24 horas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente (11,42%) (anexina V- FITC positivo), apoptose tardia (8,22%) e necrótica.

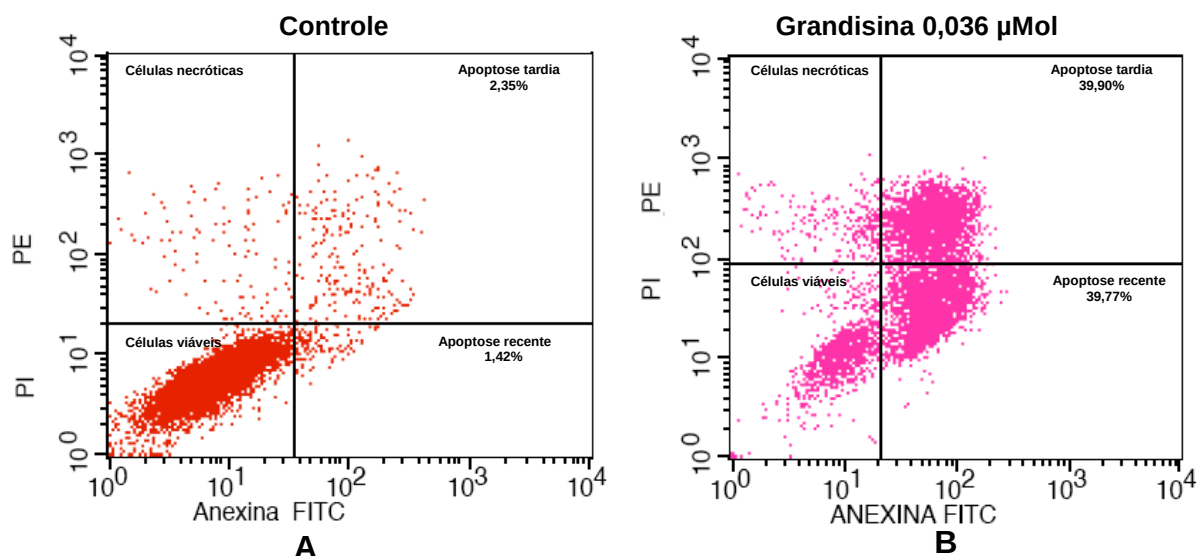


Figura 17 - Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina usando anexina V e iodeto de propídeo. (A) Células K-562 não tratadas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente e apoptose tardia ou necrótica. (B) Células K-562 tratadas com grandisina 0,036 µMol por 24 horas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente (anexina V- FITC positivo), apoptose tardia e necrótica.

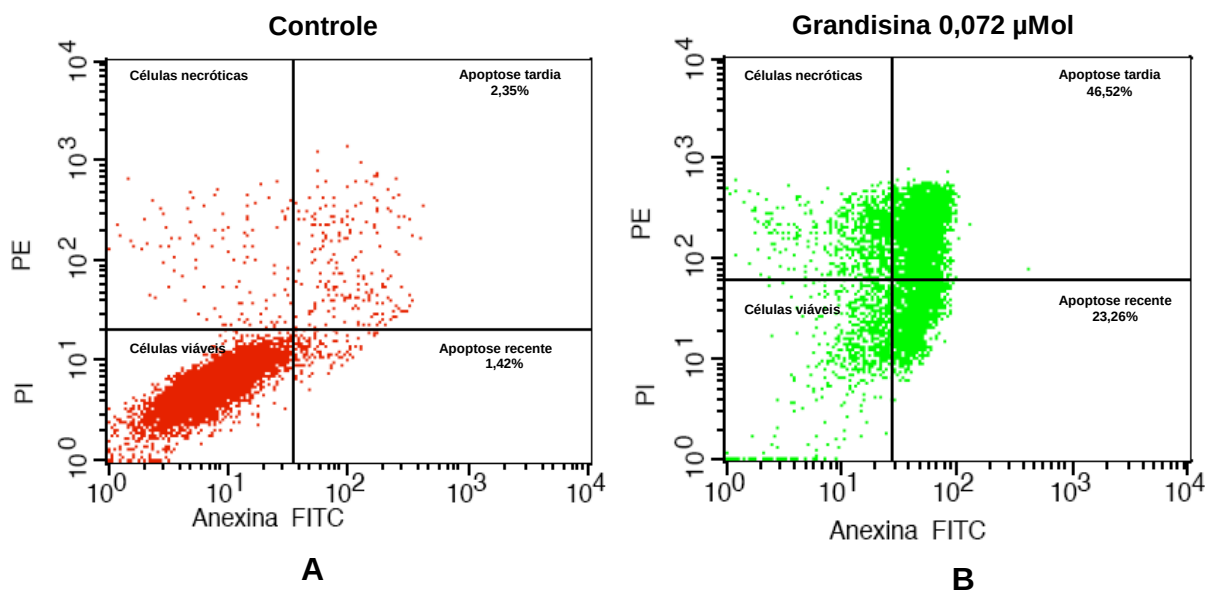


Figura 18 - Análise de células K-562 (1×10^6 células/mL) tratadas com grandisina usando anexina V e iodeto de propídeo. (A) Células K-562 não tratadas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente e apoptose tardia. (B) Células K-562 tratadas com grandisina 0,072 µMol por 24 horas, a figura mostra células viáveis, apoptose recente (anexina V- FITC positivo), apoptose tardia e necrótica.

5.2.3 Ciclo Celular

Análise do ciclo celular das células K-562 (controle) apresentou 26,10%, 60,80% e 13,10% das células em fase G1, S e G2, respectivamente (figura 19). Por outro lado, quando as células foram tratadas com grandisina (0,036 μMol) o perfil de distribuição das células foi de 38,41%, 48,74% e 12,85% nas fases G1, S e G2, respectivamente (figura 20). Em relação às análises do ciclo celular das células K-562, o tratamento das células com grandisina (0,036 μMol) aumentou em aproximadamente 47% da população de células em fase G1, diminuiu 21% e 2%, da população de células em fase G2 e S, respectivamente, quando comparadas com a população de células do controle.

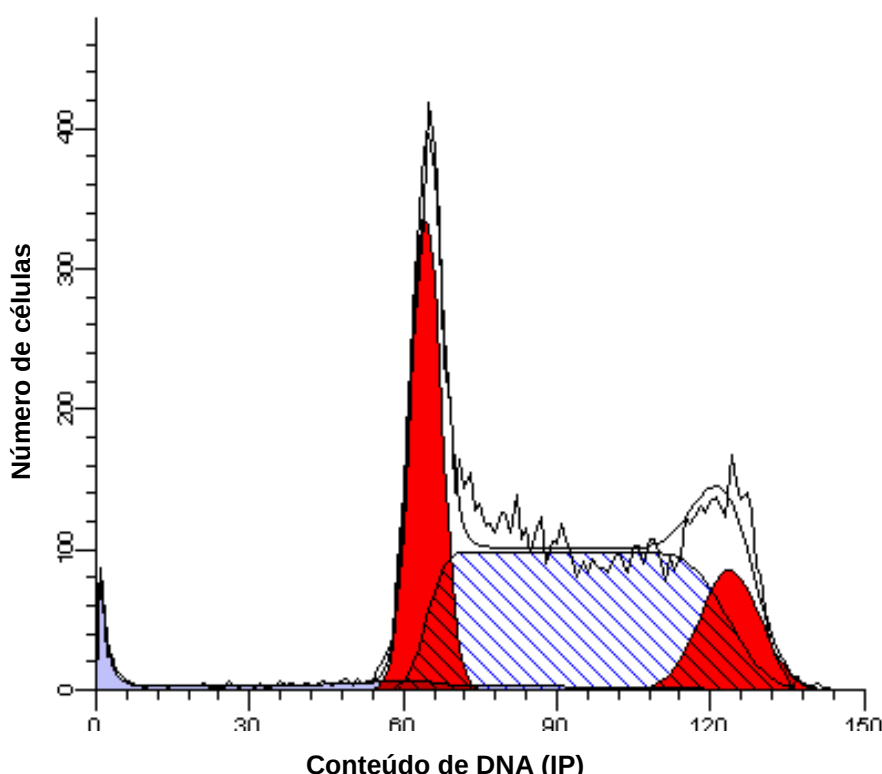


Figura 19 - Análise do ciclo celular das células K-562 (controle) por Citometria de Fluxo. Os dados foram avaliados usando o software Modfit.

