UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALEXANDRE PEREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, DO PERFIL DE MORTE CELULAR *IN VITRO E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO* INDUZIDOS PELA RESINA FLORAL E LÁTEX DOS FRUTOS DE *CLUSIA* SP

Goiânia
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação [X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Alexandre Pereira dos Santos

Título do trabalho: Avaliação do potencial citotóxico, do perfil de morte celular *in vitro* e da atividade antitumoral *in vivo* induzidos pela resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Alexandre Pereira dos Santos

Assinatura do (a) autor (a) [2]

Data: 16 / 02 / 2017

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

[2] A assinatura deve ser escaneada.

ALEXANDRE PEREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, DO PERFIL DE MORTE CELULAR *IN VITRO E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO* INDUZIDOS PELA RESINA FLORAL E LÁTEX DOS FRUTOS DE *Clusia SP*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Drª Marize Campos Valadares
Co-orientador: Profª Drª Alane Pereira Cortez

Goiânia
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pereira dos santos, Alexandre
Avaliação do potencial citotóxico, do perfil de morte celular in vitro e da atividade antitumoral in vivo induzidos pela resina floral e látex dos frutos de Clusia sp [manuscrito] / Alexandre Pereira dos santos. - 2013.
150 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marize Campos Valadares; co-orientador Dr. Alane Pereira Cortez.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2013.
Bibliografia. Anexos.
Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Clusia sp. 2. Apoptose . 3. K562. I. Campos Valadares, Marize , orient. II. Título.

CDU 66.0

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás

Ata da Defesa Tese de Doutorado realizada por **Alexandre Pereira dos Santos**. Aos **09 dias do mês de maio de 2013**, às **8h30**min, reuniu-se na **Faculdade de Medicina/UFG** Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Doutorado intitulada **"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, DO PERFIL DE MORTE CELULAR IN VITRO E DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO INDUZIDOS PELA RESINA FLORAL E LATEX DOS FRUTOS DE CLUSIA SP".** Como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Doutor**, área de concentração: **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profa. Dra. Marize Campos Valadares**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até **50** minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem, sucessivamente aos Examinadores, os quais passaram a argüir o candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a argüição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora	**Aprovado(a)/Reprovado(a)**
Profa. Dra. Marize Campos Valadares – Presidente	Aprovado
Profa. Dra. Eliana Martins Lima – Membro	Aprovado
Profa. Dra. Alane Pereira Cortez – Membro	Aprovado
Profa. Dra. Leonice Manrique Trevenzol– Membro	Aprovado
Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira– Membro	Aprovado
Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto– Suplente	
Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira-Suplente	

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Alexandre Pereira dos Santos**) Habilitado ( ) Não habilitado. Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Marize Campos Valadares**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

Profa. Dra. Marize Campos Valadares – Presidente
Profa. Dra. Eliana Martins Lima – Membro
Profa. Dra. Alane Pereira Cortez – Membro
Profa. Dra. Leonice Manrique Trevenzol– Membro
Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira– Membro
Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto– Suplente
Profa. Dra. Stephania Fleury Taveira-Suplente

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Alexandre Pereira dos Santos
Alexandre Pereira dos Santos

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha Mãe, Celina Santos e finada Avó Maria Gomes, mulheres batalhadoras que me ajudaram e foram o esteio da família durante a minha jornada até aqui. Jamais me esquecerei dos ensinamentos, sacrifícios e renúncias empregadas para que eu conseguisse conquistar o sucesso acadêmico e pessoal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante, iluminando minha vida, orientando meus caminhos e me dando sabedoria e saúde para a realização desse trabalho.

À Professora Dra. Marize Campos Valadares pela orientação, o fácil acesso, amizade e incentivo sempre dispensados. Agradeço a oportunidade, apoio científico, pessoal e paciência durante esse tempo. Espero continuar usufruindo dos seus ensinamentos e amizade.

À Professora Dra. Alane Pereira Cortez, pela co-orientação, ensinamentos, pela ajuda nos experimentos em biologia molecular, descontração e, sobretudo pela amizade desenvolvida e conversas.

À secretaria do programa em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, Fernanda Bellato pelo carinho e preocupação acolhedora.

À secretaria do programa em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, Valdecina Quirino pela atenção e ajuda sempre dispensados.

À Professora Dra. Eliana Martins de Lima pelo acesso às dependências do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e aos cuidados sempre dispensados.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – LFTC/FARMATEC, Faculdade de Farmácia - UFG: Bruna dos Santos Rodrigues, Carla Bastos, Edvande Xavier, Lara Barroso Brito, Larissa Cleres, Marcelo de Sousa Vieira, Mariana Flavia Mota, Paulo Henrique Marcelino de Ávila, Polyana Lopes Benfica, Renato Ávila, Rosineide Ribeiro Sousa Santos, Soraia Moura Santana, Thalyta Freitas Castro.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a Polyana Benfica que além do companheirismo no laboratório se tornou amiga pessoal, Poly obrigado pela companhia nesse vai e vem entre Anápolis e Goiânia, pelos conselhos, por estimar sempre meu bem e sucesso. À Soraia Santana, Marcelo Vieira e Larissa Cleres meus profundos agradecimentos.

Vocês além de fundamentais para a realização deste trabalho, foram importantes para meu crescimento pessoal nesse tempo de parceria.

Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica – FARMATEC, Faculdade de Farmácia - UFG: Profa. Dra. Danielle Diniz, Érica Crispim, Fabrícia Saba Ferreira, Leonardo Gomes Souza, Letícia Nasser, Lívia Palmerston, Marco Júnio Peres Filho, Marilisa Pedroso Nogueira Gaeti, Relton Romeis, Prof. Dr. Ricardo Marreto, Rodrigo Gomes de Alencar, Stela Ramirez Oliveira.

À professora Dra. Aline Carvalho Batista da Faculdade de Odontologia da UFG, pela parceria e por permitir a utilização dos equipamentos para elaboração das microfotografias.

À professora Dra Cecília Maria Alves de Oliveira do Instituto de Química da UFG por ter cedido gentilmente o material vegetal para a realização desse trabalho.

À querida Profa. Dra. Andrezza Furquim da Cruz Pela amizade, ensinamentos e orientações, mesmo que distante em Ribeirão Preto.

Em especial aos meus pais que tornaram viável a realização desse sonho, constantes incentivadores da minha carreira profissional. A minha irmã Sílvia Patrícia e sobrinho Eduardo Daniel que também participaram de todo esse processo, obrigado pelas orações.

Aos amigos pessoais, Eduardo Boselo que mesmo distante lá em Criciúma, tornou-se um dos amigos mais presentes, ouvindo, apoiando, sempre com uma palavra animadora. À Kíria Nery, Luane Silva Nascimento (irmã que a vida me concedeu), Ludmila Tavares, Leonardo Noronha, Mirela Andrade, Slater Palmeira, Fábio Marques, Roberto Faria e Carol Mengai que foram indispensáveis para a realização deste, mesmo estando distante, compreenderam minha ausência e me apoiaram sempre. Em especial ao grande amigo Rafael Alves que participou de forma fundamental na minha vida durante esses 4 anos, ouvindo, apoiando e abrindo as portas de sua casa sem pestanejar para me hospedar, amigo muito obrigado essa conquista também é tua. Ao companheirismo e carinho dispensados por Mario Neves nesses últimos meses, sua presença foi sobremaneira importante para a concretização deste.

À Capes, pela bolsa de doutorado e órgãos financiadores FUNAPE e FINEP.

A todos, meus sinceros sentimentos de gratidão e apreço.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Câncer 1

1.2 Leucemia 2

1.3 Leucemia mielóide crônica 4

1.4 Tratamento da leucemia mielóide crônica 7

1.5 Resistência a múltiplas drogas 11

1.6 Mecanismos de morte celular 12

1.7 Definição de "Apoptose extrínseca 13

1.8 Definição de "Apopotose intrínseca 15

1.9 Produtos naturais e câncer 19

1.10 Anticancerígenos derivados de plantas 20

1.11 Gênero *Clusia* 22

1.12 Fitoquímica do Gênero *Clusia* 25

1.13 Interesse e atividades biológicas de espécies do gênero *Clusia* 27

2 OBJETIVOS 32

2.1 Objetivos Gerais 32

2.2 Objetivos Específicos 32

3 MÉTODOS 33

3.1 Material botânico 33

3.2 Linhagens celulares 33

3.3 Cultura primária de linfócitos 34

3.3.1 Separação dos linfócitos 34

3.4 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de Clusia sp em linfócitos, células k562, HL-60, B16F10, Lucena e PC3 36

3.4.1 Avaliaçâo da citotoxicidade das amostras pelo método de redução do tetrazolium MTT 37

3.5 Avaliação dos mecanismos de morte 38

3.5.1 Avaliação do potencial indutor de apoptose 38

3.5.2 Análise das alterações morfológicas 39

3.5.2.1 Morfologia celular com corante de Giemsa 40
3.5.2.2 Preparo da solução de Giemsa 40
3.5.2.3 Preparo das lâminas para coloração de Giemsa 40
3.5.2.4 Coloração das lâminas com Giemsa 41
3.5.3 Morfologia nuclear com corante de Hoechst 3342 41
3.5.3.1 Preparo da solução de Hoechst 3342 41
3.5.3.2 Coloração das laminas com Hoechst 3342 41
3.5.4 Citometria de fluxo 42
3.5.4.1 Análise da externalização da fosfatidilserina (FS) 42
3.5.4..2 Alteração do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) 43
3.5.4.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 44
3.5.4.4 Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp sobre a progressão do ciclo celular 45
3.5.4.5 Avaliação do potencial indutor de autofagia 45
3.5.4.6 Fragmentação do DNA 46
3.5.4.7 Determinação da ativação das caspases -3,-8-9 47
3.5.4.8 Liberação de citocromo c 47
3.5.4.9 Pesquisa da ativação de Bax e Bcl-2 48
3.6 Análise da sobrevida após inoculação de tumor 49
3.6.1 Animais 49
3.6.2 Aclimatação dos animais 49
3.6.3 Obtenção e preparo das células do Tumor Ascítico de Ehrlich para a realização da curva de sobrevida 49
3.6.4 Tratamento dos animais para a curva de sobrevida 50
3.7 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia* sp em células 3T3 pelo método de captura do vermelho neutro 52
3.7.1 Exposição da resina floral e látex de *Clusia* sp às células 3T3 54
3.7.2 Teste de citotoxicidade baseado na captação do vermelho neutro 55
3.8 Avaliação do potencial hemolítico da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp 56
3.9 Avaliação da mielossupressão em cultura clonal 58
3.9.1 Preparação das células para cultura clonal 58

3.9.2 Preparação do meio-sólido e plaqueamento da cultura clonal

3.9.3 Efeito da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp sobre progenitores hematopoiéticos granulócitos e macrófagos 59

3.10 Análise da expressão gênica de caspase-8 por Reação em Cadeia da Polimerase a partir da transcrição reversa (RTq-PCR) 61

3.10.1 Tratamento 61

3.10.2 Extração do RNA total 61

3.10.3 Quantificação do RNA e avalição da qualidade do RNA 62

3.10.4 Tratamento do RNA total com DNase 63

3.10.5 Transcrição em cDNA 64

3.10.6 Padronização dos genes β-actina e caspase-8 pela técnica de reação de cadeia em tempo real, após transcrição reversa quantitativa (RTq-PCR) 64

3.10.7 PCR em tempo real 65

3.11 Análise estatística 66

4 Resultados e Discussão 68

4.1 Resultado da avaliação da citotoxicidade pela resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia* sp, Imatinibe epaclitaxel em células k562 68

4.2 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia* sp, Imatinibe e Paclitaxel em linfócitos. 71

4.3 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia* sp em células HL-60 73

4.4 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido do fruto de *Clusia* sp em células Lucena, B16F10 e PC3 74

4.5 Análise das alterações morfológicas 77

4.5.1 Morfologia celular com corante Giemsa 77

4.5.2 Verificação das alterações nucleares a partir do emprego do corante Hoechst 344 79

4.6 Avaliação do potencial indutor de apoptose 80

4.6 Avaliação do potencial indutor de apoptose 80

4.6.1 Análise da externalização da fosfatidilserina (FS) 80

4.6.2 Alteração do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) 81

4.6.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) 83

4.6.4 Progressão do ciclo celular 84

4.6.5 Potencial indutor de autofagia 86

4.6.6 Fragmentação do DNA 88

4.6.7 Determinação da ativação das caspases-3, -8, -9 89

4.6.8 Avaliação da liberação de citocromo c 92

4.6.9 ativação de Bcl-2 e Bax 93

4.7 Avaliação da sobreida dos camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp 96

4.8 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia* sp em células 3T3 99

4.9 Avaliação do potencial hemolítico da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp 101

4.10 Avaliação do efeito citotóxico em precursores da medula óssea de camundongos 103

4.11 Avaliação da expressão da caspase-8 por PCR 105

5. Conclusões 107

Referências 108

Anexos 120

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação funcional das vias de morte celular.	18
Tabela 2	Sequência de *primers* utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	67
Tabela 3	Resultados obtidos a partir da citometria de fluxo para o estudo das vias de morte celular	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência de leucemia no mundo por 10.000 habitantes em ambos os sexos e todas e as idades em 2008. Fonte: GLOBOCAN (2008).	2
Figura 2	Representação esquemática dos genes ABL e BCR na t(9;22).	5
Figura 3	Mecanismo de ação do mesilato de Imatinibe.	10
Figura 4	Vias de indução de apoptose. Ativação da via extrínseca mediada por receptor de superfície celular Fas. A cascata de eventos segue ativando caspase 8 e por fim caspase 3 (efetora). Via mitocondrial ativada por outros sistemas a partir da proteína Bid. Agentes externos podem ativar diretamente a via intrínseca de forma independente a Bid	15
Figura 5	Folhas, frutos e flores de *Clusia rosea*	23
Figura 6	Principais benzofenonas isoladas do gênero Clusia, 1. Clusianone, 2. Grandone 3. Nemorosone, 4. Hidroxi-nemorosone, 5. 7-epi nemorosone, 6. Nemorosone II, 7. Xantona.	26
Figura 7	Benzofenonas Polisopreniladas com atividade antiviral frete HIV humano.	28
Figura 8	Esquema da cultura primária de linfócitos	36
Figura 9	Esquema de plaqueamento das células 3T3-A31 para realização do procedimento de citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro	53
Figura 10	Esquema para realização do teste de hemólise	57
Figura 11	Esquema de plaqueamento das células da medula óssea para verificação do efeito da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp sobre os progenitores hematopoiéticos.	60

Figura 12 Efeito citotóxico após tratamento com a resina (A) e látex (B) de Clusia nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sobre a viabilidade das células k562 ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT. 69