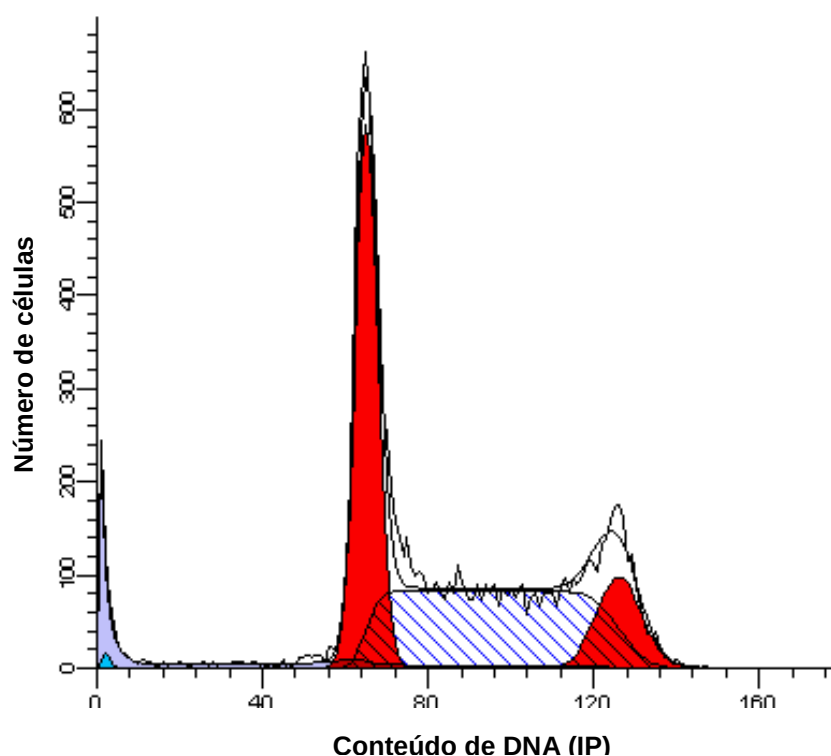


Figura 20 - Análise do ciclo celular das células K-562 após tratamento com Grandisina a 0,036 μ Mol por 24 horas. Os dados foram avaliados usando o software Modfit.

5.2.4 Teste de Atividade das Caspases -6 -8 e -9

Uma vez que as proteases, em especial as caspases participam ativamente dos processos de morte celular, foram examinados os efeitos da grandisina na ativação das caspases após 24 horas de tratamento. Para elucidar se as caspases são ativadas por processos apoptóticos grandisina-induzida sua atividade proteolítica foi mensurada utilizando ensaio colorimétrico.

A partir da detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilide (*p*NA) foi possível detectar atividade das caspases 6 (VEID-*p*NA) ,8(IETD-*p*NA) e 9 (LEHD-*p*NA), na concentração 0,036 μ Mol. As caspases e suas respectivas porcentagens de ativação encontram-se na figura (21). Verificamos que a grandisina aumentou 21,4%, 29% e 37% da atividade das caspases, 6, 8 e 9, respectivamente.

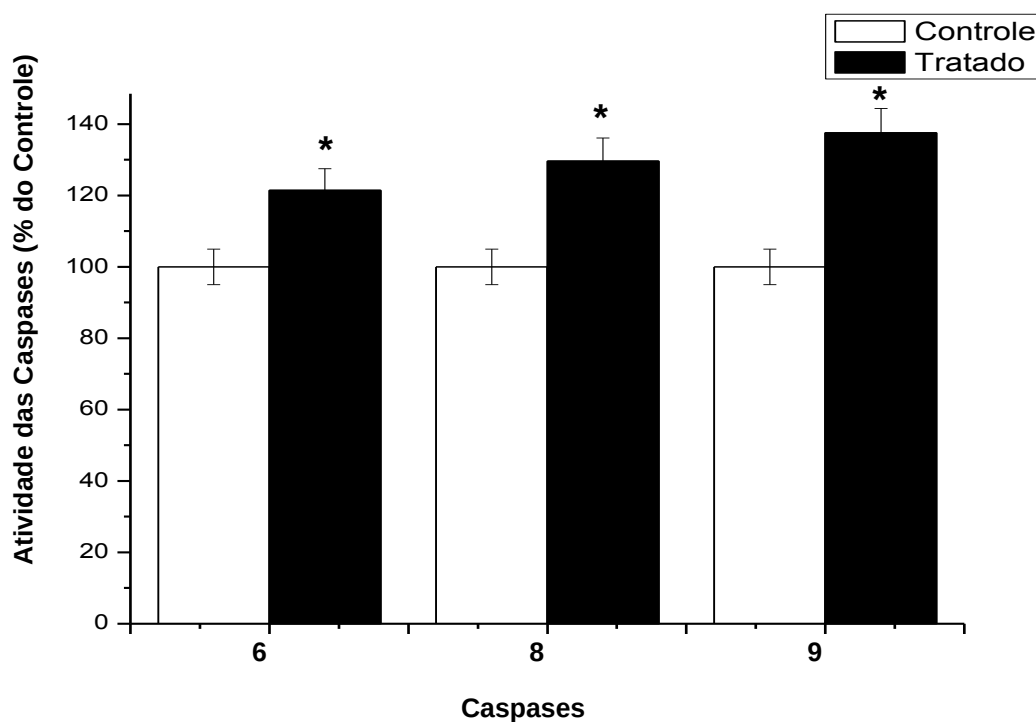


Figura 21 - Atividade relativa das caspases em células K-562 (2×10^6 células/mL) tratadas com **Grandisina (0,036 μ Mol)** por **24 horas**. No ensaio colorimétrico por detecção espectrofotométrica do cromóforo p-nitroanilide (pNA) foi determinado a atividade das caspases 6, 8 e 9 como descrito em “Materiais e Métodos”. Na ausência da grandisina a atividade foi considerada 100%. A barra de erros representa o desvio padrão. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando os grupos tratados com os controles e Kruskal-Wallis entre os grupos tratados

5.2.5 Expressão de Proteínas Apoptóticas e Relacionadas

a) Bcl-2

Na figura 22 A é possível observar a expressão da proteína Bcl-2 no sistema controle (K-562), ou seja, células sem tratamento. A figura 22 B representa as células K-562 tratadas com a grandisina na concentração de 0,036 μ Mol por 24 horas. Ao comparar as lâminas A e B observam-se a redução de expressão da proteína Bcl-2. A quantificação das células que apresentaram a

expressão de Bcl-2 é mensurada na figura 22 C. Observamos uma redução de 40,86% da expressão de Bcl-2 nas células tratadas, em relação ao grupo controle.

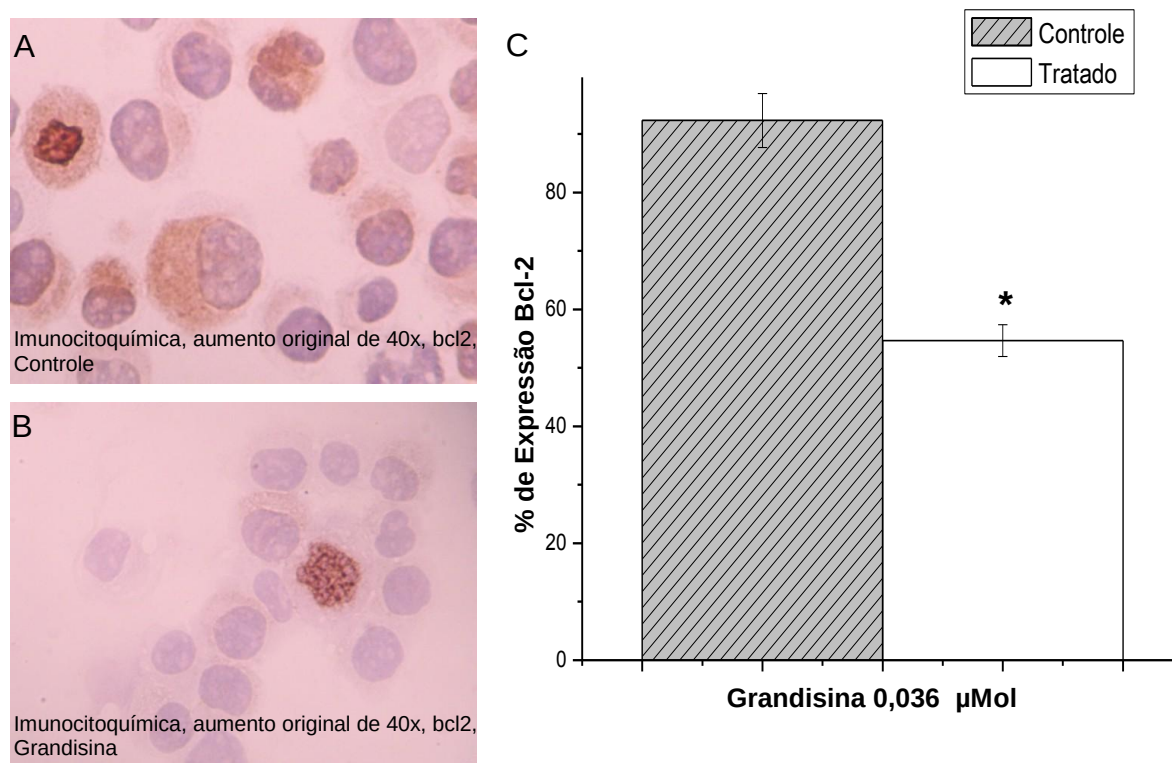


Figura 22 - A e B - Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) controle e tratadas com grandisina 0,036 µMol por 24h. **C** - Expressão de Bcl-2 em células K-562 não tratadas e tratadas com grandisina 0,036 µMol por 24h. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando os grupos tratados com os controles e Kruskal-Wallis entre os grupos tratados

b) Bax

A figura 23 A, B e C representa a expressão dessa proteína em células K-562. A figura 23 A apresenta células K-562 não tratadas (controle). Na figura 23 B é possível observar as células K-562 quando tratadas com grandisina na concentração 0,036 µMol por 24 horas e na figura 23 C verifica-se o índice de expressão do controle e tratado, havendo redução da expressão de Bax após o tratamento com grandisina. Observamos uma redução de 81,24% da expressão de Bax nas células tratadas, em relação ao grupo controle.

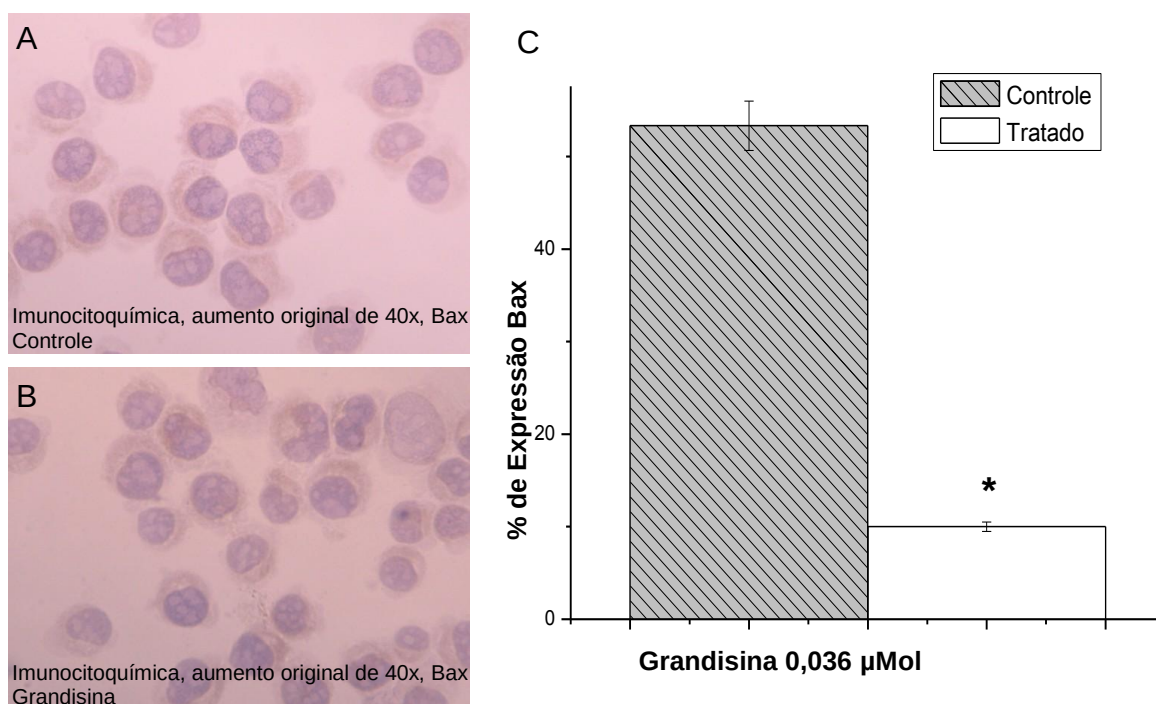


Figura 23 - A e B - Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) controle e tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h. **C** - Expressão de Bax em células K-562 não tratadas e tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24 horas. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$. Análise estatística foi realizada utilizando teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando os grupos tratados com os controles e Kruskal-Wallis entre os grupos tratados

c) Ki67

Na figura 24 A (controle) e B (tratado), é possível observar a expressão do antígeno Ki67. Neste estudo não foi possível detectar diferenças entre o tratamento com grandisina e as células não tratadas.

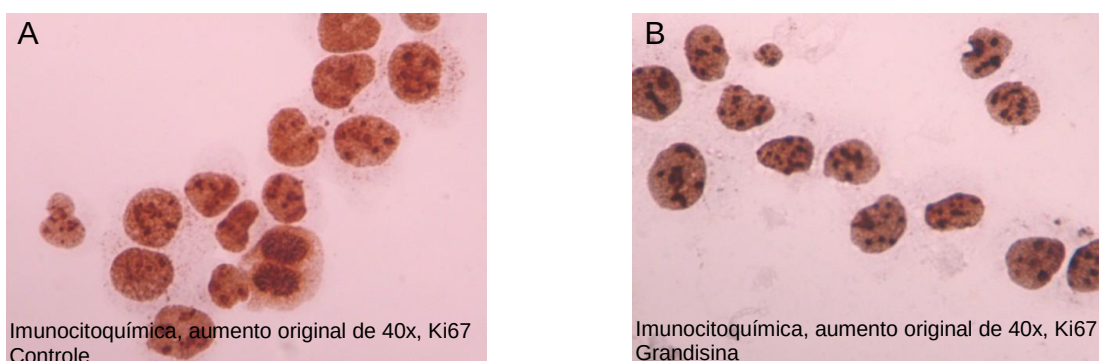


Figura 24 - A e B- Indução de apoptose em células K-562 (1×10^4 células) controle e tratadas com grandisina 0,036 μ Mol por 24h.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos testemunhamos grandes avanços científicos em todas as áreas do conhecimento impulsionados pelo desenvolvimento de um vasto leque de metodologias, em particular, aplicadas na biologia celular. O conjunto de conhecimento gerado permitiu, dentre outras conquistas, a elucidação cada vez mais detalhada dos caminhos de transdução de sinal de controle da morte celular e os mecanismos moleculares nucleares responsáveis pela morte celular, arquiteturas celular e tecidual responsáveis pelas funções biológicas, gerando novas possibilidades de modulação farmacológica e, conseqüentemente, o desenho de novos candidatos a fármacos. Conforme mencionado anteriormente, está bem estabelecido na literatura que a célula tumoral apresenta um funcionamento anormal responsável pelo descontrole celular e progressão da doença. Potenciais fármacos antineoplásicos deveriam subverter o crescimento desregulado das células tumorais induzindo ao processo de morte. Cabe aqui enfatizar que historicamente os produtos naturais têm demonstrado ser importantes fontes de novas moléculas de partida para a pesquisa, desenvolvimento e inovação em fármacos e medicamentos quimioterápicos (QUEIROZ et. al., 2009). Ao título de ilustração destacamos a vincristina, vimblastina, taxol, etoposídeo e teniposídeo, todos de origem de plantas, atualmente utilizadas na clínica médica para o tratamento de uma gama de cânceres.

Aliado ao grande número de potenciais moléculas de origem natural encontradas na diversidade brasileira, a utilização de modelos experimentais baseados em cultura de células tumorais possibilita reproduzir condições semelhantes às ocorridas no organismo permitindo analisar e quantificar alterações sofridas pelas células frente à exposição de determinada molécula (HELLMANN-BLUMBERG et al., 2000; PHILIP, 2005).

De um modo geral a maioria dos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer, induzem alterações que culminam em citotoxicidade. Segundo Nardone (1977), citotoxicidade pode ser definida como um conjunto de alterações da homeostase celular, levando em conta uma série de modificações, que interagem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua

reprodução e sobrevivência. Estes testes *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade seletiva de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002), uma vez que o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de uma substância é requisito importante, para verificar sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000).