Figura 13 Efeito citotóxico frente às células K562 (5x105 células/mL). (A) tratamento em 24 e 48 horas com Imatinibe e (B) tratamento em 24 e 48 horas com Paraxel®. Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT. 69

Figura 14 Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp, Imatinibe e Paraxel®. A. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras testadas no teste de redução do MTT no tempo de 24 horas na linhagem k562 (5x105 células/mL). B. A tabela apresenta os valores de IC50 obtidos a partir da regressão não-linear dos valores percentuais obtidos pelo teste de redução do MTT frente as células K562. *a - P < 0,05 diferença estatística entre a resina floral e as demais amostras testadas, b - não houve diferença estatística entre o látex e o Imatinibe. *c - p < 0,05 diferença estatística entre látex e Paraxel ®. 70

Figura 15 Efeito citotóxico da resina floral (A) e látex do fruto (B) de *Clusia* sp, Imatinibe (C) e Paraxel®(D) em cultura primária de linfócitos. Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT. 71

Figura 16 Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp, Imatinibe e Paraxel®. **A**. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras testadas no teste de MTT no tempo de 24 horas em cultura primária de linfócitos ($5x10^5$ células/mL). B. A tabela mostra os valores de IC50 obtidos a partir da regressão não-linear dos valores percentuais obtidos pelo teste de MTT em linfócitos. a - não houve diferença estatística entre resina floral e látex. *b - houve diferença estatística entre a resina, Imatinibe e Paraxel®. *c - p < 0,05 diferença estatística entre látex, Imatinibe e Paraxel ®. 72

Figura 17	Efeito citotóxico após tratamento com a resina (A) e látex (B) de Clusia nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sobre a viabilidade das células HL-60 ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.	73
Figura 18	Efeito citotóxico após tratamento com a resina e látex de *Clusia* nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24 e 48 sobre a viabilidade das células Lucena (A), B16F10 (B) e PC3 (C) ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.	74
Figura 19	Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp . **A**. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras testadas no teste de MTT no tempo de 24 horas frente as linhagens Lucena, B16F10 e PC3 ($5x10^5$ células/mL). **B**. A tabela mostra os valores de IC50 obtidos a partir da regressão não-linear dos valores percentuais obtidos pelo teste de MTT nas células K562. *a - $p < 0,05$ diferença estatística entre todas linhagens submetidas ao tratamento com as amostras vegetais	75
Figura 20	Alterações morfológicas observadas por meio do corante Giemsa nas células k562 após tratamento com o IC50 das amostras vegetais obtido no teste de redução do MTT. A. Controle, B. Tratamento com a resina floral e C. Tratamento com o látex dos frutos. As setas indicam as alterações morfológicas.	78
Figura 21	Coloração de Hoechst 33342 evidenciando as alterações morfológicas após tratamento das células k562 com a resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A - controle, B – K562 tratada com resina, C – k562 tratada com o látex dos frutos. As setas indicam as alterações.	79
Figura 22	Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp na morte celular de k562 após 24 horas de incubação.	81

Figura 23	Efeito da resina floral e látex de *Clusia* sp no potencial de membrana mitocondrial. A – controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex, D – Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, P < 0,05. *a - diferença estatística entre controle e resina, *b – diferença estatística entre controle e Látex.	82
Figura 24	Produção de ERO após tratamento com a resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A – controle, B- tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, P < 0,05. a - não foi observada diferença estatística entre controle e resina, b – não foi observada diferença estatística entre controle e Látex.	83
Figura 25	A, B e C - Efeitos da resina e látex de *Clusia* na progressão do ciclo celular em células K562 ($1x10^6$ células/mL); D – A tabela apresenta a porcentagem de variação para cada amostra durante as fases do ciclo celular.	85
Figura 26	Efeito indutor de autofagia em células k562 ($1x10^6$ células/mL) após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp.	87
Figura 27	Fragmentação do DNA em células k562 ($1x10^6$ células/mL) após tratamento (24h) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A- controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, p < 0,05. a - diferença estatística entre controle e resina, b – não foi observada diferença estatística entre controle e Látex.	88
Figura 28	Ativação das caspases 3,8 e 9 em células k562 ($1x10^6$ células/mL) após tratamento (24h) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A- controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, P < 0,05. a – não foi observda diferença estatística entre controle, resina e látex , b – não foi observada diferença estatística entre controle, resina e látex, c – para ambos os tratamento é observada diferença estatística com p < 0,05.	90

Figura 29	Liberação de citocromo c após tratamento das células k562 (1x106 células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, $p < 0,05$. *a – foi observada diferença estatística entre controle e resina, b – não foi observada diferença estatística entre controle e látex.	92
Figura 30	Ativação de Bcl-2 após tratamento das células k562 ($1x10^6$ células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex.	94
Figura 31	Ativação de Bax após tratamento das células k562 ($1x10^6$ células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex. Diferença estatística entre os tratamentos e o o controle não foi observada, D – percentual de ativação de Bax.	94
Figura 32	Avaliação do aumento da sobrevida de camundongos Swiss após tratamento com a resina floral. A – curva de Kaplan-Meier, B – Aspecto do abdome dos camundongos após 10 dias de tratamento com a resina floral (125 mg/kg) e látex (250 mg/kg).	98
Figura 33	Efeito citotóxico da resina floral obtida de *Clusia* sp frente a linhagem 3T3.	100
Figura 34	Efeito citotóxico do látex do fruto obtido de *Clusia* sp frente a linhagem 3T3.	100
Figura 35	Esquema de classificação de risco tóxico segundo sistema GSH.	101
Figura 36	Efeito do potencial hemolítico da resina floral e látex de *Clusia* sp.	102
Figura 37	Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia* sp em células progenitoras da medula óssea.	103

Figura 38 Análise da expressão do gene Caspase-8 na linhagem k562 após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene β-actina (controle endógeno) para normalização. 105

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Parecer do Comitê de Ética	120
Anexo 2	Outros anexos específicos de pesquisa	121
Anexo 2.1	Fotografia de eletroforese em gel de agarose. A figura ilustra as bandas 18Se 28S das amostras de RNA obtidas das células K562 tratadas e não tratadas com a resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*, sem indicação de degração ou contaminação por DNA	121
Anexo 2.2	Curva de Calibração, Curva-padrão e melt para o gene ß-actina fornecida pelo aparelho Rotor-Gene G	121
Anexo 2.3	Curva de Calibração, Curva-padrão e melt para o gene Caspase-8 fornecida pelo aparelho Rotor-Gene G	122

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CARD	Recrutamento de caspases
DL50	Dose Letal para 50% da população de animais
DM	Domínio de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fas	receptor de superfície celular
GHS	*Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*
IC50	Concentração inibitória de 50% da população de células
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
ICCVAM	*Interagency Coordenation Commitee on the Validation of Alternative Methods*
LFTC	Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular
MI	Mesilato de Imatinibe
MTT	*(3-(4,5-Dimethtythiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
Ph	Cromossomo Filadélfia
IP	Iodeto de Propídio
SFB	Soro Fetal Bovino
TMO	Transplante de medula óssea
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TRAIL	Fator de necrose tumoral-relacionado de indução a apoptose do ligando

WHO	*World Health Organization*
$\Delta\Psi m$	Potencial de membrana mitocondrial

RESUMO

Por muitos séculos as plantas têm fornecido matéria-prima para a produção de um arsenal de agentes terapêuticos, seja por síntese a partir de metabólitos ou de seu próprio uso. Nesse contexto destaque para espécies da região do Cerrado. Uma nova espécie de *Clusia* ainda não identificada (*Clusia sp*) endêmica nas regiões de Goiânia e Chapada dos Veadeiros tem sido empregada popularmente como agente antirreumático, purgativo, febrífugo, problemas estomacais como descrito para outras espécies do gênero, além de sua aplicação como agente anticancerígeno. O número de estudos confirmando a aplicação dessa espécie para o tratamento do câncer é escasso justificando realização deste trabalho. Para tal, foi avaliado o potencial antileucêmico *in vitro* e antitumoral *in vivo* da resina floral e látex obtidos dos frutos de *Clusia sp*. Investigado e elucidado os possíveis mecanismos de ação destes produtos sobre a morte celular e toxicidade. Realizada uma triagem de citotoxicidade destas amostras sobre células K562, Lucena, HL-60, B16F10, PC3 e linfócitos. Analisada a morfologia celular das células k562 após tratamento com a resina floral e o látex; avaliado o aumento da sobrevida de animais portadores de tumor após tratamento com as amostras vegetais, estimada a toxicidade aguda oral da resina e látex de *Clusia sp* a partir de células do metabolismo basal 3T3, investigado o potencial hemolítico e imunossupressor destas amostras vegetais. Os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados apontam interessante ação citotóxica em células leucêmicas com valores de IC50 nos tempos de 24, 48 e 72 horas para a resina de 62,2; 31,1 e 5,09 µg/mL e para o látex de 37,4; 14,5 e 8,58 µg/mL,

respectivamente. Em comparação com os fármacos empregados na terapêutica, como o Imatinibe não foi observada diferença estatística significativa entre o látex e o mesilato de imatinibe, fármaco empregado como referência no tratamento da leucemia. A partir dos ensaios de morfologia empregando os corantes de Giemsa e Hoechst foi possível observar que ambas as amostras vegetais induziram alterações morfológicas típicas de morte celular como a apoptose. Após o tratamento com a resina (62,2 µg/mL) e látex (37,4 µg/mL) foi observado condensação da cromatina, fragmentação do DNA a partir da formação de corpos apoptóticos, entre outros eventos qcue atestam a morte celular. Na tentativa de elucidar o mecanismo de morte por citometria de fluxo foi observado após tratamento com o a resina e látex, a externalização da fosfatidilserina, indução na formação de espécies reativas de oxigênio, ativação das caspases -3,-8 e -9, redução do potencial da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de Bax, todos esses processos envolvidos na morte celular. Aumento da sobrevida em animais portadores de tumor foi observada nas doses de 125 mg/kg para resina e de 250 mg/kg para o látex, doses superiores foram tóxicas. A partir dos resultados da estimativa da DL50 as amostras vegetais foram classificadas na categoria 3 do sistema GHS. Efeito imunossupressor foi observado para a resina e látex e ação hemolítica moderada foi observada apenas para a resina. Diante do exposto as amostras de resina e látex de *Clusia sp* apresentam interessante perfil para o desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Palavras-Chave: *Clusia* , Resina, Látex, Apoptose, k562.

ABSTRACT

For many centuries the plants are supplied raw material to produce an armory of therapeutic agents, either by synthesis or from metabolites of their own use. In this context especially species of the Cerrado region. A new species of *Clusia* still unidentified (*Clusia sp*) in endemic regions of Goiânia and Chapada dos Veadeiros has been popularly employed as antirheumatic agent, purgative, febrifuge, stomach problems as described for other species of the genus, and its application as anticancer agent . The number of studies confirming the application of this kind for cancer treatment is scarce justifying this work. we evaluated the potential antileucêmico *in vitro* and *in vivo* antitumor floral resin and latex obtained from the fruits of *Clusia sp*. Investigated and elucidated the possible mechanisms of action of these products on cell death and toxicity. Cytotoxicity screening performed on these samples K562, Lucena, HL-60, B16F10, PC3 and lymphocytes. Analyzed cell morphology after treatment of K562 cells with the resin and latex; evaluated the increased survival of animals after treatment with plant samples, estimated acute oral toxicity of resin and latex *Clusia sp* from cells of basal metabolism 3T3, investigated the potential hemolytic and immunosuppressive these vegetables samples. The results obtained from the tests carried out show interesting cytotoxic action in leukemia cells with IC50 values at 24, 48 and 72 hours resin 62,2, 31,1 and 5,09 µg/ml for the latex and 37,4; 14,5, and 8,58 µg/mL, respectively. Compared with the drugs used in therapy, such as Imatinib was not statistically significant difference between latex and imatinib mesylate, a drug used as reference in the treatment of leukemia. From the tests morphology with Giemsa or Hoechst was observed that both samples vegetables induced morphological changes typical of cell death in apoptosis. After treatment with the resin (62,2 µg/mL) and latex (37,4 µg/mL) was observed chromatin condensation, DNA fragmentation from the formation of apoptotic bodies, among other events that attest to cell death. In an attempt to elucidate the mechanism of death by flow cytometry was observed after treatment with the the resin and latex,

externalization of phosphatidylserine, inducing the formation of reactive oxygen species, activation of caspases -3, -8 and -9, reducing mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c, activation of Bax, all these processes involved in cell death. Increased survival in tumor-bearing animals were observed at doses of 125 mg/kg of resin and 250 mg/kg latex, higher doses were toxic. From the results of the estimated DL50 vegetable samples were classified in category 3 of the GHS. Immunosuppressive effect was observed for the resin and latex and moderate hemolytic was observed only for the resin. Given the above samples resin and latex *Clusia sp* exhibit interesting profile for the development of anticancer drugs.

Keywords: *Clusia sp*, Resin, Latex, Apoptosis, k562.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O termo câncer é usado para designar todos os tumores malignos. O termo procedente do latim e significa caranguejo, presumidamente por analogia ao crustáceo o câncer “agarra-se de maneira obstinada a qualquer parte do que se apodera” (COOPER, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; SACOMAN, 2007).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer é o termo designado para tratar de um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, capazes de invadir tecidos e órgãos. A definição bioquímica para esta patologia consiste em perda dos mecanismos reguladores que regem a proliferação, diferenciação e morte celular (COOPER, 2002; SACOMAN, 2007).

Considerado um problema de saúde pública mundial, o câncer tem incidência elevada constituindo-se a segunda causa de morte na população. Estimativas preveem que o número de casos deverá aumentar para 12 milhões até o ano de 2030 (WHO, 2010). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, também válidas para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer (INCA, 2012).

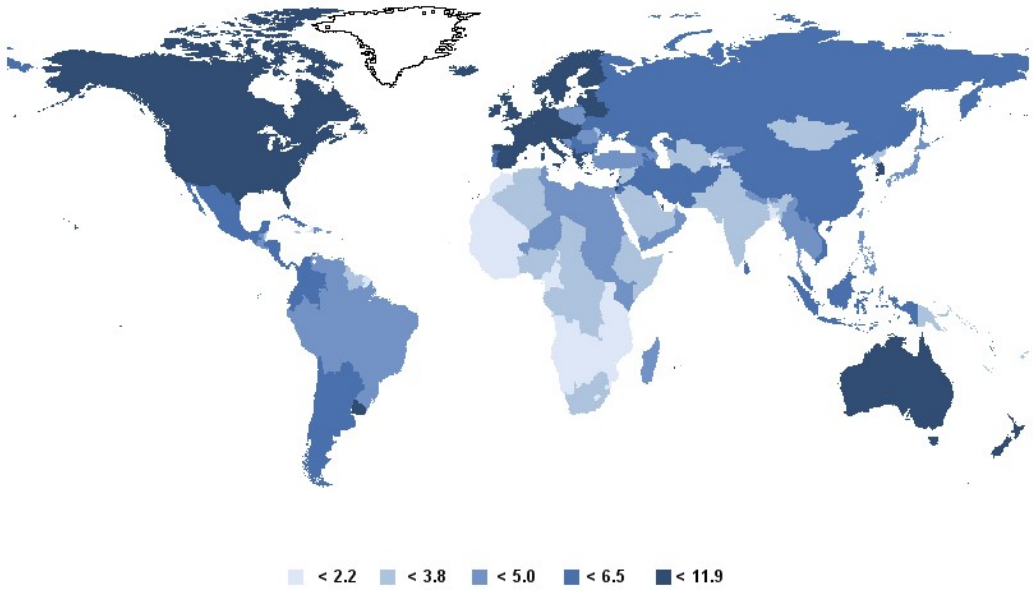
A prevenção e o tratamento representam desafios para a pesquisa atual, visto que apesar de existirem tratamentos promissores e o índice de cura ser elevado, certos tipos de câncer respondem pouco aos agentes quimioterápicos empregados e o tratamento curativo utilizado em qualquer uma das modalidades terapêuticas ou mesmo a combinação delas, é

extremamente complexo (NOGUEIRA, 2008). Dentre os principais tipos de câncer pode-se mencionar a leucemia doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida (INCA, 2012).

1.1.2 Leucemia

A leucemia consiste na proliferação neoplásica generalizada e cumulativa das células hematopoiéticas. Tem como característica principal o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. A incidência dos casos de leucemia para o ano de 2008 é apresentada na Figura 1. Os números de casos para o ano de 2012 foram de 8.510, sendo 4.570 homens e 3.940 mulheres e o número de mortes registradas no ano de 2010 foi de 5.935, sendo 3.202 homens e 2.733 mulheres (INCA, 2012).

Figura1. Incidência de leucemia no mundo por 10.000 habitantes em ambos os sexos e todas e as idades em 2008.



Fonte: GLOBOCAN, 2008.

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia é a quinta neoplasia mais observada na região Norte (3/100 mil). Na região Nordeste (4/100 mil), ocupa a oitava posição, na região Centro-Oeste (5/100 mil), a décima e, nas regiões Sul (6/100 mil) e Sudeste (5/100 mil), a 11ª. Para as mulheres, é a sétima mais frequente na região Norte (3/100 mil) e a décima nas regiões Centro-Oeste (4/100 mil) e Nordeste (3/100 mil), enquanto, nas regiões Sudeste (4/100 mil) e Sul (5/100 mil), é a 12ª e a 13ª mais incidente, respectivamente (INCA, 2012).

Clínica e patologicamente, a leucemia subdivide-se em aguda e crônica de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células. A leucemia aguda (LA) caracteriza-se por aumento rápido (proliferação clonal) do número de células imaturas do sangue, progenitoras da linhagem mielóide (mieloblastos), inviabilizando a produção de células normais pela medula óssea. Infiltração da medula é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia (FERRARA, 2004; SILVA et al., 2006; LICTH; STERNBERG, 2005). A leucemia crônica (LMC) caracteriza-se pela presença de uma anormalidade genética adquirida, chamada de cromossomo Philadelphia. Essa cromossomopatia autossômica não congênita se caracteriza pela elevação considerável de leucócitos do sangue e por acúmulo de todas das formas de granulócitos maduros e imaturos (MELO; HUGHES; APPERLEY, 2003).

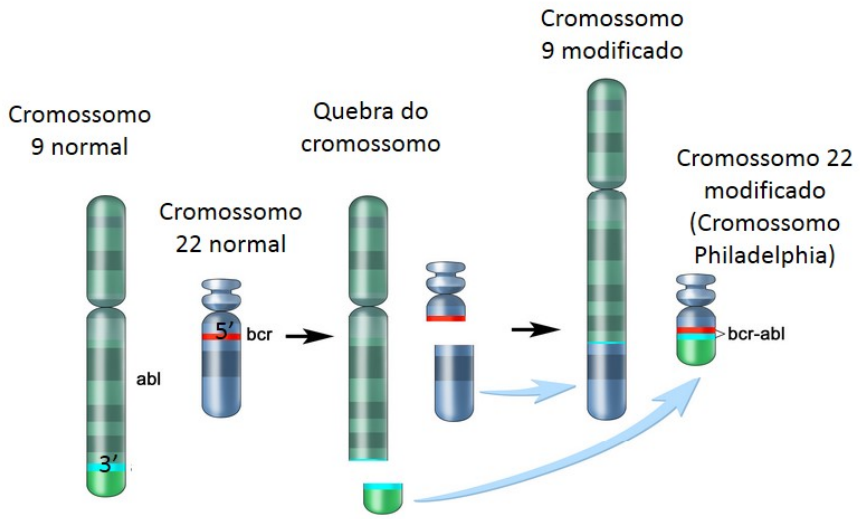
1.1.3 Leucemia crônica

A leucemia crônica foi descrita pela primeira vez por Peter C. Nowell e colaboradores da escola de medicina da Universidade da Pensilvânia, em 1960, relatando a translocação entre os cromossomos 9 e 22 (cromossomo Philadelphia, ou Ph), sendo o primeiro gene descrito como indutor de câncer (BITENCOURT; ZALCBERG;LOURO, 2011; HAMERSCHLAK, 2008).

O cromossomo Ph resulta de uma translocação que conduz a formação de um gene quimérico, a partir da fusão da extremidade 5' do gene BCR (éxon b2 ou b3) localizado no cromossomo 22 com a extremidade 3' do éxon 2 do gene ABL no cromossomo 9, Figura 2. O produto resultante dessa fusão é a expressão do RNAm quimérico BCR/ABL, que apresenta atividade tirosina-quinase maior que a proteína p145 normal codificada por c-ABL e que tem participação primordial do desenvolvimento da LMC (KURZROCK et al., 2003).

Dependendo da região onde ocorre a quebra do gene BCR, a proteína resultante poderá ter tamanho entre 180 kd a 230 kd. Praticamente todos os pacientes que manifestam a LMC expressam a proteína BCR-ABL com 210 kd com crucial participação no mecanismo de proteção das células hematopoiéticas contra a morte celular programada (apoptose) (KURZROCK et al., 2003).

Figura 2. Representação esquemática dos genes ABL e BCR na t(9;22).Fonte: Adaptado do National Cancer Institute's Dictionary of Cancer (2007).



Fonte: adaptado do National Cancer Institute's Dictionary of Cancer (2007).

A proteína BCR-ABL anômala diminui a adesão das células hematopoiéticas à medula, resultando no escape das células leucêmicas à influencia regulatória que as células estromais geralmente exercem sobre as células hematopoiéticas. Em adição, a proteína BCR-ABL promove a ativação da tirosina quinase, levando à fosforilação de diversos substratos (SAWYERS et al., 1999; KANTARJIAN, et al, 2002; FAVA; SAGLIO, 2010).

A LMC desenvolve-se a partir de três fases distintas (fase crônica, acelerada e blástica). A fase crônica é definida pelo aumento dos leucócitos e blastos no sangue periférico ou medula óssea. Geralmente permanece por anos e os sinais e sintomas se agravam com a progressão da doença (CALABRETTA et al., 2004).

A fase acelerada tem duração de 4 a 6 meses e é caracterizada por agravamento sistemático da doença e aumento das células progenitoras em relação às células diferenciadas. Os critérios da Organização Mundial de Saúde para a caracterização dessa fase são: porcentagem de blastos de 10% a 19% e de basófilos igual ou maior que 20%, contagem de plaquetas refratária e inferior 100.000 ou superior a 1.000.000, evolução clonagem positiva, proliferação de megacariócitos e fibrose (REDAELLI et al., 2004).

Por fim, a fase blástica é definida pela presença de mais de 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea ou pela presença de doença blástica extra-medular. Os sintomas incluem linfadenopatia, disfunção do sistema nervoso central, fadiga associada à anemia, sangramento e infecções. Os pacientes nessa fase apresentam péssimo prognóstico, com média de sobrevida de 3 a 6 meses (CALABRETTA et al., 2004).

O avanço da doença torna seu tratamento mais difícil a cada fase. Aproximadamente 85% dos pacientes portadores de LMC são diagnosticados na fase crônica e 60% dos pacientes apresentam manifestações clínicas. Entre os sintomas observados incluem, fraqueza, febre, fadiga, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, infecções frequentes, entre outros. Os achados laboratoriais frequentemente observados consistem na redução ou aumento do número de plaquetas e aumento no número de leucócitos (REDAELLI et at., 2004).

O diagnóstico da leucemia mielóide crônica é realizado através de hemograma completo, aspiração e biopsia da medula óssea e pesquisa do cromossomo Philadelphia. Para diagnóstico genético são realizados a citogenética padrão (considerada padrão ouro, podendo revelar o cromosso

Philadelphia em 90% dos pacientes), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), reação de cadeia em polimerase (PCR) e através de análise por Nothern e Southern blot. (REDAELLI et at., 2004; SILVA et al., 2006; FAVA; SAGLIO, 2010).

1.1.4 Tratamento da leucemia mielóide crônica

O tratamento da LMC objetiva inicialmente a estabilização do número de células sanguíneas, erradicação dos sinais e sintomas e manutenção desta resposta por mais de 4 semanas. Comprovações citogenéticas e moleculares são imprescindíveis para avaliação da melhora (KURAMATO et al., 2006).

Dentre o arsenal terapêutico empregado no tratamento da LMC está compreendido o transplante de medula óssea alogênica (TMO), infusão de linfócitos, uso de diversos fármacos, tais como quimioterapia com hidroxiuréia, citarabina em baixa dose, bussufan, interferon-α (IFN-α) isolado ou associado à citarabina e mais recentemente, o mesilato de imatinibe (KURAMATO et al.; 2006).

O transplante de medula óssea visa à erradicação dos clones de células malignas dos pacientes e a restauração da hematopoiese por intermédio da infusão de células-tronco da medula óssea de um doador normal compatível. O TMO tem aplicação limitada, por conta da alta morbi-mortabilidade (20 a 30%). A probabilidade de sobrevida a longo prazo quando o transplante é realizado na primeira fase da doença é de aproximadamente 60% (KURAMATO et al., 2006; MOHTY et al., 2005).

Outra terapia empregada aos portadores de LMC é a infusão de linfócitos, que pode induzir à remissão hematológica e citogenética em grande proporção dos pacientes. Os demais tratamentos empregados visam normalizar os mecanismos de regulação da proliferação celular, reduzindo a atividade citogenética ou induzindo a apoptose das células progenitoras leucêmicas (BERGANTINI et al., 2005).

Agentes citostáticos como a hidroxiuréia podem ser utilizados para inibir a proliferação celular, mas cabe ressaltar que tanto as células leucêmicas como normais podem ser afetadas, pela inibição da síntese do DNA, sem evidentes efeitos sobre a via extrínseca da apoptose. Como quimioterápico a hidroxiuréia induz a morte celular pela ativação da via intrínseca e retarda a progressão da doença para a crise blástica (BERGANTINI et al.; 2005).

O IFN-α age diretamente na proliferação do clone leucêmico promovendo sua inibição, ou potencializando a resposta imune dos pacientes. O efeito imunomodulador consiste na ativação de células efetoras T CD8 e NK. Potencialização da apoptose das células $CD34^+$ é observada após o emprego de IFN-α, alcançando o controle do número das células sanguíneas periféricas, causando subsequentemente redução da população de células que abrigam o cromossomo Ph para valores inferiores a 35% (BERGANTINI et al.; 2005).

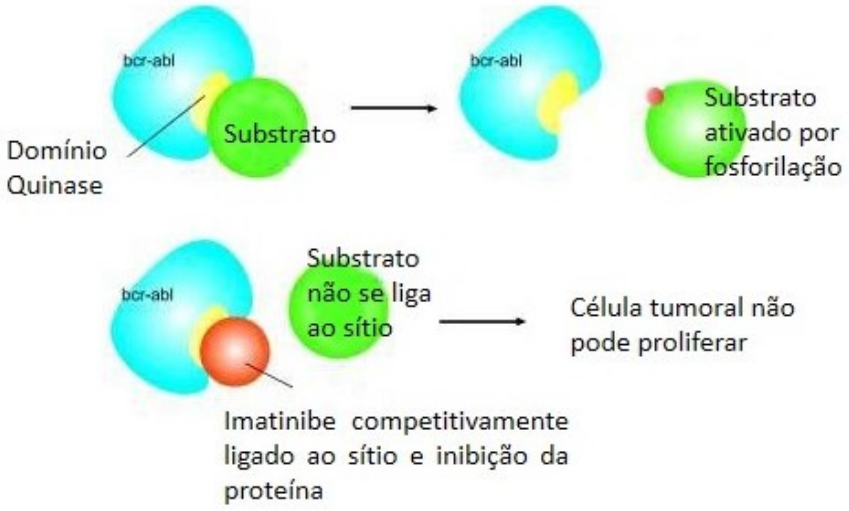
Diversas estratégias estão sendo empregadas para desenvolver novos tratamentos que atuem diretamente e especificamente sobre as células leucêmicas, tendo como alvo a proteína BCR-ABL. A identificação dessa proteína como responsável pela patogênese da LMC conduziu ao

desenvolvimento de fármacos inibidores da tirosina quinase, dentre eles o que é utilizado com grande sucesso, o mesilato de imatinibe (MI) (Novartis Pharma AG, Switzerland). Sua escolha se deve pela alta eficácia, baixa toxicidade e habilidade em manter a resposta hematológica e citogenética, na fase crônica da LMC (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008; HOCHHAUS et al., 2009; KINSTRIE e COPLAND, 2013).

De acordo com a monografia do fármaco, trata-se de um derivado da 2-fenilaminopirimidina, que é capaz de inibir a proliferação e induzir a apoptose em linhagens de células BCR-ABL positivas, incluindo as células da LMC positivas para o cromossomo Ph (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008; HOCHHAUS et al., 2009)

O MI desempenha seu efeito terapêutico na LMC através da ligação competitiva ao sítio de ligação do ATP da proteína BCR-ABL, inibindo diferentes vias de sinalização celular que estavam ativadas pela tirosina quinase (AULT, 2006). O MI modula diferentes proteínas anti e pró-apoptóticas pertencentes às vias extrínsecas e intrínsecas da morte celular. Empregado de forma isolada ou associado a outros fármacos aumenta a expressão do antígeno FasL em células leucêmicas. Esse aumento de expressão contribui para a ativação da via extrínseca da apoptose, Figura 3 (AULT, 2006).

Figura 3. Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe.



Fonte: Adaptado de ChemistryDaily, (2007).