Os ensaios de citotoxicidade frequentemente utilizados baseiam-se na alteração de membrana e permeabilidade celular, nas funções mitocondriais e nas alterações da morfologia e da proliferação celular. (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; EISENBRAND et al., 2002).

Uma técnica amplamente empregada para avaliar a viabilidade celular é o método de exclusão do corante azul de tripano, o qual permite determinar a integridade das membranas (WILSON, 2000). Esse corante penetra em células mortas cujas membranas rompidas permitem a entrada. Nas células viáveis o corante não é excluído. A contagem das células viáveis é comparada com percentual do controle e fornece um índice de citotoxicidade da molécula teste (BARILE, 1994). Neste contexto, utilizamos este método como ponto de partida para investigar a atividade citotóxica da grandisina, após 24 horas de tratamento, sobre células k-562, em comparação com linfócitos de sangue periférico. Os dados obtidos demonstram que a grandisina apresentou citotoxicidade sobre células leucêmicas com $IC_{50 \text{ K562}} = 1,075 \mu\text{Mol}$. A comparação com os linfócitos, $IC_{50 \text{ linfócito}} = 0,375 \mu\text{Mol}$, demonstrou que estas células foram mais sensíveis a ação da grandisina nas primeiras 24 horas. Já a avaliação após 48 horas de tratamento, observamos maior citotoxicidade para as células K-562, quando comparado aos ($IC_{50 \text{ K562}} = 0,198 \mu\text{Mol}$ e $IC_{50 \text{ linfócitos}} = 0,200 \mu\text{Mol}$). Estes achados podem estar relacionados às características de resistência a fármacos apresentadas por esta linhagem.

Com o intuito de confirmar os dados acima, o potencial citotóxico da grandisina foi avaliado empregando o método MTT (TRUTER; SANTOS; ELS, 2001). Este protocolo indica a atividade metabólica celular. A redução do sal de MTT a cristais de formazan pela enzima succinato-desidrogenase resulta em cristais azuis insolúveis e a intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (SCUDIERO,

SHOEMAKER and PAULL, 1988). Neste teste a redução do MTT, semelhante aos resultados encontrados no ensaio anterior, no intervalo de 24 horas, obtivemos $IC_{50} \text{ linfócitos} = 0,425 \mu\text{Mol}$ e $IC_{50} \text{ k562} = 11,980 \mu\text{Mol}$. Quando as mesmas linhagens foram tratadas por 48 horas os valores foram os seguintes, $IC_{50} \text{ linfócitos} = 0,851 \mu\text{Mol}$ e $IC_{50} \text{ k562} = 0,685 \mu\text{Mol}$. Foi possível confirmar que nas primeiras horas a grandisina apresenta atividade mais acentuada sobre linfócitos, e com o decorrer do tempo, o candidato a fármaco torna-se mais citotóxico às células k-562. Tais resultados demonstraram efeito citotóxico concentração-dependente e tempo-dependente, nos intervalos investigados. Embora a grandisina tenha se mostrado citotóxica as células K562, ela causou efeito aos linfócitos normais de sangue periférico humano no mesmo intervalo de concentrações testadas. Estes resultados são importantes, pois demonstram que a grandisina embora exerça atividade antileucêmica, também atua de forma semelhante a muitos agentes quimioterápicos, exibindo toxicidade sobre células normais, podendo causar efeitos colaterais indesejáveis e dessa forma limitar sua aplicação no campo clínico (CRAGG et al., 2006). Entretanto outros testes são necessários para avaliar o efeito antiproliferativo da grandisina e melhor caracterizar o seu potencial de aplicação na terapêutica do cancer.

As células em proliferação passam por quatro estágios designados G0/G1, S, G2 e M, onde o DNA é replicado e dividido. Células com conteúdo diplóide de DNA são consideradas na fase G0/G1. Na fase G0 estão em repouso, mas após um estímulo a célula entra em um período proliferativo (G1). Durante a fase S ou de síntese, as células aumentam o seu conteúdo de DNA progressivamente até atingir um estado tetraplóide com o dobro do conteúdo (G2). Na fase M, a célula se divide gerando duas células diplóides, voltando após à fase G0, onde subsequente síntese de DNA não ocorre até que haja um novo estímulo para divisão celular e a célula retorne à fase G1, onde a síntese ativa de DNA recomeça (BOTH et. al., 2000). Em nosso trabalho verificamos que após o tratamento das células leucêmicas com a grandisina houve um aumento de 47% da população de células em fase G1. Por outro lado, verificamos uma diminuição de 20% e 2%, da população de células em fase G2 e S, respectivamente, indicando que a grandisina induziu a parada do ciclo celular em fase G1 o que condiz com grande parte dos quimioterápicos existentes.

Uma vez detectada a capacidade da grandisina de induzir citotoxicidade e aumento de G1, analisamos as mudanças morfológicas das células K-562 após o tratamento com a grandisina. Foi detectado que um maior número de células com características como: marginalização ou condensação da cromatina, fragmentação celular ou nuclear, estruturas celulares fragmentadas dentro de vesículas (corpos apoptóticos), as quais são indicativas de morte por processo apoptótico. Assim, o próximo passo foi verificar alguns são os mecanismos envolvidos neste processo. A ocorrência da morte celular recente pode ser detectada pela capacidade da molécula teste em modular a anexina V, a qual tem elevada afinidade pela fosfatidilserina presente na porção interna da membrana citoplasmática de células íntegras. A externalização da fosfatidilserina ocorre nos estágios precoces de apoptose, permitindo identificar o fenômeno da apoptose de forma precoce se comparado aos ensaios baseados em alterações nucleares, como a fragmentação do DNA (KOOPMAN et al., 1994; VERMES et al., 1995). Assim, a investigação da capacidade de modulação da anexina V precede a perda da integridade da membrana que acompanha os estágios mais precoces de morte celular, resultando em apoptose e/ou necrose.

A exposição das células K-562 a grandisina confirmou que esta molécula induz morte celular, de forma concentração–dependente. Na maior concentração estudada o índice de apoptose tardia foi maior, nas demais concentrações a apoptose inicial prevaleceu. Logo se conclui que o mecanismo efetor da morte celular em células k562 após tratamento com grandisina envolve mecanismos apoptóticos.

Conforme descrito anteriormente, a apoptose é um processo muito bem controlado e programado que pode ser induzido em condições fisiológicas ou patofisiológicas, e é caracterizado por fenômenos específicos como, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e morte celular (SQUIER; SEHNERT; COHEN, 1995; HAIDARA et al., 2002). Cabe aqui destacar que o conjunto de dados obtidos neste estudo relativos às alterações nas células tratadas com grandisina indicou apoptose e o índice de apoptose foi maior nas células tratadas, em comparação as células não-tratadas. Em contrapartida a necrose trata-se de um evento accidental, com resultados de lesões, incluindo anóxia, hipóxia,

isquemia, exposição a metabólitos tóxicos, trauma direto na célula e ou desintegração da membrana (KROEMER et al., 1997).

Um indutor de apoptose celular, geralmente, envolve a participação de enzimas metabólicas do DNA, entretanto este fenômeno não está claramente estabelecido. Independentemente disto, a abordagem molecular pode ser utilizada como ferramenta na inibição do crescimento tumoral, seja como agente antitumoral ou como adjuvante da terapia antitumoral (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009). Dados na literatura sugerem que a apoptose é regida por uma família de cisteína proteases chamadas caspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam (e assim ativam) outras procaspases, resultando na amplificação da cascata proteolítica. Esse mecanismo além de destrutivo e autopropagado é também irreversível (ALBERTS et al., 2002)

No intuito de elucidar a via pela qual a grandisina promove a apoptose, foi realizado o teste que permite detectar a ativação das caspases -6, -8 e -9, determinação do Bcl-2 e Bax. Quando examinados esses efeitos sobre as células K-562 após 24 horas de tratamento foi possível detectar a modulação da atividade das caspases 6, 8 e 9 pela grandisina. Ocorreu um aumento da ativação de 21,4%, 29,6% e 37,5% para as caspases -6 -8 e -9, respectivamente, após o tratamento com a grandisina. Estas caspases ativadas são as principais enzimas envolvidas na ativação da via intrínseca. Como já comentado a caspase 8 é capaz de ativar proteínas pró-apoptóticas que promovem a formação de poros na membrana externa mitocondrial, esse fenômeno é denominado *de permeabilização da membrana externa mitocondrial (Mitochondrial-outer-membrane permeabilization)*. Esse processo ativa a liberação do citocromo c no citoplasma, o qual associado ao fator 1 de ativação de protease apoptótica (*apoptotic protease-activating factor 1*, APAF1) e à procaspase-9, forma o chamado apoptossomo. Na presença de ATP, a procaspase-9 é ativada, levando a liberação em cadeia de caspases executoras tais como -3,-6 e 7 (AMARANTE-MENDES e GREEN, 1999).

Dentre as proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases, a família Bcl-2 é um dos mais importantes grupos (DESAGHER e MARTINOU, 2000). Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-xs, BAD, BID, BIK, HRK,

BIM e BOK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1). O equilíbrio relativo entre as diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (ZÖRNIG, 2001). Ainda verificando o mecanismo de apoptose da grandisina, os resultados evidenciam redução da expressão de Bcl-2 e, de forma surpreendente, Bax, quando comparados ao controle. Quando os níveis de Bcl-2 estão reduzidos, pode-se inferir que o mecanismo pelo qual a células leucêmicas têm para continuarem vivas está sendo revertido, ou seja, estão em processo de apoptose. A inibição da apoptose pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, mas o mecanismo pelo qual o Bcl-2 inibe a apoptose ainda não está bem esclarecido. Sabe-se que na superexpressão de Bcl-2, a habilidade de remover danos celulares por apoptose é limitada. Dessa forma os tumores conseguem progredir para fenótipos altamente malignos ou também resistentes a agentes quimioterápicos indutores de apoptose (STADELMANN, 1998). Roy et al (2000) demonstraram que a Bcl-2 retarda a indução de apoptose pelo lauril galato nas células Wehi e Calcabrini et al (2006) encontraram efeito semelhante em células de linhagem de câncer de mama humana MCF-7. O que se observa é quando tratadas com grandisina as células K562 reduziu a elevada expressão de Bcl-2, sugerindo que as células K-562 não apresentaram resistência a este candidato fármaco. Assim, estes resultados sugerem que a apoptose, promovida pela grandisina, passa pela modulação de membros da família de Bcl-2.

Já a avaliação da expressão da proteína Bax, os resultados mostram uma redução em sua expressão. O Bax é bastante expresso em vários tecidos, incluindo alguns cujas células podem morrer durante o processo de maturação do órgão (KRAJEWSKI et al., 1996). Alguns estudos mostram que quando Bcl-2 está superexpresso há dimerização com Bax e a morte celular é suprimida. Entretanto, a superexpressão de Bax acelera o processo de apoptose, pois quando expresso facilita a liberação do citocromo c com ativação das caspases efetoras da apoptose (PASTORINO et al., 1998), caso não observado no nosso trabalho. Uma vez que observamos redução da expressão de ambas às proteínas, Bax e Bcl-2, após o tratamento com a grandisina é possível que esta molécula interfira no equilíbrio entre inibição de morte e promoção de morte, em favor do aumento

de morte das células K562. Logo o mecanismo apoptótico exercido frente às células K-562 após tratamento com a grandisina não envolve o aumento da expressão de Bax, mas favorece o equilíbrio entre Bcl-2 e Bax (KRAJEWSKA et al., 1996).

Outro marcador utilizado para verificar a apoptose empregado no presente trabalho foi o Ki67, uma proteína não-histona que não é expressa em células na fase G₀, mas que pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G₁, S G₂ e mitose). Inúmeros estudos tentam mostrar a relação entre o número de células Ki67 positivo e bom ou mau prognóstico em relação ao câncer (FITZGIBBONS et al., 2000). Zucarri (2001) aponta o Ki67 como um excelente marcador de proliferação celular no diagnóstico e prognóstico de carcinomas mamários e para detectar sua malignidade. Verificou-se que o ki67 está associado com a proliferação celular, estando à fração de células tumorais positivas ao Ki67 correlacionadas com a evolução clínica da doença. Nos ensaios realizados não detectamos a modulação do Ki67 pela grandisina.

Finalmente, este estudo introduz um novo agente capaz de induzir apoptose em uma linhagem celular leucêmica com importantes características de resistência ao processo de morte celular programada. Entretanto, é importante que novos estudos sejam conduzidos, para assegurar a eficácia e segurança desta nova substância, bem como elucidar de forma mais clara o mecanismo pelo qual se dá a apoptose das células K562 quanto tratadas com esse agente. Além disso, outros testes com células normais devem ser realizados com o objetivo de averiguar se a grandisina apresenta seletividade para células transformadas, característica esta extremamente desejada nos tratamentos anticancerígenos.

7 CONCLUSÃO

A grandisina apresentou citotoxicidade para células leucêmicas e normais, concentração-dependente e tempo-dependente, nos intervalos investigados. Após 48 horas, a citotoxicidade para as células normais se manteve e observamos aumento para as células leucêmicas

A investigação da morfologia destas células indicou morte celular com sinais de apoptose.

O tratamento das células leucêmicas com grandisina por 24 horas promoveu a externalização da anexina V, um indicador primário de apoptose.

A verificação dos mecanismos de morte celular demonstrou que o tratamento das células k-562 com grandisina por 24 horas induz ao aumento da população de células em fase G1 do ciclo celular e uma diminuição da população de células em fase G2 e S, respectivamente, indicando que a grandisina induziu parada do ciclo celular em fase G1.

Nestas células, a investigação da atividade das caspases 6, 8 e 9 e dos mediadores do processo de morte celular Bcl2 e Bax demonstrou que a morte celular ocorre via caspase-dependente e com modulação positiva de Bcl2 e Bax.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL- RUBEAI, M. Apoptosis and cell culture technology. In: SCHEPER, T. (Ed). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlim: Springer, v.59, p.225-249, 1998.

AGAREZ, P.; RIZZINI. **Botânica Angiospermae**, 2.ed. Rio de Janeiro. Âmbito Cultural, p.11-71, 1994.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.

AMARANTE -MENDES, G.P.; GREEN,D.R. The regulation of apoptotic cell death. **British Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.32, n.9, p.1053-1061, 1999.

AYRES, D.C.; LOIKE, J.D. Lignans Chemical Biological and Clinical Properties. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1990.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.51, p.899-902, 1999.

BARATA, L.E.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A., CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v.55, p.589-95, 2000.

BARILE, F. A. ***In vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods**. Florida: CRC, p.222, 1994.

BARNARD, N.J.; HALL, P.A.; LEMOINE, N.R.; KADAR, N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. **Journal of Pathology**, v.152, p.287-295, 1987.

BEDOWS, E.; HATFIELD, G.M. An investigation of the antiviral activity of *Podophyllum peltatum*. **Journal of Natural Products**, v.45, p.725-729, 1982.

BERNARDES, L. S. C.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.7075–7082, 2006.

BOHATCH JUNIOR, M.S.; SILVA, R.Z.; ESMERINO, L.A.; VOLPATO, A.M.M. **Estudos preliminares do tratamento de infecção urinária utilizando extratos vegetais de *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense***. Comunicação oral. VII Encontro de Pós - graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (VII EPUEPG), 2007.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay. **Journal of Tissue Culture Methods**, v.9,p.7-9, 1984.

BOTH, C. T.; MATTOS, A. A.; NEUMANN, J.; REIS, M. A citometria de fluxo no diagnóstico da carcinomatose peritonea. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v.44 (3,4): p.115-119, jul.-dez. 2000.

BOURDON, J.C.; FERNANDES, K.; MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LIU, G.; DIOT, A.; XIRODIMAS, D.P., *et al.* p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Development**, v.19(18), p.2122-2137, 2005.

BOURDON, J.C. p53 and its isoforms in cancer. **British Journal of Cancer** , v.97(3), p.277-282, 2007.

BRANDÃO, M. G. L. **Plantas medicinais e fitoterapia**. Belo Horizonte: Faculdade de farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, p.113, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo**. Falando sobre câncer e seus fatores de risco. Rio de Janeiro: INCA, 1996b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer: **Estimativas da Incidência e mortalidade por câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer: **O que é câncer**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 Acesso em 10: abr. 2009^a

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. **Câncer no Brasil**: dados dos registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro: INCA, 1996a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. **Estimativas 2008**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2008.

BRAZ, M.M. **Aprendendo com o câncer de mama**: percepções e emoções de pacientes e profissionais de fisioterapia. 2001. 101f. Dissertação (Mestrado em engenharia de produção de Sistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BREMER, K.; BREMER, B.; THULIN, M. Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plants, **Uppsala: Uppsala Universitet**, p.102, 1996.

BRESOLIN, T. M.; FILHO, V. C. **Ciências Farmacêuticas - Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. ed. UNIVALE, Santa Catarina, p.239,2003.