O imatinibe produz resposta citogenética na maioria dos casos, entretanto, uma pequena parcela dos pacientes que respondem inicialmente ao tratamento, posteriormente desenvolve resistência (AULT, 2006; BRECCIA et al., 2011). O fenômeno de resistência pelas células leucêmicas ao MI deve-se essencialmente a mutações no gene BCR-ABL que geram alterações no sítio de ligação do MI à quinases e das propriedades cinéticas (DRUKER et al., 2006; GRISWOLD et al., 2006; BRECCIA; ALIMENA, 2009).

O processo de resistência ao MI conduziu ao desenvolvimento de inibidores de segunda geração, tais como desatinibe e nilotinibe. O desatinibe apresenta potência 325 vezes superior ao MI no que tange a inibição da proteína quinase BCR-ABL-1, especialmente por se ligar à quinase tanto na conformação ativa quanto inativa. Inibe também outras

quinases relacionadas à doença tais como: c-kit, PDGFR e Src (WARMUTH et al., 2003; TALPAZ et al., 2006; HANTSCHEL et al., 2008).

Para o nilotinib a potencia varia entre 20 a 50 vezes mais, quando comparado com o imatinibe, entretanto, este fármaco não apresenta efeito sobre a Src ou sobre a quinase que apresenta a mutação T315I, caracterizada pela substuição do aminoácido treonina 315 pela isoleucina (KANTARJIAN et al., 2006). Apesar da maior atividade destes fármacos de segunda geração, resistência também é observada. Assim, inibidores de aurora quinases têm sido desenvolvidos, alguns capazes de afetar o fuso mitótico e induzir a morte celular, como o MK-0457 (GILES et al., 2007, SOVERINI et al., 2012).

1.2 Resistência a múltiplas drogas

Um dos maiores obstáculos no tratamento do câncer concerne no desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterápicos, principalmente nos casos de neoplasias hematológicas. O tratamento cirúrgico nesses casos é ineficaz, o que torna a quimioterapia a conduta médica de escolha. Nesse cenário, uma das principais metas dos pesquisadores da área é elucidação dos mecanismos que conferem resistência a fármacos com diferentes alvos e estruturas químicas, bem como descobrir e desenvolver novas terapias (O'CONNOR, 2007).

Múltiplos mecanismos podem contribuir para a resistência a quimioterapia, tais como defeitos na regulação dos genes que controlam a apoptose, alterações no reparo do DNA, ativação ou super-expressão de

proteínas que promovem o efluxo de fármacos mediado por membros da família de transportadores ABC (“ATP-binding cassete transportes”). Como um mecanismo de caráter multifatorial, o fenótipo MDR (multidrug resistence) tem sido associado a uma variedade de alterações celulares (SZAKACS et al., 2006). Vários membros da família de transportadores ABC têm-se apresentado como potenciais indutores de MDR, destacando-se o papel da glicoproteína-P (P-Gp) (HIROSE et al., 2003; AL-SHAWI et al., 2005; LAGE, 2008).

1.3 Mecanismos de morte celular

Desde as primeiras tentativas em descrever os mecanismos da morte celular programada, que datam de meados da década de 60, diversas sub-vias de morte têm sido estabelecidas com base nas características morfológicas. Em 1973, Schweichel e Merker (apud GALLUZZ et al.,) propuseram uma categorização de diversas modalidades de morte, incluindo, tipo I associada a heterofagia, tipo II associada com autofagia e tipo III associado com algum tipo de digestão, correspondendo a apoptose, autofagia e necrose, respectivamente (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964; GALLUZZ et al., 2012).

Em 2005 e 2009, a comissão de nomenclatura em morte celular (NCCD) estabeleceu critérios na tentativa de unificar uma definição dos morfotipos de morte celular. Foram propostas orientações para a utilização de uma terminologia adequada. Em vista do substancial progresso na exploração bioquímica e genética de morte celular, varias terminologias

foram incluídas, entre elas, apoptose, necrose e catástrofe mitótica (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009)

Métodos bioquímicos para avaliar a morte celular apresentam vantagem sobre as técnicas morfológicas, uma vez que são quantitativos e, portanto menos propensos a interpretações errôneas. No entanto, não estão isentos de interpretações equivocadas, especialmente quando parâmetros individuais estão sendo investigados. Por exemplo*, in vitro*, a ativação de caspase não é um requisito para vários casos de apoptose. Da mesma forma, a exposição da fosfatidilserina (FS), que é amplamente considerada como um fator precoce de morte celular por apoptose, supostamente não ocorre na autofagia (CHO et al., 2009; ZHANG et al.; 2009; GALLUZZ et al., 2012)

Um fenômeno específico relacionado à morte celular, pode ocorrer na execução de uma outra via, como é o caso da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) associada a casos de apoptose e que também está presente nos eventos de necrose. Nessa mesma linha de pensamento, a exposição de FS não é prerrogativa de morte celular por apoptose, uma vez que também constitui uma característica precoce de netosis (GALLUZZ et al., 2012).

1.3.1 Definição de “Apoptose extrínseca”

O termo apoptose extrínseca tem sido amplamente usado para indicar morte celular que é induzida por stress extracelular de sinais que são recebidos e propagados por receptores específicos na transmembrana

(GALLUZZ et al., 2012). A apoptose extrínseca pode ser iniciada como ligação de ligantes letais, tais como FAS/ligante CD95 (FAS/CD95L), fator de necrose tumoral, (TNF-α) e fator de necrose tumoral-relacionado de indução a apoptose do ligando (TRAIL), entre vários outros receptores de morte (WAJANT, 2002; MEHLEN; BREDESEN, 2011).

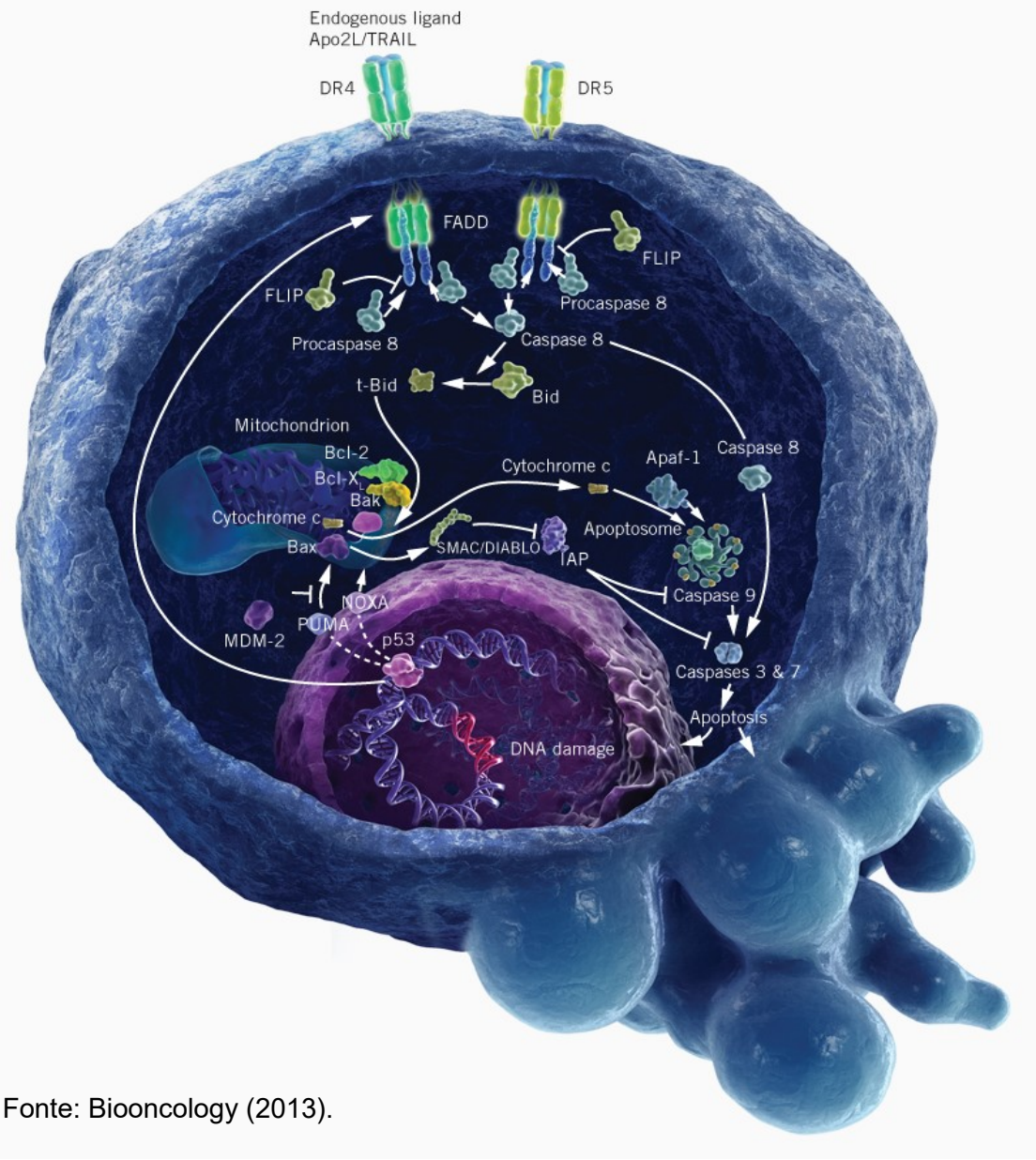
Alternativamente sinais pró-apoptóticos extrínsecos podem ativar outros tipos de receptores dependentes, tais como os netrins (ex.: UNC5A-D) que exercem suas atividades letais apenas quando a concentração de seus ligantes específicos está abaixo de um limiar crítico (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964; GALLUZZ et al., 2012).

A sinalização extrínseca que conduz a apoptose pode ser mediada pela ligação ao receptor de superfície celular (Fas). Espontaneamente subunidades de Fas reúnem-se para gerar trímeros, que irão formar um complexo multiproteíco com uma “cauda” citosólica do receptor,sendo nomeados de domínios de morte (DM). As proteínas recrutadas no DM do Fas incluem a proteína quinase1 (RIPK1); proteína Fas-associada com domínio de morte (FADD), múltiplas isoformas de c-FLIP, proteínas de inibição celular da apoptose (cIPAs), pro-caspase-8 entre outras. Esse complexo supramolecular resultante foi nomeado de complexo de sinalização morte-induzida (DISC), e constitui uma plataforma que regula a ativação da caspase-8 (KUROKAWA e KORNBLUTH, 2009).

Em alguns tipos celulares, incluindo linfócitos, a caspase-8 deflagra a ativação proteolítica de caspase-3, acionando assim uma fase executora de apoptose caspase-dependente de maneira mitocôndria-independente. Em outros tipos celulares, tais como hepatócitos e células β-pancreaticas, a via

mitocondrial pode ser ativada por intermédio da caspase-8 que participa da clivagem proteolítica de BH-3 agonista do domínio de morte (BID), conduzindo a geração de um fragmento de permeabilização mitocondrial (tBID). Posteriormente outras proteínas pró-apoptóticas como Bax/Bak serão ativadas conduzindo a via intrínseca, conforme a figura 4 (PETER; KRAMMER, 2003; KUROKAWA;KORNBLUTH, 2009).

Figura 4. Vias de indução de apoptose. Ativação da via extrínseca mediada por receptor de superfície celular Fas. A cascata de eventos segue ativando caspase 8 e por fim caspase-3 (efetora). Via mitocondrial ativada por outros sistemas a partir da proteína Bid. Agentes externos podem ativar diretamente a via intrínseca de forma independente a Bid.



Fonte: Biooncology (2013).

1.3.2 Definição de “Apoptose intrínseca”

A morte celular por apoptose pode ser desencadeada por uma infinidade de condições intracelulares, incluindo danos ao DNA, estresse oxidativo, sobrecarga de Ca^{+2}, excitotoxicidade (relacionada com super-estimulação dos receptores de glutamato no sistema nervoso), entre muitos outros fatores (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964; GALLUZZ et al., 2012).

Embora as cascatas de sinalização que desencadeiam a apoptose intrínseca sejam heterogêneas, tanto quanto os estímulos iniciadores, todos esses eventos estão relacionados a um mecanismo de regulação da mitocôndria. Frequentemente, a propagação de sinais pró-apoptóticos e anti-apoptóticos estão envolvidos na permeabilização da membrana externa mitocondrial. A permeabilização da membrana pode ser induzida pela formação de poros resultante da ação de membros da família da proteína Bcl-2, tais como Bak e Bax (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

Vários outros mecanismos afetam a permeabilização da membrana mitocondrial como dissipação do potencial de membrana com a interrupção de síntese de ATP mitocondrial, liberação de proteínas tóxicas presentes no espaço intermembrana mitocondrial para o citosol, como o citocromo c (CYTC), fator indutor de apoptose (AIF), endonuclease G (ENDOG), inibidores das proteínas inibidoras de apoptose (DIABLO, também conhecido como um segundo ativador de caspase, SMAC), inibição da cadeia respiratória (favorecendo a liberação de citocromo c) e super produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

Assim, a apoptose intrínseca resulta de uma catástrofe bioenergética e metabólica associada a múltiplos fatores. É guiada em resposta a sinais de

injúria e stress celular. O mecanismo principal envolve a participação de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 que atuam sobre a inibição de Bax/Bak, entretanto, quando há dominância desses fatores pró-apoptóticos, a apoptose é favorecida (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

A oligomerização de Bax/Bak é responsável pela permeabilização mitocondrial, deflagrando a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c, a partir do espaço intermembranar para o citoplasma. Um novo complexo denominado de apoptossomo é formado por intermédio da ligação entre o citocromo c liberado e um adaptor de morte Apaf1. Uma vez formado, o apoptossomo sofre oligomerização expondo o domínio de recrutamento de caspases (CARD), solicitando a pró-caspase 9 que irá atuar sobre a pró-caspase 3, e esta por sua vez promoverá a ativação da caspase 3 ou caspase 7. As caspases efetoras ativadas irão orquestrar a morte celular nessa cascata de eventos (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009; HE et al.; 2009; ZHANG et al., 2009; ZONG et al., 2004; BANO et al., 2005; DEGTEREV, 2008; WANG et al., 2007).

A regulação da via intrínseca ocorre pelo nível transcricional e pós-transcricional dos membros da família Bcl-2, através ainda da expressão de outros componentes efetores de morte e inibidores de caspases, denominados de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009; HE et al.; 2009; ZHANG et al., 2009; ZONG et al., 2004; BANO et al., 2005; DEGTEREV, 2008; WANG et al., 2007).

As principais vias de morte celular descritas recentemente na literatura encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela1. Classificação funcional das vias de morte celular.

	Principais características bioquímicas	Caspase dependente	Exemplo de intervenções inibidas
Anoiquia	Baixa regulação de EGFR Inibição da sinalização ERK1 Ativação de caspase 3- (-6, -7)	++	Super expressão de Bcl-2 Administração de Z-VAD-fmk
Morte Celular Autofagica	Lipidação de MAP1LC3 Degradação de SQSTM1	--	Inibição do genética do BCN1
Apoptose intrínseca caspase-dependente	Permeabilização da membrana mitocondrial, dissipação irreversível do potencial de membrana($\Delta\Psi m$)	++	Super expressão de Bcl-2
Cornificação	Ativação de transglutaminases Ativação de caspase 14	++	Inibição genética de TG1, TG3 ou TG5 Inibição genética de caspase-14
Entosis	Ativação de RHO Ativação de ROCK1	--	Inibição genética da metalotioneina 2A Inibidores Lisossomais
Apoptose extrínseca por receptores de morte	Sinalização de receptores de morte Ativação de caspase -8 (-10) Clivagem de BID e permeabilização da membrana mitocondrial (em células do tipo II) Ativação de caspase-3 (-6,-7)	++	Expressão de Crma Inibição genética de caspases (3 e 8)
Catástrofe mitótica	Ativação de caspase-2 Bloqueio mitótico	--	Inibição genética ou farmacológica de caspase-2
Necroptose	Sinalização dos receptores de morte Inibição das caspases Ativação de RIP1 e/ou RIP3	--	Administração de necrostatins Inibição genética de RIP1/RIP3
Netoses	Inibição das caspases Ativação da oxidase NADPH	--	Inibição da autofagia Inibição da oxidadase NADPH Inibição genética da PAD4
Partanatos	Dissipação irreversível do ($\Delta\Psi m$) Depleção de ATP e NADH Ligação do PAR ao AIF e translocação do AIF nuclear	--	Inibição genética do AIF Inibição genética ou farmacológica do PARP
Piroptoses	Ativação de caspase -1 (-7) Secreção de IL-1β e IL-18	++	Administração de Z-YVAD-fmk Inibição genética de caspase -1

Abreviações: $\Delta\Psi m$, Potencial de membrana mitocondrial;BCN1, beclina; CrmA, citocinas de resposta modificada; EGFR, receptor epidermal de fator de crescimento; ERK1, quinase extracelular regulada; IL, interleucina; MAP1LC3, proteína microtubulo-associada, PAD4, peptidilarginina arginina-peptidil-deaminase PAR, poli(ADP-ribose); PARP1, polimerase poli-ADP- ribose;ROCK1 e RHO, proteínas Rho quinase Z-VAD-fmk, N-benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona; Z-YVAD-fmk, , N-benziloxicarbonil-Tyr-Val-Ala-DL-fluorometilcetona.SQSTM1, sequestosome (proteína multivesicular); AIF, fator indutor de apoptose; BID, proteína agonista de morte celular de domínio interatuante com Bh3; PAR, polimerase; TG, beclinas; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido hidreto.
Fonte: Adaptado de GALLUZZI(2012)

1.4 Produtos naturais e câncer

Compostos originados de fontes naturais, desde os primórdios, são utilizados na terapêutica de inúmeras enfermidades no ser humano. Uma substancial parte dos medicamentos encontrados no mercado é proveniente direta ou indiretamente de fontes vegetais, micro-organismos, organismos marinhos, invertebrados e vertebrados (BRANDÃO et al., 2010; NEWMAN; CRAGG, 1999; ROCHA et al., 2001).

Segundo Newman e Cragg (2007), medicamentos obtidos de produtos naturais são eficazes no tratamento de diversas patologias humanas incluindo os anticancerígenos. Os medicamentos antitumorais monopolizaram cerca de 1/3 do mercado mundial em 2002 com apenas dois grupos de quimioterápicos oriundos de produtos naturais (taxanos e derivados da camptotecina) e cerca de U$ 3 bilhões de dólares foram arrecadados (BRANDÃO et al., 2010).

Na tentativa de descobrir tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que impeçam a progressão da doença, a busca por novos medicamentos anticancerígenos tem aumentado sobremaneira, baseada na biologia do câncer. São pesquisadas novas moléculas que atuem com mecanismos específicos, como inibição da polimerização da tubulina, ação sobre o DNA, bloqueadores enzimáticos ou dos microtúbulos celulares. Compostos que atuam pelo mecanismo de inibição dos microtúbulos estão se tornando mais atrativos e promissores como antitumorais de aplicação clínica, sendo o paclitaxel (Taxol®) o principal representante dessa classe (BRANDÃO et al.; 2010; CARVALHO, 2006).

1.4.1 Anticancerígenos derivados de plantas

As plantas têm longa história de utilização no tratamento do câncer e a descoberta de novos compostos anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas na área. O exemplo mais notável é a do *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida pelo nome vernacular de vinca empregada, *a priori,* no tratamento de diabetes (BRANDÃO et al., 2010). Durante os testes de atividade hipoglicemiante os extratos da vinca induziram a granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação de atividade nesses modelos conduziu ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina que, são de grande importância no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010; NIRMALA; SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2011).

Outro exemplo importante foi o isolamento da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica presente em espécies do gênero *Podophyllum* tais como *P. peltatum* e *P.emoddi*, empregadas para o tratamento do câncer de pele e verrugas, que permitiu a obtenção do etoposídeo e teniposídeo, hoje empregados na terapia do câncer (SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2011).

Essas descobertas têm incentivado o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) a realizar um programa de screening, para agentes anticancerígenos, com vegetais. Entre as décadas de 60 e 80 foram avaliadas cerca de 35.000 amostras vegetais e o resultado mais importante foi a descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e

Taxus brevifolia Nutt.) em 1971 (BRANDÃO et al., 2010; NIRMALA; SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2011).

Outra opção terapêutica de origem vegetal para o tratamento do câncer é a emodina (1,3,8-tri-hidróxi-6-metil-antraquinona), isolada do ruibarbo, *Rheum palmatum* L (Polygonaceae) que regula as proteínas transdutoras de sinais, como as quinases envolvidas nos processos malignos em células. Além das diversas aplicações para a emodina, estudos descrevem que tal antraquinona é capaz de induzir apoptose em diversos tipos de células cancerígenas humanas, como de pulmão, fígado, ovário e sangue (GUO et al., 2009; SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2011).

β-lapachona, orto-naftoquinona lipofílica, derivada do lapachol, isolada do ipê roxo (*Tabebiua avellanedae* Lorentz ex Griseb) possui atividade antifúngica, antibacteriana e ação antitumoral. Esta ultima atividade é decorrente da ligação por interação direta com as enzimas DNA topoisomerase I e II. A β-lapachona mostrou-se ativa frente a diversos tipos de câncer, e em associação com o taxol, potencialmente efetiva contra câncer de próstata e de ovário. O grande inconveniente é a elevada toxicidade, mas para isso estão sendo desenvolvidos análogos sintéticos, no quais o anel o-quinona é mantido intacto na tentativa de reduzir a toxicidade (GUPTA et al., 2002; SILVA;FERREIRA; SOUZA, 2003).

Distintos mecanismos de ação são observados nos antitumorais derivados de plantas e todos eles visam à interrupção do ciclo de células malignas, tendo como característica essencial a distinção entre estas com as células normais. Considerando-se que menos de 10% das biodiversidade de plantas foram submetidos a estudos fitoquímicos ou de atividade biológica,

muitos medicamentos oriundos de plantas ainda estão por ser descobertos, incluindo antitumorais. Porém, é uma tarefa árdua, visto que a cada 5 mil estruturas químicas testadas, uma apenas terá potencial para se tornar medicamento (BRANDÃO et al., 2010).

1.5 Gênero *Clusia*

O gênero tropical *Clusia*, pertencente à Família *Clusiaceae* com cerca de 300 espécies (67 encontradas no Brasil) distribuídas desde o sul da Flórida até o sul do Brasil é importante por sua grande diversidade, biologia de polinização, adaptação ecológica e morfologia floral. Os exemplares incluem hemiepífitas (estranguladores), arbustos, lianas (trepadeiras lenhosa) e árvores. Estudos mostram significativa variabilidade nos padrões de absorção de CO_2 no gênero, provavelmente, o que confere o sucesso de *Clusia* em sua adaptação a vários habitats como planícies, florestas montanhosas, savanas ou dunas (GEHRID et al., 2003) A maioria dos espécimes são plantas lenhosas, perenes com folhas carnosas e flores dióicas, portadoras de látex em seus tecidos (ARMBRUSTER, 1984; SIMPSON; NEFF, 1981; BITTRICH; AMARAL, 1996; OLIVEIRA et al.,1996; OLIVEIRA et al., 1999).

A nomenclatura *Clusia* foi proposta por Plumier em 1703, para homenagear o botânico belga Jules Charles de l'Ecluse (Carolus Clusius). Em 1753 o gênero foi descrito por Linneu na primeira edição do "Species Plantarum", com *Clusia major* L. como espécie-tipo (PLANCHON; TRIANA, 1860). No Brasil a primeira referência para o gênero foi feita por Mcgrave em

1648 a partir de material coletado em Pernambuco e identificado posteriormente como *Clusia nemorosa* Meyer (ANDRADE-LIMA et al., 1977). A espécie utilizada nesse trabalho é observada na figura 5.

Figura 5. Folhas e flores de *Clusia sp*

As espécies desse gênero apresentam tecidos com canais de látex e diversas cores para o látex têm sido relatadas por coletores de plantas. Embora os exemplares do gênero *Clusia* sejam dióicos, foram descritos indivíduos hermafroditas ou flores hermafroditas (PLANCHON; TRIANA, 1860; ENGLER, 1925). As Resinas florais e polén têm sido descritos como atrativos para polinizadores. Segundo Brittich e Amaral (1997), estas plantas possuem polinizadores altamente específicos. Dentre os agentes polinizadores incluem, abelhas de vários grupos taxonômicos, beija-flores, besouros e moscas (LOPES; MACHADO, 1998).

Notável variedade na morfologia floral, particularmente do androceu (PLANCHON; TRIANA, 1960), acompanhada por grande diversidade na biologia reprodutiva são características também observadas para o genêro (ARMBRUSTER, 1984; BITTRICH e AMARAL, 1996; BITTRICH; AMARAL, 1997). As flores femininas de *Clusia* produzem a resina a partir de um anel de estaminódios que circunda o gineceu e nas flores masculinas a mesma é

secretada pela expansão do tecido conectivo da antera ou por alongamento dos estaminódios ricos em estames férteis (CARMO; FRANCESCHINELLI, 2002).

Reproduzem-se por intermédio da polinização cruzada, com participação de agentes abióticos tais como vento e água ou bióticos como insetos e pássaros que visitam as flores em busca de material para construir e defender seus ninhos (ARMBRUSTER, 1984; BITTRICH; AMARAL, 1997; NOGUEIRA et al., 2001).

Em angiospermas é rara a secreção de resina floral, sendo conhecidos apenas cinco gêneros para a produção da mesma. Quatro deles (*Clusia, Clusiella, Chrysochlamys e Tovomitopsis*) pertencem à família Clusiaceae (GUSTAFSSON; BITTRICH, 2002). O quinto gênero é *Dalechampia* da família Euphorbiaceae (ARMBRUSTER; WEBSTER, 1979; ARBRUSTER, 1984; HOCHWALLNER; WEBER, 2006). A fitoquímica da resina floral de algumas espécies de *Clusia* foi investigada (OLIVEIRA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1999), e várias benzofenonas isopreniladas e polipreninadas foram consideradas como componentes principais.

A resina floral de *Clusia* é um produto não nutritivo, produzido em cavidades secretoras. Tem característica hidrófoba e viscosa sendo recolhida por diversas espécies de abelhas para construção de seus ninhos. Roubik (1989) e Armbruster (1984) foram os primeiros a observar que as abelhas femininas solitárias *Megachilidae* da tribo *Euglossini* e sociais das tribos *Meliponini* e *Trigonini* coletam, além do pólen e néctar, a resina floral, produto raro em angiospermas. Devido às características viscosas é empregada para fixar materiais como galhos, areia e outras substâncias. Em

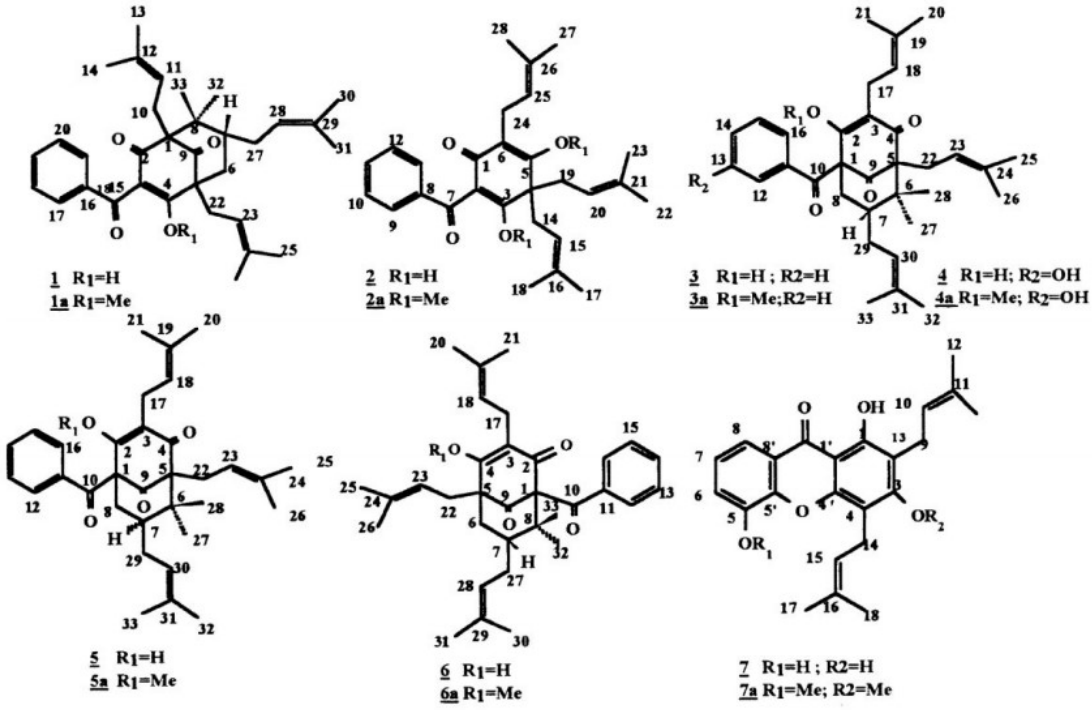
combinação com as ceras produzidas pelas abelhas esse produto pegajoso funciona como proteção à prova de água para as câmaras de larvas. Além dessa função mecânica, a resina apresenta propriedades antimicrobrianas (LOKVAM; BRADDOCK, 1999).

1.5.1 Fitoquímica do Gênero *Clusia*

Dados fitoquímicos obtidos de inúmeras espécies da família Clusiaceae revelaram a presença de grande diversidade de compostos como flavonóides, xantonas, lactonas, ácidos fenólicos, sesquiterpenos e ácidos tocotrienólicos (WATERMAN, 1986; ANDRADE, et al., 1998). Investigação das espécies *Clusia rosea*, *Clusia nemorosa* e *Clusia grandiflora* evidenciaram a presença de benzofenonas polisopreniladas nos frutos, raízes e folhas (GUSTAFSON et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1996).