BROSSART, P.; SCHMIER, J.W.; KRUGGER, S.; WILLHAUCK, M.; SCHEIBENBOGEN, C.; MOHLER, T., *et al.* A polymerase chain reaction-based semiquantitative assesment of malignant melanoma cell in peripheral blood. **Cancer Research**,v.15-55, p.4065-4068, 1995.

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki67: Its use in histopathology. Invited review. **Histopathology**, v.17, p.489-503, 1990.

CALCABRINI, A.; GARCIA-MARTINEZ, J.M.; GONZALEZ, L.; TENDERO, M. J.; ORTUNO, M. T.; CRATERI, P., *et al.* Inhibition of proliferation an induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauril gallate. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p.1699-1712, 2006.

CABRAL, M.M.O.; ALENCAR, J.A.; GUIMARÃES, A.E.; KATO, M.J. 2008. Larvicidal activity of grandisin from Piper solmsianum C.DC against Aedes aegypti L., 1762 (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. (no prelo)

CAMPOS, M. P.; CECHINEL FILHO, V.; SILVA, R.Z.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A. B. Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extrated from Piper solmsianum C. DC. Var. solmsianum (Piperaceae). Zeitschrift fur Naturforschung - **A Journal of Biosciences**, v.62c, p.173-178, 2007.

CARROLL, A.R.; ARUMUGAN, G.; QUINN, R.J.; REDBURN, J.; GUYMER, G. Grandisine A and B, Novel Indolizidine Alkaloids with Human Opiod Receptor Binding Affinity from the Leaves of the Australian Rainforest Tree Elaeocarpus grandis.**Journal of Organic Chemistry**, v.70, p.1889-1892, 2005.

CARSON, D.; RIBEIRO, J. Apoptosis and disease. **Lancet**, v.341, p.1251-1254, 1993.

CARVALHO, A. A. V.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; KATO, M. J.; VALADARES, M. C.; CUNHA L. C.; COSTA, E. A. Anticonociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, (2009) Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 0.1002/ptr.2882

CASTRO, M.A.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; GORDALIZA, M.; GARCIA, P.A.; GOMEZ-ZURITA, M.A.; GARCIA-GRAVALOS, M.D.; DE LA IGLESIA-VICENTE, J.; GAJATE, C.; AN, F.; MOLLINEDO, F.; SAN FELICIANO, A. Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin **Journal of Medicinal Chemistry**, v.26, p.1214-1222, 2004.

CHEN, Q.; CROSBY, M.; ALMASAN, A. Redox Regulation of Apoptosis Before and After Cytochrome C Release. **Korean Journal Biology Science.**, v. 7, n. 1, p.1-9, 2003.

COIT, D.G. Patient surveillance and follow-up. In: Balch C.M., Houghton A.N., Sober A.J., Soong S.J. **Cutaneous Melanoma**. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc., p.313-21, 1998.

COLLIN, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v.34, p.119-134, 2001.

CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic Myelogenous leukemia: a review. **American Journal of Medicine**, v.100, p.555-557, 1996.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural products extracts of plants and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of natural products**. v.69, n.3, p.488-498, 2006.

DA SILVA, G. C.; PILGER, D. A.; DE CASTRO, S. M.; WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, p. 77-84, 2006.

DAGHASTANLI, N.A.; ROSSA, M.M.; SELISTRE-DE-ARAJÓ, H.S.; TEDESCO, A.C.; BORISSEVITCH, I.U.; DEGTEREV, I.A. Cytotoxicity of the nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitacrine, towards leukaemics and normal cells on the dark and under illumination with visible light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 75, p. 27 - 32, 2004.

DALEY, G.Q.; VAN ETEN, R.A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 gene of Philadelphia chromosome. **Science**, v.247, p.824-830, 1990.

DANELUTTE, A.P.; LAGO, J.H.G.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, v.64, p.555-559, 2003.

DE CANDOLLE, A.L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.69, p.1-39, 2000.

DE MEJIA, E.G.; BRADFORD, T.; HASLER, C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. **Nutrition Reviews**, v.61(7), p.239-246, 2003.

DEGTEREV, I.A.; BUZOKOV, A.A.; SHARF, V.G.; POPOV, K.N.; SEREBRIANIY, A.M.; ZAIKOV, G.E. Comparative study of in vitro ledakrine metabolism in microsomes of EAC-cells and mouse liver. **Pharmaceutical Chemistry Journal** v. 20, p.412-417, 1991.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N. The tyrosine kinase inhibitor CGP571148B selectively inhibitor the grow of BCR-ABL positive cells. **Blood**, v.90, p.3691-3698, 1997.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methods**, v.89, p.271-277, 1986.

DEREMER, et. al, Nilotinib: A Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia: **Clinical Therapeutics**,v. 30, n.11, 2008

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 369-77, 2000.

DESBÈNE, S.; RENAULT, S.G. Drugs that inhibit tubulin polymerization: the particular case of podophyllotoxin and analogues. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v.2, p.71-90, 2002.

DIAZ, P.P.; RAMOS, B.C.; MATTA, G.E. New C6-C3 and C6-C1 compounds from *Piper lenticelloseum*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.690-691, 1986.

DREIZEN, S.; KENNETH, B.M.; KEATING, M.J. Chemotherapy-induced oral mucositis in adult leukemia. **Postgraduate Medicine**, v.69, p.103-112, 1981.

DRUKER, B.J., Signal transduction inhibitor: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. **Seminars in Hemaology**, v.38, p.9-14, 2001.

DRUKER, B.J.; SWYERS, C.L.; KANTARJIAN, H.M. Activity of specifit of inhibit of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crises of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. **New England Journal of Medicine**, v.344, p.1038-1042, 2001a.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E. Effects of selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on grow of BCR-ABL positives cells. **Nature Medicine**, p.561-66, 1996.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H.; MAMMALIAN Caspases: structure, activation, substrates And functions during apoptosis. **Annual Reviews of Biochemistry**. v. 68, p. 383-424, 1999.

EGUCHI, Y.; EWERT D.; TSUJIMOTO, Y. Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neural organs in adult and embryo. **Nucl Acids Reseach**, v.20, p.4187-4192, 1992.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H.M. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. **Annals of Internal Medicine**, v.131, p.207-219, 1999.

FARKYA, S.; BISARIA, V.S.; SRIVASTAVA, A.K. Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. **Applied microbiology and biotechnology**, 5.ed.,v.65, p.504-19, 2004.

FERNANDES JÚNIOR, H.J. Introdução ao estudo das neoplasias. In: Baracat, F.F., Fernandes Júnior, H.J., Silva, M.J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Roca, cap.1, p.3-10, 2000.

FIGUEIREDO, R.C.; GREGÓRIO, Z.M.O.; ALBUQUERQUE, S.; SOUZA, A. M. Effects of grandisin on hematopoiesis in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, p.85, 2005.

FISHER, D.E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.15(5), p.931-56, 2001.

FITZGIBBONS, *et al.* Prognostic factors in breast câncer. College of American Pathologist Consensus Statement. **Archives of Pathology e Laboratory Medicine**, v. 124, p.966-978, 2000.

FRANKO, A.J. Misonidazole and others hypoxia markers: metabolism and applications. **International Journal of Radiation Oncology *Biology* Physics**, v. 12, p. 1195-1202, 1986.

GAMBACORTI-PASSERINI, I.C.; LE COUTRE, P.; MOLOGNI L. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL + leukemia cells and induces apoptosis. **Blood Cells Molecular Disease**, v.23, p.380-394, 1997.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H.H.; SCHAWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation- associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. **Journal of Immunology**, v.133, p.1710-1715, 1984.

GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H ET AL. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v.31, p.13-20, 1983.

GIROD SC, PFEIFFER P, RIES J ET AL. Proliferative activity and loss of function of tumor suppressor genes as “biomarkers” in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.36, p.252-260, 1998.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. **Experimental Hematology**, v.32, p.2-10, 2004.

GORDALIZA, M.; CASTRO, M.A.; DEL CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.S. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, p.1811-1839, 2000.

GORDALIZA, M.; GARCIA, P.A.; DEL CORRAL, J.M.; CASTRO, M.A.; GOMEZ-ZURITA, M.A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**, v.15, p.441-459, 2004.

GORDALIZA, M.; MIGUEL DEL CORRAL, J.M.; ANGELES CASTRO, M.; GARCIA-GARCIA, P.A.; SAN FELICIANO A. Cytotoxic cyclolignans related to podophyllotoxin. **Fármaco**, 56, 297-304, 2001.