A primeira investigação das resinas florais de *Clusia* (OLIVEIRA et al., 1996) levou ao isolamento de quatro benzofenonas polisopreniladas, clusianone, grandone, nemorosone, hidroxi-nemorosone e seus quatro derivados orto-metil. A Figura 6 apresenta as benzofenonas. Diferenças na composição das resinas coletas em flores masculinas e femininas de mesmas espécies e diferentes espécies de Clusia foram observadas (PORTO, et al., 2000).

Figura 6. Principais benzofenonas isoladas do gênero Clusia, 1. Clusianone, 2. Grandone 3. Nemorosone, 4. Hidroxi-nemorosone, 5. 7-epi nemorosone, 6. Nemorosone II, 7. Xantona.



Fonte: OLIVEIRA, et al., 1999.

Oliveira et al. (2012) investigaram os frutos verdes de *Clusia paralicola* e isolaram dois 3,8"-biflavonoides, 2R, 3S, 2"R, 3"R-GB1-7"-O-beta-glucoside e o 2R, 3S, 2"R, 3,8"-binaringenin-7"-O-beta-glucoside, além dos compostos ß-sitosterol, estigmasterol, epicatequina e ß-amirina. Em investigação fitoquímica de *Clusia burlemarxii* foram isolados e identificados vários compostos como o 4-hydroxi-5,5-dimetildihidrofuran-2-one, ácido ácido 2Z-δ-tocotrienóis, ácido betulínico entre outros (RIBEIRO et al., 2011).

1.5.2 Interesse e atividades biológicas de espécies do gênero *Clusia*

Espécies de *Clusia* são de grande interesse ambiental, paisagístico e são empregadas no reflorestamento de restingas (CORREIA et al., 1993). O uso medicinal de espécies do gênero *Clusia* está relacionado ao emprego da resina e látex, sendo indicados popularmente como agentes antirreumáticos, purgativos, febrífugos e para problemas digestivos (CARMO; FRANCESCHINELLI, 2002). Algumas espécies são usadas ainda no tratamento da hanseníase, alívio da cefaleia e cauterização de feridas (ANDRADE et al., 1998). Unguentos e tônicos são reportados também para hipertensão, mialgias, ulceras e feridas (CORREIA et al., 1993).

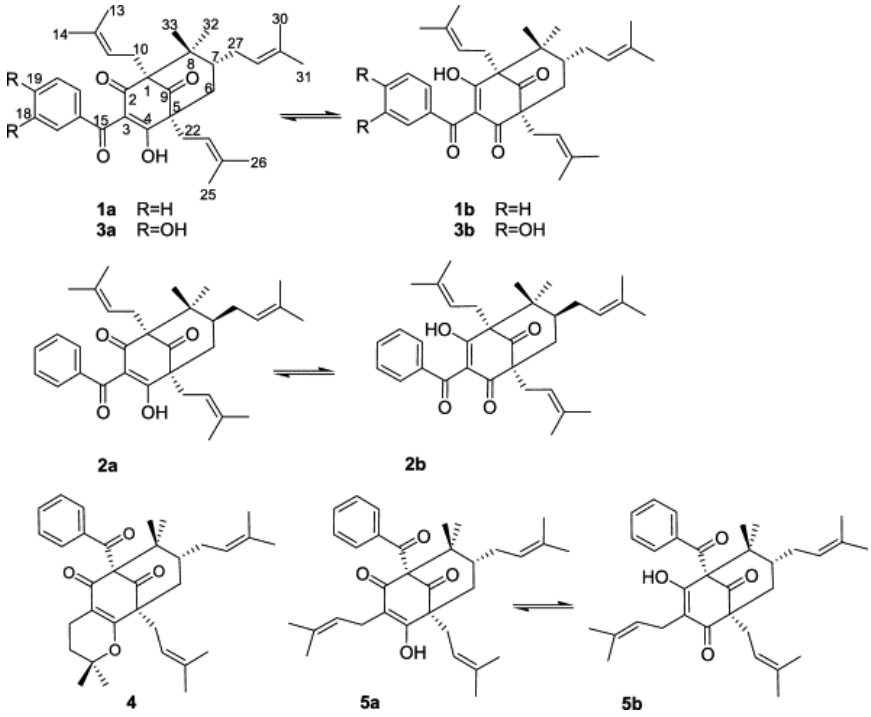
Atividade antimicrobiana de benzofenonas polisopreniladas frente à *Aspergillus Niger* CCT 1435, *Bacillus subtilis* CCT0089, *Candida albicans* CCT 0776, *Escherichia coli* CCT 5050, *Rhodococcus equi* CCT 0541 e *Staphylococcus aureus* foram descritas por Porto et al., (2000). Outros trabalhos também verificaram atividade antimicrobiana dos extratos e compostos isolados de *Clusia burlemarxii* frente à *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides* (RIBEIRO et al., 2011)

Díaz-Carballo et al. (2012) verificaram a indução de apoptose acompanhada da diminuição da regulação dos níveis da proteína de receptor andrógeno (RA), inibição do antígeno prostático específico (PSA) e fragmentação dos transdutores dos sinais da proteína cinase ativada por

mitógenos MEK 1/2 e proteína cinase b (Akt/PKB) pelo composto 7-epi-nemorosone isolado de *Clusia rosea* em câncer de próstata.

A atividade antiviral para HIV humano foi constatada por alguns derivados de benzofenonas isolados dos frutos frescos de *Clusia toressi* Standl. Células Lifoblastóides T (C8166) infectadas com HIV-1_{MN} foram submetidas ao tratamento com benzofenonas polipreniladas (Figura 7) sendo que a que apresentou maior atividade e menor toxicidade foi a propolona (composto 4). As outras benzofenonas isoladas como a nemorosona (5a), 7-epi-clusianona (2a) e a 18,19-dihidroxiclusianona (3a) apresentaram atividade moderada quanto comparadas com a propolona A. Clusianona (1a) apesar de notável atividade em baixas concentrações foi altamente citotóxica. Neste mesmo estudo foi observado que há uma correlação entre a configuração do carbono C7 e o aumento da potência da atividade antiviral frente ao HIV (PICCINELLI et al., 2005).

Figura 7. Benzofenonas Polisopreniladas com atividade antiviral frete HIV humano



Fonte: (PICCINELLI et al., 2005).

Diaz-Carballo et al. (2004) caracterizaram uma nova benzofenona (CLU-502) a partir de extrato metanólico de *Clusia rosea* e verificaram a atividade citotóxica potente de CLU-502 em linhagens de neuroblastoma e leucemia. Ambos os tipos celulares que são resistentes a quimioterápicos conhecidos como a doxorrubicina, cisplatina, etoposídeo, 5-fluorouracil foram altamente sensíveis à ação de CLU-502, sendo importante destacar a menor sensibilidade observada de fibroblastos quando comparados com as linhagens tumorais. CLU-502 inibiu a atividade a topoisomerase I e induziu em concentração dose-dependente a inibição da atividade da telomerase *in vitro*. Em adição foi observada a inibição proteína cinase ativada por mitógenos ERK1/2 e no ensaio de ciclo celular as células testadas ficaram retidas na fase G1 através da indução da cinase ciclina dependente $p21^{CIP}$.

Extratos e frações do caule seco de *Clusia criuva* apresentaram efeitos citotóxicos frente a células de linhagens tumorais de SH-SY5Y de neuroblastoma e GL-15 de glioblastoma humano. Os espectros de RMN ^{1}H das amostras testadas com atividade citotóxica apresentaram sinais de prótons na região de 7 a 8 ppm, na região de 4-6 ppm e sinal de hidrogênio de hidroxila, na faixa de 14 ppm, sugerindo a presença de benzofenonas nos extratos (MARQUES; EL-BACHÁ; CRUZ, 2000)

Efeitos genotóxicos foram observados em leucócitos e células da medula óssea de camundongos tratados com o extrato bruto das folhas de *Clusia alata* por gavagem nas concentrações de 1000, 1500 e 2000 mg/kg. Foi ainda constatado o aumento no prejuízo do DNA na concentração de 2000 mg/kg após 24 horas de tratamento e significativo aumento no número

de aberrações cromossômicas nas células da medula óssea nas doses de 1500 e 2000 mg/kg (MOURA; PERAZZO; MAISTRO, 2008).

Em estudo realizado por Farias et al. (2012), com o extrato obtido de folhas de *Clusia nemorosa* Both, foi observado a modulação do processo inflamatório *in vitro* e *in vivo*, induzido por carragenina. Nos experimentos realizados com o extrato de *C. nemorosa* observa-se a inibição de maneira concentração-dependente a quimiotaxia de neutrófilos humanos. Em adição foi observada a inibição da quimioatração de neutrófilos humanos induzida pelo fator de ativação formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), fator de agregação plaquetária em câmara de Boyden. A exsudação de leucócitos totais e o fluxo de neutrófilos, bem como os níveis do fator de necrose tumoral TNF-α induzidos por carragenina foram inibidos. Vale ressaltar que o mesmo tratamento não foi capaz de induzir a apoptose. Tais resultados evidenciam uma potente atividade inibidora do processo inflamatório agudo para o extrato de *C. nemorosa*.

Biflavonóides isolados dos frutos verdes de *Clusia paralicola* demonstraram significante atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2012). Extrato bruto de *Clusia fluminensis* Planch. & Triana (Clusiaceae Lindl.) também apresentou atividade antioxidante interessante (SILVA; PAIVA, 2012).

Popolo e colaboradores (2011) avaliaram a atividade citotóxica de nemorosone isolado de *Clusia rosea* em células de câncer de mama humano MCF-7. Neste estudo, o nemorosone inibiu a viabilidade de células positivas para receptor de estrógeno ERα+ e inibiu o crescimento celular

bloqueando o ciclo celular na fase G_0/G_1. Este mesmo composto apresentou atividade citotóxica frente a células leucêmicas, bloqueando a proliferação e induzindo a apoptose a partir da redução da regulação das ciclinas A, B1, D1 e E (DÍAZ-CARBALLO et al., 2008).

Com finalidade de desenvolver novos fármacos com mecanismos de ação capazes de driblar a resistência de alguns tumores em relação aos antineoplásicos atuais, ou minimizar possíveis reações adversas aos fármacos faz-se necessário a realização de novos testes de atividades biológicas com produtos obtidos de plantas. Considerando o potencial biológico descrito e a capacidade de induzir a morte celular por exemplares do genêro *Clusia*, foi proposta a realização deste trabalho com a finalidade de avaliar e identificar o potencial antileucêmico *in vitro*, a atividade antitumoral *in vivo*, bem como o potencial mielotóxico, hemolítico e toxicidade aguda.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antileucêmico *in vitro* e antitumoral da resina floral e do látex obtidos dos frutos de *Clusia sp*. Investigar e elucidar os possíveis mecanismos de indução destes produtos na morte celular e toxicidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem de citotoxicidade da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp* sobre células K562, Lucena, HL-60, B16F10, PC3 e linfócitos comparando com fármacos empregados usualmente na terapêutica;
- Analisar a morfologia das células k562 após tratamento com a resina floral e o látex;
- Pesquisar os mecanismos de indução de morte celular.
- Avaliar o aumento da sobrevida de camundongos Swiss inoculados com tumor de Erlich e tratados posteriormente com resina e látex de *Clusia sp*;
- Estimar a toxicidade oral aguda da resina e látex de *Clusia* frente as células de metabolismo basal (3T3-A31).
- Investigar o potencial hemolítico da resina e látex de *Clusia sp*;
- Avaliar o potencial imunossupressor de células da medula óssea de camundongos após tratamento com a resina e látex de *Clusia sp*;
- Avaliar a expressão gênica da caspase-8 envolvida no processo de morte celular, após tratamento com a resina e látex de *Clusia sp*.

3 MÉTODO(S)

3.1 Material botânico

A resina floral e o látex obtido dos frutos de *Clusia sp* foram fornecidos pela Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). A planta ainda encontra-se em fase de identificação botânica por se tratar de uma nova espécie endêmica no Cerrado. Exsicata e dados sobre os locais de coleta ainda encontram-se em fase de elaboração. Para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo* as amostras foram solubilizadas em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, RJ, Brasil), estocadas em geladeira ao abrigo da luz.

3.2 Linhagens celulares

Para os ensaios de triagem foram empregadas as células da linhagem eritroleucêmica humana K562; Lucena derivada da linhagem eritroleucêmica humana K562 desenvolvida como linhagem celular resistente a múltiplas drogas e caracterizada pela alta expressão de Glicoproteína-P, sendo originalmente selecionada pela resistência ao alcalóide vincristina; células de leucemia mielóide aguda HL-60; Melanoma B16F10 e linhagem de câncer de próstata PC3. Todas as linhagens foram obtidas do banco de células Americam Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

As linhagens Lucena, K562 e HL60, foram mantidas em cultura em meio RPMI-1640 (Sigma™, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro

fetal bovino (Cultilab™) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina em estufa com 5% de CO_2 a uma temperatura constante de 37°C.

A linhagem de melanoma B16F10 foi mantida em cultura em meio Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e a linhagem de câncer de prostada PC3 foi mantida em meio HAM-F12 (Sigma™, St. Louis, MO), ambas as linhagens foram suplementadas com 10% soro fetal bovino (SFB1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina em estufa com 5% de CO_2 a uma temperatura constante de 37°C.

3.3 Cultura primária de linfócitos

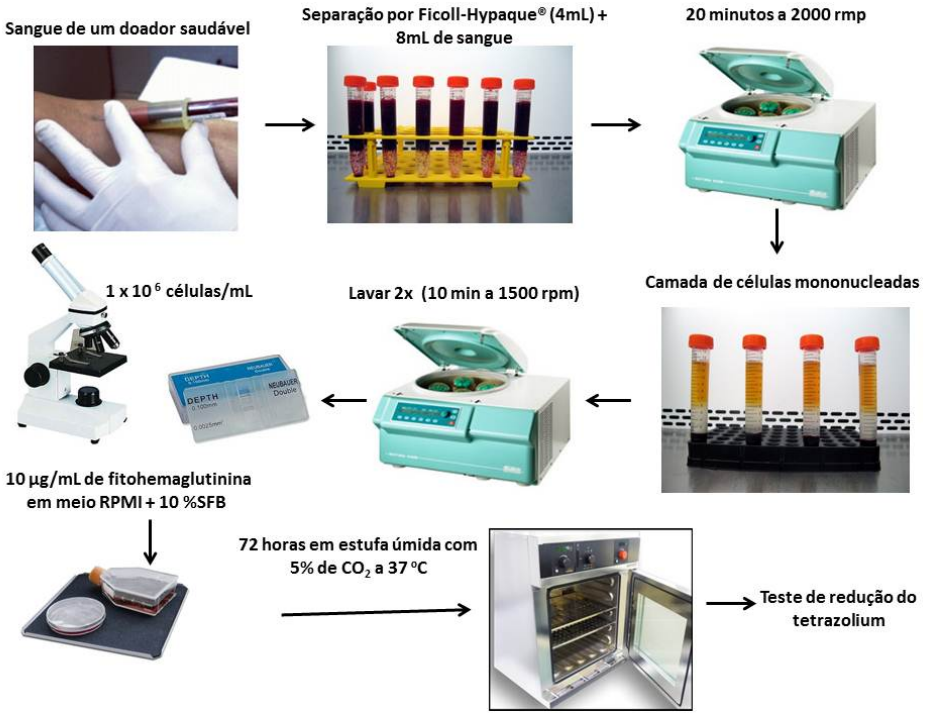
Para avaliação do potencial citotóxico da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* frente a linfócitos coletou-se cerca de 20 mL de sangue de um doador saudável com seringa contendo EDTA a 10%. O sangue foi manipulado em ambiente estéril (Fluxo laminar). Após a coleta o sangue foi diluído em meio RPMI em quantidade suficiente para 40 mL (20mL de sangue + 20 mL de meio RPMI).