GORDON, M.Y.; DAZZI, F.; MARLEY, S.B. Cell biology of CML cells. **Leukemia**, v.13 (sup 1), p.S65-S71, 1999.

GRIFFITHS, *et al.* **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.420-440, 2001.

GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. Bcl2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v.13, p.1899-1911, 1999.

GUSTAFSSON, A.B.; GOTTLIEB, R.A. Bcl 2 family members and apoptosis, taken to heart. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v.292, n.1, p.C45-C51, Jan.2007.

HAIDARA, K.; MOREL, I.; ABALÉA, V.; BARRÉ, M. G.; DENIZEAU, F. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmatic reticulum. **Biochimic et Biophysic Acta**, v.14829, p.1-13, 2002.

HARA, H.; FUJIIHASHI, T.; SAKATA, T.; KAJI, A.; KAJI, H. Tetrahydronaphthalene lignan compounds as potent anti-HIV type 1 agents. **Aids Research and Human Retroviruses**, v.13, p.695-705, 1997.

HARTMANN, J.T.; LIPP, H.P. Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. **Drug Saf**, v.29, p.209-30, 2006.

HAY, M.P.; LEE, H.H.; WILSON, W.R.; ROBERTS, P.B.; DENNY, W.A. Hypoxia-selective antitumor agents, bis(nitroimidazoles) and related bis(nitroheterocycles): development of derivatives with higher rates of metabolic activation under hypoxia and improved aqueous solubility. **Medical Chemistry**, v. 38, p.1928-1941, 1995.

HELLMANN-BLUMBERG, U.T.L.; TARAS, G.T.; WURZ, M.W. DeGregorio. Genotoxic effects of the novel mixed antiestrogen FC-1271a in comparison to tamoxifen and toremifene. **Breast Cancer Research Treatment**, v.60, p.63-70, 2000.

HEINRICH, M.; BREMNER, P. Ethnobotany and ethnopharmacy--their role for anti-cancer drug development. **Current Drug Targets**, v.7, p.239-245, 2006.

HIBI, K.; TRINK, B.; PATTURAJAN, M.; WESTRA, W.H.; CABALLERO, O.L.; HILL, D.E.; *et al.* AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.97(10), p.5462-5467, 2000.

HUANG, J.L.; HE, Y.Y.; CHIGNELL, C.F. Cleavage of epidermal growth factor receptor by caspase during apoptosis is independent of its internalization. **Oncogene**, 10.ed., v.25, p.1521-31, 2006.

HUPP, T.R., LANE, D.P., BALL, K.L. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. **Biochemical Journal**, 352 Pt 1, p.1-17, 2000.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, p.706–716, 2001.

JOLY, A.B. **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p.777, 1975.

KANTARJIAN, H.M. *et al.* Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, p.97, v.2225-2228, 2003.

KASTAN, M.B.; ZHAN, Q.; EL-DEIRY, W.S.; CARRIER, F.; JACKS, T.; WALSH, W.V.; *et al.* A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell**, v.71(4), p.587-597, 1992.

KAUFMANN, S.H.; HENGARTNER, M.O. **Programmed cell death**: alive and well in the new Millennium. *Trends in cell biology*, 12.ed., v.11, p.526-534, 2001.

KOOPMAN, G.C.P.; REUTELINGSPERGER, G.A.; KUIJTEN, R.M.; KEEHNEN, S.T.; PALS, M.H.; VAN OERS. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v.84, p.1415-1420, 1994.

KORSMAYER, S. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. **Cancer Surveys**, v.15: p.105-118, 1992.

KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKA, S.; EPSTEIN, J.I.; SHABAIK, A.; SAUVAGEOT, J.; SONG, K.; KITADA, S.; REED, J.C. Immunohistochemical analysis of BCL-2, BAX, BCL-X and MCL-1 expression in prostate cancers. **American Journal of Pathology**, v. 148, p.1567-1576, 1996.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **New England Journal of Medicine**, v.6, p.614, 1997.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.C.C.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1783-1788, 2004.

LANE, D.P.; CRAWFORD, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v.278(5701), p.261-263, 1979.

LEANDER, K.; ROSEN, B. Medicinal used for podophyllotoxin. **US patent** 4.788.216, 1988.

LEBRUN, D. *et al.* Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. **American Journal of Pathology**, v.142, p.743-753, 1993.

LEE, C.T.L.; LIN, V.C.K.; ZHANG, S.X.; ZHU, X.K.; VLIET, D.V.; HU, H.; BEERS, S.A.; WANG, Z.Q.; COSENTINO, L.M.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. Anti-HIV activity of modified podophyllotoxin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.7, p.2897-2902, 1997.

LERNDAL, T.; SVENSSON, B. A clinical study of CPH 82 vs methotrexate in early rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v.39, p.316-320, 2000.

LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams Hematology**. 7^o Edition. USA: McGraw- Hill Medical, 2006.

LIM, Y. P. Mining the tumor phosphoproteome for câncer markers. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.9, p. 3163-3169, 2005.

LIU, K.C.S.C.; LEE, S.S.; LIN, M.T.; CHANG, C.W.; LIU, C.L.; LIN, J.Y.; HSU, F.L.; REN, S.; LIEN, E.J. Lignans and tannins as inhibitors of viral reverse transcriptase and human DNA polymerase- α : QSAR analysis and molecular modeling. **Medicinal Chemistry Research**, v.7, p.168-179, 1997.

LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**, v.36, p.141-145, 2000.

LOPES, N.P.; CHICARO, P.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v.64, p.667-668, 1998.

LOPES, N.P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J. G.S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; MAZIER, C.; JAUEN, M.; SARI M. A.; BUISSON, D. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.5423-5426, 2004.

LOZZIO, C.B.; LOZZIO, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v.45, p.321-334.

MABBERLEY, D.J. **The Plant-book: A Portable Dictionary of the Higher Plants.** Cambridge: Cambridge University Press, p.874,1997.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v.182, p.1545-1556, 1995.

MARTINS, R.C.C.; LAGO, J.H.G.; ALBUQUERQUE S.; KATO, M.J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.64, p.667-670, 2003.

MARTINS, R.C.C.; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.55, p.843-846, 2000.

MCCARTHY, N.J. Why be interested in death. In: JACOBSON. M.D.: MCCARTHY, N.J.(Eds.). **Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death.** Cambridge: Oxford University Press, 2002. Chap.1 (24).

MCKENNA, S.J. Leukemia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.89, p.137-39, 2000.

MOLINARI, A.; OLIVA, A.; REINOSO, P.; DEL CORRAL, J.M.; CASTRO, M.A.; GORDALIZA, M.; GUPTA, M.P.; SOLIS, P.; SAN FELICIANO, A. Cytotoxic-antineoplastic activity of hydroquinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.2, p.177-82, 2002.

MELO, P.S. *et al.* Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v.6, p.331-334, 2000.

MOLL, U.M.; ERSTER, S.; ZAIKA, A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1552(2): p.47-59, 2001.

MORTON, A.J.; GOOLEY, T.; HANSEN, J.A.; APPELBAUM, F.R.; BRUEMMER, B.; BJERKE, J.W.; CLIFT, A.; MARTIN, P.J.; PEDERSDORF, E.W.; SAN DERS, J.E.; STORB, R.; SULLIVAN, K.M.; WOOLFREY, A.; ANASETTI, C. Association between pretransplant interferon-alpha and outcome after unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. **Blood**, v.92, p.394-401, 1998.

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

NARDONE, R.M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, p.471-495, 1977.

NAVARRO, E.; ALONSO, S.J.; ALONSO, P.J.; TRUJILLO, J.; JORGE, E.; PEREZ, C. Pharmacological effects of elenoside, an aryl naphthalene lignan. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.254-258, 2001.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v.132, p.1497, 1960.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome studies human leukemia. **Journal of National Cancer Institute**, v.27, p.1013-1034, 1961.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKTOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOTAB, J. Direct mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim Polon.**, v.52, p.339-352, 2005.

O'DAWER ME, MAURO MJ, KURILIK G, MORI M, BALLEISEN S, OLSON S, MAGENIS E, CAPDEVILLE R, DRUNKER BJ. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. **Blood**, v.100, p.1628-1633, 2002.

OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, p.433-440, 2004.

OLIVEIRA, H.P. **Hematologia Clínica**. 3ª ed. São Paulo: Livraria Atheneu 1990.

OPFERMAN, J.T.; KORSMEYER, S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology**, New York, v.4, n.5, p.410-415, May 2003.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v.46, p.597- 673, 1997.

PASTERNAK, G.; HOCHLAUS, A.; SCHUTHEIS, B. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.124, p.643-60, 1998.