3.3.1 Separação dos linfócitos

As células mononucleares foram isoladas pelo método de separação por Ficoll-Hypaque®. Foram então, adicionados a cada tubo graduado (FALCON®, BLUE MAX™, USA), 4 mL de Ficoll-Hypaque® (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur, foram adicionados 8 mL do sangue diluído em meio RPMI preparado anteriormente.

Em seguida cada tubo foi centrifugado por 20 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, a camada de células mononucleadas foi retirada cuidadosamente com pipeta de Pauster e transferidas para tubos para proceder a lavagem (2x) em meio RPMI a 1500 rpm por 10 minutos. O botão celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI e procedeu-se a contagem dos linfócitos em câmara de Newbauer com corante azul de tripano (20 µL céls. + 180 µL do corante). Os linfócitos foram então cultivados em garrafas de 75cm^2 (TPP®, Trasadingen, Suíça), em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para estimulação do crescimento das células foram empregados 10 µg/mL de fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e mantidos por 72 horas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC (Figura 8). Após o cultivo por 72 horas, foram realizados os testes de citotoxicidade pelo método de redução do tetrazolium (MTT). Para fins de comparação foram testados fármacos utilizados na terapêutica para o tratamento de leucemias e tumores sólidos, mesilato de imatinibe e Paclitaxel, respectivamente, nas mesmas concentrações de resina e látex de *Clusia sp* empregadas para realização dos ensaio de citotoxicidade MTT.

Figura 8. Esquema da cultura primária de linfócitos.



3.4 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* em Linfócitos, Células K562, HL60, B16F10, Lucena e PC3

Para a realização dos estudos de citotoxicidade e triagem da possível seletividade foram empregadas as linhagens de cultura primária de linfócitos, K562, melanoma B16F10, câncer de próstata PC3 e Lucena. Foi empregado método de redução do tetrazolium, que avalia a atividade mitocondrial. Para os ensaios envolvendo as linhagens K562, HL60 e cultura primária de linfócitos, as células foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As linhagens, B16F10, Lucena e PC3 foram incubadas nas mesmas condições apenas no tempo de 24 horas.

3.4.1 Avaliação da citotoxicidade das amostras vegetais pelo método de redução do tetrazolium MTT

O princípio do método consiste na absorção do sal {Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]} pelas células viáveis, que o reduzem, no interior da mitocôndria, a um produto denominado formazan, através da enzima succinatodesidrogenase, formando cristais azuis insolúveis. Este produto, acumulado dentro da célula, é solubilizado através da adição de um solvente apropriado. A intensidade da coloração é utilizada para medir a integridade mitocondrial, e, consequentemente, a viabilidade celular (NOGUEIRA, 2008).

As suspensões celulares das linhagens selecionadas para o ensaio de citotoxicidade, ($5x10^5$ células/mL), foram semeadas em placas de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Suíça), 90 µL por poço, e incubadas com 10 µL da resina floral ou látex do fruto de *Clusia sp* em oito diferentes concentrações (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL), em triplicata sendo realizados dois experimentos independentes. Para fins de comparação os fármacos mesilato de Imatinibe e Paclitaxel (Paraxel®) foram testados nas mesmas concentrações estabelecidadas para resina floral e látex do frutos de *Clusia*.

Após o período de incubação estabelecido para cada linhagem em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC, cada poço recebeu 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Loius, MO, USA) a 5mg/mL, e a placa foi novamente incubada por 4 horas. Em seguida, centrifugou-se a placa a 800 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Adicionou-se, então,

100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, RJ, Brasil), em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. Posteriormente, a placa foi submetida a agitação e a concentração dos cristais de formanzan solubilizados foi determinada espectrofotometricamente por meio de leitor de ELISA (Stat Fax 2100, Awareness Technology, Dusseldorf, Germany) em comprimento de onda de 545 nm. A absorbância das células controle (não tratadas) foi considerada como 100% de viabilidade celular.

A citotoxicidade das amostras foi calculada da seguinte forma:

$$\left(\text{Viabilidade} = \frac{\text{Média da absorbância de cada concentração das amostras testadas – Branco}}{\text{Média da absorbância do controle – Média dos brancos}} \right) \times 100\%$$

3.5 Avaliação dos Mecanismos de Morte

3.5.1 Avaliação do Potencial Indutor de Apoptose

A fim de avaliar o possível mecanismo de morte foi escolhida a linhagem k562 para as análises subsequentes. Para avaliação do potencial indutor de apoptose as células ($1x10^6$ células/mL) foram tratadas com resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*, utilizando as concentrações obtidas para IC50 62,2 µg/mL e 31,1 µg/mL, respectivamente, por 24 horas . As células foram mantidas em meio RPMI, suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC. O potencial indutor de morte por apoptose foi avaliado pelas seguintes análises:

* Alterações morfológicas

* Externalização da fosfatidilserina

* Alteração do potencial de membrana mitocondrial

* Produção de espécies reativas de oxigênio

* Autofagia

* Fragmentação do DNA

* Ativição das caspases 3, 8 e 9

* Liberação de citocromo c

* Ativação de Bax e Bcl-2

3.5.2 Análise das alterações morfológicas

Os eventos morfológicos que caracterizam a apoptose são observados em um processo de autodestruição celular que resulta no empacotamento do conteúdo celular em vesículas denominadas de corpos apoptóticos, diminuição do tamanho celular, estrangulamento do citoplasma, formação de vesículas na membrana celular (blebbing), fragmentação do DNA e mudanças na cromatina, tornando-a altamente condensada e adjacente à membrana nuclear, alterações estas que *in vivo* levam a fagocitose destas células danificadas por células especializadas. Em cultivos *in vitro* a célula apoptótica extravassa seu conteúdo tal como ocorre na necrose em decorrência da ausência dessas células responsáveis pela fagocitose (BOLETI et. al., 2008).

A investigação da apoptose pela análise da morfologia celular foi realizada por microscopia óptica e de fluorescência, através dos corantes giemsa e Hoechst 33342.

3.5.2.1 Morfologia celular com corante de Giemsa

3.5.2.2 Preparo da solução de Giemsa

O corante de Giemsa (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA), foi preparado em glicerina P.A (Vetec®, RJ, Brasil), e, após homogeneização, foi deixado em banho de ultrassom por 30 minutos. Esta solução foi mantida em repouso, em temperatura ambiente por 3 dias. Após este período, acrescentou-se metanol P.A (Vetec®, RJ, Brasil) e filtrou-se a solução utilizando gaze. Ao final, o corante foi deixado em repouso por uma semana antes da sua utilização.

3.5.2.3 Preparo das lâminas para coloração com Giemsa

As células ($5x10^5$ células/mL), foram incubadas em placas com o valor de IC_{50} obtido no teste de redução do MTT, por 24 horas, em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC. Após a incubação foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm para cada lâmina (citospin).

3.5.2.4 Coloração das lâminas com Giemsa

As lâminas foram distribuídas em suporte e fixadas em metanol por 5 minutos. Após a evaporação do metanol, as lâminas receberam a solução de Giemsa por 2 minutos, sendo, em seguida, lavadas em água corrente. Após a secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (DM 2000, Leica microsystems, Bannockburn, USA) e fotografadas com câmera Canon powershot S80 acoplada à objetiva de 100 x.

3.5.3 Morfologia nuclear com corante Hoechst 33342

3.5.3.1Preparo da solução de Hoechst 33342

O corante Hoechst 33342 (Invitrogen®, Eugene, OR, USA) foi solubilizado em PBS na concentração final de 10 µg/mL e estocado a - 20°C até o momento da coloração.

3.5.3.2 Coloração das lâminas com Hoechst 33342

Após o citospin, as lâminas nas concentrações já mencionadas foram fixadas em metanol por 5 minutos, lavadas com PBS-T20 por duas vezes e incubadas com 100 µL da solução de Hoechst 33342 a 10 µg/mL, por 20 minutos, no escuro. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS. O excesso de PBS foi retirado com papel absorvente, adicionou-se lamínula e as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de

fluorescência (DMI 4000 B, Leica microsystems, Bannockburn, USA), utilizando-se o programa LAS-AF, filtro A4, cor azul.

3.5.4 Citometria de fluxo

Para os experimentos utilizando citometria de fluxo, as amostras foram analisadas pelo citômetro FACSCanto II (Becton Dicknson™, San Jose, CA, USA) e Software BD FACSDiva versão 6.0 .(Becton Dickinson™, San Jose, CA, USA). As populações de células foram identificadas através de suas características de reflexão de luz e analisadas pela intensidade do sinal fluorescente da sonda utilizada. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

3.5.4.1 Análise da externalização da fosfatidilserina (FS)

A fostatidilserina é um fosfolipídio presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como sinal para as células serem removidas. A Anexina V é uma molécula com alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a esta especificamente.

A externalização da fosfatidilserina foi analisada através da marcação com Anexina V-FITC/IP. As células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após o período de incubação foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com tampão

1x (50 mM Tris, pH7,4, 100 mM NaCl, 1% BSA, 0,02% azida sódica). Em seguida marcadas com 5 µL de Anexina V (Anexin V Apoptosis Detection Kit FITC, eBioscience®) e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O material foi então lavado com tampão e marcado com 5 µL iodeto de propídio (eBioscience®). A intensidade de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados foram apresentados em gráficos representando a intensidade de fluorescência da anexina V-FITC (FITC) *versus* a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (PI).

3.5.4.2 Alteração do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm)

O ΔΨm foi medido pela incorporação do corante fluorescente rodamina 123. A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Trata-se de um fluorocromo catiônico que é atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações ao nível da integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol (JOHNSON; WALSH; CHEN,1980).

As células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após o período de incubação, as células foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos e lavadas com tampão fosfato-salino (PBS). Em seguida foram expostas a 1 µg/mL de rodamina 123 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) a 37 ºC em estufa por 30 minutos.

Após este período, as amostras foram lavadas com 4 mL PBS e ressuspendidas com 300 µL do mesmo tampão e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson).

3.5.4.3 Produção de espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é responsável pelo estresse oxidativo intracelular, fator relevante na indução de morte celular via apoptose. A produção de EROs intracelular foi determinada pela 2'7-diclorofluoresceína diacetato (DCHF-DA) que incorporada pelas células é hidrolisada por esterases citosólicas no composto hidrofílico DCFH. Tal composto reage rapidamente com peróxido (H_2O_2) na presença de peroxidases, citocromo c ou Fe^{++}, dando origem a diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente e apolar o que dificulta sua difusão para fora da célula (KESTON e BRANDT, 1965).

As células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1 e em seguida centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS e expostas a 10 µM de DCHF-DA (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foram lavadas com 4 mL PBS, ressuspendidas com 300 µL de PBS e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson).

3.5.4.4 Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp* sobre a progressão do ciclo celular

Para a determinação das fases do ciclo celular as células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1 e após incubação as células foram lavadas 2x com 1 mL de PBS gelado e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O botão celular foi ressuspendido por gotejamento com 1 mL de solução fixadora (etanol a 70% gelado, anteriormente preparada), e incubadas a 4 °C por 24 horas. As células foram lavadas em PBS gelado e ressuspendidas com 1 mL de solução contendo 200 µg/mL de RNAse A (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e 50 µg/mL de IP, incubadas a 4 °C, protegidas de luz por 1 hora. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson).

3.5.4.5 Avaliação do potencial indutor de autofagia

A partir da propriedade do mecanismo autofágico formar autofagossomos maduros e autofagolisossomos como organelas ácidas, é possível utilizar o corante fluorogênico acidotrópico Laranja de Acridina para marcar especificamente esses ambientes celulares. O composto laranja de acridina cora o citoplasma e núcleo celular com fluorescência verde e, quando em ambiente ácido, sofre modificações físico-químicas passando a emitir a fluorescência vermelha que pode ser detectada por citometria.

Para verificação de autofagia, as células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após incubação as células foram lavadas em tampão PBS e ressuspendidas em 300 µL de PBS contendo 1 µM/mL do corante Laranja de Acridina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas com PBS e procedida análise por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson).

3.5.4.6 Fragmentação do DNA

O princípio da técnica basea-se no rompimento das células pelo tampão de lise, expondo os núcleos. O iodeto de propídio liga-se ao DNA, e as células contento núcleos íntegros emitem alta fluorescência. A condensação da cromatina e a fragmentação do DNA são observados pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência, decorrente da menor marcação do DNA com o iodeto de propídio devido à condensação da cromatina. Além disso fragmentos menores de DNA que captam menos iodeto de propídio, emitindo menor fluorescência.

Para determinação da fragmentação do DNA as células k562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após o período de tratamento foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS. Em seguida foram ressuspensas em tampão de lise contendo iodeto de propídio (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 2 µg/mL de iodeto de propídio). Os tubos foram agitados e procederam-se as analises por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson).