PASTORINO, J.G.; CHEN, S.T.; TAFANI, M.; SNYDER, W.; FARBER, J.L. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.7770, 1998.

PAVLETICH, N.P.; CHAMBERS, K.A.; PABO, C.O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. **Genes Development**, v.7(12B), p.2556-2564, 1993.

PEGGS, K.; MACKINNON, S. Imatinib mesylate-the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.13, p.1048-1050, 2003.

PEREIRA, W.V. Leucemia mielóide Aguda na infância e adolescência. In: Zago M.A, Falcão R.P, Pasquini R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. S.P: Atheneu, p.459-476, 2001.

PHILIP, P.A. Experience with docetaxel in the treatment of gastric cancer. **Seminars in Oncology**, v.32,p.24-38, 2005.

PLASIER, B.; LLOYD, D.R.; PAUL, G.C.; THOMAS, C.R.; AL-RUBEAI, M. Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. **Journal of immunological methods**, 2.ed.,v.229, p.81-95,1999.

POPE, R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, London, v.2, n.7, p.527-535, Jul.2002.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology In Vitro**, v. 16, p. 599-607, 2002.

QI, Y.; LIAO, F.; ZHAO, C.Q.; LIN, Y.; ZUO, M. Cytotoxicity, apoptosis induction, and mitotic arrest by a novel podophyllotoxin glucoside, 4DPG, in tumor cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.26, p.1000-1008, 2005.

QUEIROZ, A. F. S.; SILVA, R. A.; MOURA, R. M.; DREYFUSS, J. L.; PAREDES, E. J.; SOUZA, A. C. S.; TERSARIOL, I. L. S.; SANTOS, E. A.; NADER, H. B.; JUSTO, G. Z.; SALES, M. P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K-562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.63, p.1023–1033, 2009.

RANTAPPA-DAHLQVIST, S.; LANDBERG, G.; ROOS, G.; NORBERG, B. Cell Cycle Effects Of The Anti-Rheumatic Agent Cph82. **British Journal of Rheumatology**, v.33, p.327-331, 1994.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REGULA, K. M.; ENS, K.; KIRSHENBAUM, L. A. Mitochondria-Assisted Cell Suicide: A License to Kill. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**., v.35, p.559-567, 2003.

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

ROBBINS, S.L. *et al.* **Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

ROSSA, M.M.; ROCHA E SILVA, T.A.A.; TERRUGGI, C.H.B.; TEDESCO, A.C.; SELISTRE-DE-ARAJO, H.S.; BORISSEVITCH, I.U.E.; DEGTEREV, I.A. Comparision of the citotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. **Pharmacological Research**, v.48, p.369-375, 2003.

ROW, R. The chemistry of lignans. **Andhra University Press**: Waltair, India, 1978.

ROWLEY, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giesa staining. **Nature**, v.243, p.290-293, 1973.

ROY, G.; LOMBARDIA, M.; PALACIOS, C.; SERRANO, A.; CESPON, C.; ORTEGA, E. *et al.* Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n.2, p.206-214, 2000.

SALEEM, M.; KIM, H.J.; ALI, M.S.; LEE, Y.S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Products Reports**, v.22, p.696-716, 2005.

SAWYERS, C.L. Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.340, p.1330-1340, 1999.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.32(3), p.233-245, 2003.

SCHULER, M.; GREEN, D. R. Mechanism of p53-dependent apoptosis. **Biochemical Society Transactions**, v.29, p.684-688, 2001.

SKULACHEV, V.P. **Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades**. FEBS letters, 3.ed., v.423, p.275-80, 1998.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K.D. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, v.48, p.4827-4833, 1988.

SILVER, R.T. Chronic myeloid leukemia. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v.17, p.1159-1173, 2003.

SIMERLY, C.R. *et al.* Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes. In **Laboratory Guide of the Mammalian Embryo** (David K. Gardner & Michelle Lane, editores). Oxford University Press, p.165-183, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ed, Porto Alegre, Editora da UFRS, 2004.

SINGH, S.S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. **Curr Drug Metab**, v.2, p.165-182, 2006.

SIRVENT, J.J.; FORTUÑO-MAR, A.; OLONA, M.; ORTI, A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. **Histology and Histopathology**, v.16(1), p.99-106, 2001.

SMELTZER, S.C.; BARE, B. G. Doenças crônicas. In: Brunner e Suddarth: **Tratado de enfermagem médico - cirurgia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.251-268, 2002.

SQUIER, M. K.; SEHNERT, A. J.; COHEN, J. J. Apoptosis in leukocytes, Review. **Journal of Leukocyte Biology**, v.57, p.2-10, 1995.

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

STADELMANN, W.K. *et al.* Prognostic Clinical pathologic features. In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; SOBER, A. J. SOONG, S. J. **Cutaneous melanoma**, 3.ed. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc, p.11-35, 1998.

STAFFORD, A. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: Stafford A., Warren G. (eds.), **Plant Cell and Tissue Culture**. Hoboken: John Wiley & Sons Publishers, p.124-162, 1991.

TABAK, D.G. **Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia**. Medicina, Ribeirão Preto, v.33, p.232-240, 2000.

TAMIELTI, B. F. P. **Análise da Atividade Mitocondrial Associado à Morte Celular Após a Terapia Fotodinâmica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

TERESA, D.B.; NETO, C.B.; *et al.* Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. **Acta Histochemica**, v.109, p.377-387, 2007.

TERREAUX, C.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANS, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**, v.49, p.461-464, 1998.

TRUTER, E.J.; SANTOS, A.S.; ELS, W.J. assessment of the antitumour activity of targeted immuno-specific albumin microspheres loaded with cisplatin and 5-fluorouracil: toxicity against a rodent ovarian carcinoma "*in vitro*". **Cell Biology International**, v.25, p.51-59, 2001.

TSIFTSOGLU, A.S.; PAPPAS, I.S.; VIZIRIANAKIS, I.S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacology & Therapeutics**, v.100, p.257-290, 2003.

VECHIA, D. L.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1245-1252, 2009.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of immunological methods**, 1.ed.,v.184, p.39-51, 1995.

VEROVSKIY, V.N.; DEGTEREV, I.A.; SUKHOVA, N.M.; BUZOKOV, A.A.; LEONOVA, E.Y.U.; TATARSKAYA, N.K. Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic and nitroheterocyclic compounds, in vitro and in vivo study. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 24, p.20-24, 1990.

WOOD, P.J.; HORSMAN, M.R.; KHALIL, A.A.; STEIBERG, F.; STREFFER, C.; OVERGAARD, J.; STRATFORD, I.J.; ADAMS, G.E. A comparison of the physiological effects of RSU1069 and RB6145 in the SCCVII murine tumor. **Acta Oncologica**, v.35, p.989-994, 1996.

WYLLIE, A.; KERR, J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v.181-182, p.471-474, 2002.

YAMAMOTO, J.F.; GOODMAN, M.T. Patterns of Leukemia Incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. **Cancer Causes Control**, v.19, p.379-390, 2008.

YEOMAN, M.M.; YEOMAN, C.L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. **New Phytologist**, v.134, p.553-569, 1996.

YOU, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p.1695-1717, 2005.

YOUNG, G.A.R.; HEDLEY, D.W.; RUGG, C.A.; ILAND, H.J. The prognostic significance of proliferative activity in poor histology non-Hodgkin's lymphoma: a flow cytometry study using archival material. **European Journal of Cancer & Clinical Oncology**, v.23, p.1497-1504, 1987.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J.R.W. **Animal Cell Culture**. 3.ed., Oxford: University, p.175-219, 2000.

WOLTMAN, A.M.; FIGTER, J.W.; KAMERLING, S.W.A.; VAN DER KOOJI, S.W.; PAUL, L.C.; DAHA, M.R.; VAN KOOTEN, C. Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. **Blood**, v.98, p.174-180, 2001.

ZACCHINO, S.; RODRIGUES, G.; PEZZENATI, G.; ORELLANA, G. In vitro evaluation of antifungal properties of 8.O.4'-neolignans. **Journal of Natural Products**, v.60, p.659-662, 1997.

ZHANG, H.J.; TAMEZ, P.A.; VU, D.H.; GHEE, T.T.; NGUYEN, V.H.; LE, T.X.; LE, M.H.; NGUYEN, M.C.; DO, T.T.; SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.; PEZZUTO, J.M. Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.772-777, 2001.

ZÖRNIG, M. *et al.* Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1551, p.1-37, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas**. Tese (Doutorado), 96p. - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.