3.5.4.7 Determinação da ativação das caspases 3, 8 e 9

Para verificação da ativação das caspases 3, 8 e 9, as células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Em seguida foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS. Posteriormente foram incubadas com 250 µL de solução de fixação e permeabilização (BD, Cytofix/Cytoperm^{TM}) por 20 minutos a 4 ^{0}C. Decorrido o tempo de permeabilização as células foram lavadas com PBS-Tween20, ressuspendidas em 50 µL de PBS e marcadas com 5µL a 1µg dos anticorpos para caspase 3, 8 e 9 conjugados a FITC (BD Pharmingen, USA), separadamente, por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente o material foi lavado com PBS e ressuspendido em 300 µL de PBS. A porcentagem de células com caspase 3, 8 e 9 ativas foi determinada por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson), em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência

3.5.4.8 Liberação do citocromo c

Para verificação da liberação de citocromo c no citosol, as células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após o período de tratamento foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS. Posteriormente foram incubacas com 250 µL de solução de fixação e permeabilização (BD, Cytofix/Cytoperm^{TM}) por 20 minutos a 4 ^{0}C. Decorrido o tempo de permeabilização as células foram

lavadas com PBS-Tween20, ressuspensas em 50 µL de PBS e marcadas com 5µL a 1µg com os anticorpo para citocromo c conjugado a PI (eBioscience®), por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente foram lavadas com PBS e ressuspensas em 300 µL de PBS. A porcentagem de liberação do citocromo c foi determinada por citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson), em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

3.5.4.9 Pesquisa da ativação de Bax e Bcl2

Para verificação da ativação de Bax e Blc-2, As células K562 foram tratadas conforme seção 3.5.1. Após o período de tratamento foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS. Posteriormente foram incubadas com 250 µL de solução de fixação e permeabilização (BD, Cytofix/Cytoperm™) por 20 minutos a 4 ^{0}C. Decorrido o tempo de permeabilização as células foram lavadas com PBS-Tween20, ressuspensas em 50 µL de PBS e marcadas com 5µL a 1 µg com os anticorpo para bax conjugado a FITC (Bioscience®) e anticorpo para Bcl-2 (Santa Cruz, Biotechnology), ambos por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente foram lavadas com PBS e ressuspensas em 300 µL de PBS. A porcentagem de ativação de bax e bcl-se foi determinada citometria de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson), em histogramas que representam o número de eventos em função da fluorescência.

3.6 Análise da sobrevida após inoculação de tumor

3.6.1 Animais

Para o desenvolvimento e coleta do tumor ascítico de Ehrlich foram utilizados camundongos machos Swiss provenientes do Biotério da Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO), com idade de 6 a 9 semanas e peso médio de 20 gramas no início do teste.

3.6.2 Aclimatação dos animais

Os animais foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas individuais de polipropileno (42 x 34 x l7 cm), com tampa-grade, em sala climatizada sob temperatura constante 23 ±2 ^{o}C, com ciclo claro/escuro de 12 horas por 5 dias. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e adequada às necessidades de camundongos (Labina®- Purina) e água fornecida *ad libitum*. Uma estimativa destas necessidades pode ser encontrada no Nutrient Requirements of Laboratory Animals da National Academy of Sciences,dos Estados Unidos. Após a aclimatação, os animais foram divididos em grupos e submetidos ao tratamento.

3.6.3 Obtenção e preparo das células do tumor ascítico de Ehrlich para realização da curva de sobrevida

As células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foram mantidas nas dependências do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da

Faculdade de Farmácia/UFG através de sucessivas passagens entre animais, pela via intraperitoneal (IP). Na cavidade peritoneal estas células crescem de forma ascítica. Para o desenvolvimento do TAE, camundongos Swiss machos saudáveis foram inoculados, via IP, com 0,2 mL de uma suspensão de $1x10^7$ células/mL. Para obtenção da suspensão de células utilizadas nos ensaios, os camundongos, portadores de tumores foram anestesiados subcutaneamente com 10 mg/kg de Xilazina (Syntec, Cotia-SP, Brasil) e 100 mg/kg de Cetamina (Agener, Embu-Guaçu-SP, Brasil), sacrificados por deslocamento cervical e o líquido ascítico colhido com seringa estéril.

Uma alíquota (20µL) do líquido ascítico foi diluída em azul de tripano (180 µL), para contagem das células viáveis, em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. De acordo com número de células contadas, foi realizada uma diluição do líquido ascítico em PBS a fim de se obter 1×10^7 células viáveis/mL, para a inoculação nos animais em experimentação (BINCOLETTO et al., 2005; DONGRE et al., 2007; ORSOLIC; BASIC, 2005; QUEIROZ et al., 2004; VALADARES; QUEIROZ, 2002).

3.6.4 Tratamento dos animais para a curva de sobrevida

Para a realização dos ensaios de avaliação da sobrevida, os animais foram divididos em sete grupos, cada grupo contendo 10 animais. Os camundongos foram submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo descrito abaixo. Os ensaios *in vivo* foram realizados de acordo com os

princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Grupo 1 - Animais portadores de TAE e sem tratamento, inoculados com o veículo empregado na diluição das amostras (0,5% de DMSO e óleo de girassol).

Grupo 2 - Animais portadores de TAE e tratados com látex do fruto de *Clusia* 125 mg/kg por dia.

Grupo 3 - Animais portadores de TAE e tratados com látex do fruto de *Clusia* 250 mg/kg por dia.

Grupo 4 - Animais portadores de TAE e tratados com látex do fruto de *Clusia* 500 mg/kg por dia.

Grupo 5 - Animais portadores de TAE e tratados com resina floral de *Clusia* 125 mg/kg por dia.

Grupo 6 - Animais portadores de TAE e tratados com resina floral de *Clusia* 250 mg/kg por dia.

Grupo 7 - Animais portadores de TAE e tratados com resina floral de *Clusia* 500 mg/kg por dia.

Todos os animais foram inoculados, pela via intraperitoneal, com volume de 0,2 mL da suspenção de células tumorais ($1x10^7$ células/mL). O dia da inoculação foi considerado dia zero (D_0). O tratamento dos animais iniciou-se 24 horas após a inoculação do TAE, administrando-se 0,2 mL da resina floral ou látex de *Clusia* durante 10 dias consecutivos, pela via intraperitoneal. Os animais do grupo controle receberam apenas os veículos, no mesmo volume administrado aos animais tratados.

3.7 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* em células 3T3 pelo método de captura do vermelho neutro

Para realização do teste de vermelho neutro foi utilizada a linhagem de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3-A31 recomendada pela ICCVAM (ICCVAM, 2001; 2006). A linhagem foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade da São Paulo, São Paulo. Trata-se de uma linhagem aderente amplamente utilizada em testes toxicológicos e foi desenvolvida em 1963 por George Todaro e Howard Green pesquisadores do departamento de patologia da New York University School of Medicine - New York e recebeu o nome BALB/c 3T3 por ter sido obtida de camundongos da linhagem BALB/c e 3T3, imortalizada por sucessivas transferências durante 3 dias na concentração de $3x10^5$ (***3***-: 3 dias; ***T***-: transfer; ***3***-: $3x10^5$ densidade celular) (TODARO e HOWARD, 1963; VIEIRA et al., 2011).

As células foram cultivadas em monocamada em garrafas próprias para cultivo celular / $75cm^2$ (TPP®, Trasadingen, Suíça) com meio de cultura Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM glutamina.

A remoção das células das garrafas de cultura foi feita por intermédio de desagregação química (tripsinisação) com confluência entre 50 e 80%. O meio foi removido e as células foram lavadas com 15 mL de tampão fosfato-salino (PBS) para a remoção do SFB para a atuação da solução de tripsina/EDTA diluídos em PBS (0,0025%;0,02%, respectivamente), uma vez

que o SFB inativa a ação desta solução. A solução de lavagem foi descartada e foram então adicionados 3 mL da solução de tripsina/EDTA por aproximadamente 30 segundos para a desagregação das células da garrafa de cultura. O excesso de tripsina/EDTA foi descartado e a garrafa foi cuidadosamente agitada para a total desagregação das células.

Após a tripisinisaçao das células foi adicionado 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB para a inativação da tripsina/EDTA. Uma aliquota de 20 µL foi retirada para a contagem visual em câmara de Newbauer pela técnica de exclusão do corante azul de tripano para verificar a viabilidade das mesmas (Figura 9).

Figura 9. Esquema de plaqueamento das células 3T3-A31 para realização do procedimento de citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro.

Suspensão de células na concentração de $3x10^4$ células/mL em DMEM suplementado com 10% de SBF foi preparada e 100 µL desta foram acrescentados em cada poço da placa de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Suíça), com exceção dos poços da periferia que receberam apenas 100 µL de DMEM suplementado com 10% de SBF (sem células).

3.7.1 Exposição da resina flora e látex de *Clusia sp* às células 3T3

As amostras das substâncias-teste foram diluídas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sem soro fetal bovino. A resina floral e o látex foram testados em oito concentrações (C1 – C8) em diluições seriadas (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). Após o período de 24 horas de crescimento das células, o meio de cultura foi retirado por inversão da placa em ambiente estéril (fluxo laminar). Imediatamente foram adicionados 50 µL de DMEM suplementado com 10% de SFB em todos os poços. Em seguida 50 µL das amostras (resina floral e látex do fruto) foram adicionadas, incluindo os poços brancos, perfazendo um volume final em cada poço de 100 µL. O teste foi realizado em sextuplicata para cada concentração, sendo o controle negativo, apenas células e meio suplementado com SFB10%.

A exposição da resina e látex de *Clusia sp* às células foi feita sempre da menor concentração (C1) para a maior (C8). As células foram expostas às substâncias e incubadas por 48 horas em ambiente controlado em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC.

3.7.2 Teste de citotoxicidade baseado na captação do corante vermelho neutro

O teste de captação do corante vermelho neutro é um procedimento de avaliação da sobrevivência e viabilidade celular e foi realizado de acordo com o protocolo Borenfreund e Puerner (1984) modificado pelo NICEATM durante a validação do experimento (ICCVAM, 2001; 2006). Após o período de exposição das células 3T3 à resina floral e látex do fruto de *Clusia,* as soluções foram removidas por inversão da placa e as células foram lavadas com 250 µL de PBS/poço. Em seguida foram adicionados 250 µl de uma solução a 25 µg/mL de meio vermelho neutro em todos os poços, incluindo brancos e incubados por 3 horas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC.

Após 3 horas de exposição ao corante vermelho neutro o meio foi removido dos poços por inversão e as células foram lavadas com 250 µL de PBS pré-aquecido. O PBS foi então removido por inversão da placa e foram adicionados 100 µl de solução de extração do vermelho neutro (1% ácido acético: 50% EtOH : 49% H_2O deionizada) em todos os poços, incluindo os brancos. As placas passaram por agitação mecânica por no mínimo 20 minutos em equipamento apropriado para a obtenção de uma solução homogênea e analisadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 550 nm.

A viabilidade celular foi medida a partir do controle e os brancos foram usados como referência para descontar a absorção de luz do material da placa e da solução de fixação, ficando assim a análise apenas do corante captado pelas células viáveis.

A técnica do corante vermelho neutro é baseada na habilidade das células viáveis de incorporar e se ligar ao corante. Este é um tipo de corante catiônico fraco com capacidade de ultrapassar as membranas plasmáticas por difusão passiva e se acumular nos lisossomos se ligando aos sítios aniônicos na matriz lisossomal. Alterações na membrana plasmática e/ou na membrana dos lisossomos por ação de xenobióticos resultam na diminuição da captação e ligação do vermelho neutro aos sítios aniônicos lisossomais. Sendo assim, é possível a distinção entre células viáveis e não viáveis.

3.8 Avaliação do potencial hemolítico da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*

Para avaliação do potencial hemolítico da resina e látex de *Clusia sp* coletou-se o sangue de um doador saudável com seringa contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10%. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por duas vezes em solução salina (NaCl a 0,85% e $CaCl_2$ a 10 nM). A partir da papa de hemáceas, foi preparada uma solução a 2% em solução salina para o ensaio.

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), sendo cada coluna preparada conforme a seguir:

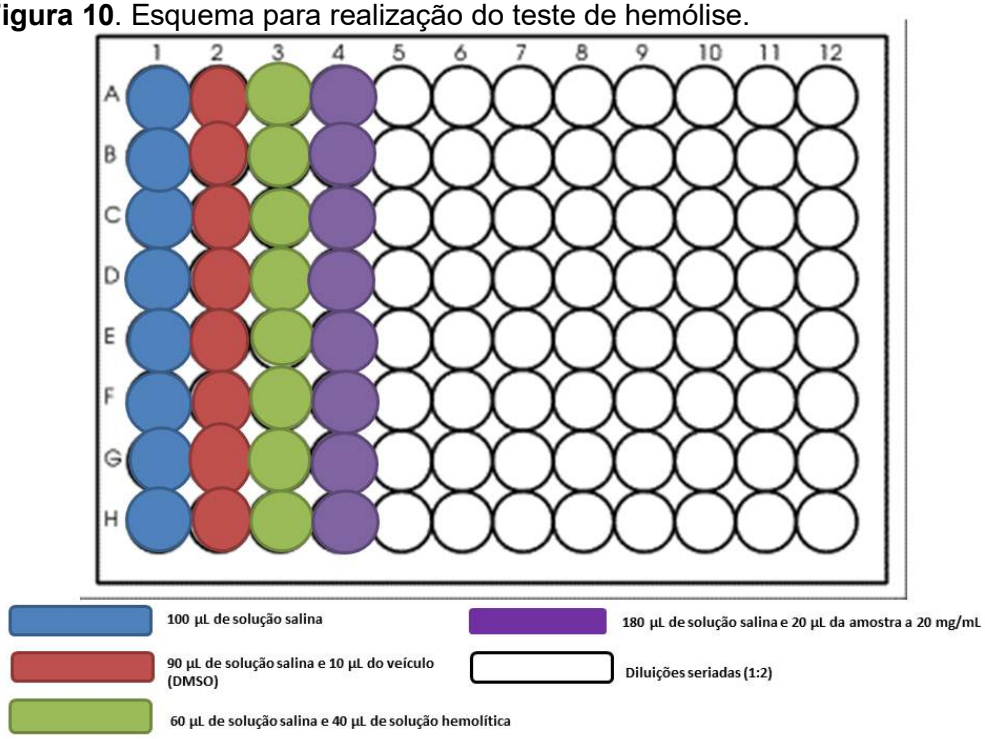
- Coluna 1 (controle negativo): 100 µL de solução salina;
- Coluna 2 (controle do veículo): 90 µL de solução salina e 10 µL do veículo (DMSO), na concentração usada para a solubilização das amostras;

- Coluna 3 (controle positivo): 60 µL de solução salina e 40 µL de solução hemolítica (Triton X-100 - Vetec, RJ, Brasil – a 0,5%);

- Coluna 4 (resina floral ou látex do fruto de *Clusia sp* a 2000 µg/mL): 180 µL de solução salina e 20 µL da amostra a 20 mg/mL;

- Colunas 5 a 12: Diluições seriadas (1:2) a partir da coluna 4 (foram retirados 100 µL da coluna 4 e repassados seriadamente até a coluna 11 (contendo 100 µL de salina para efetuar a diluição), totalizando oito diluições (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/ mL, respectivamente). A coluna 11 teve 100 µL descartados, ao final, de cada poço, Figura 10.

Figura 10. Esquema para realização do teste de hemólise.



Após a preparação da placa conforme descrito acima, todos os poços das linhas B a G e de 1 a 11 receberam 100 µL da solução de hemáceas a 2%. Os poços das linhas A e H não receberam a solução de hemáceas, sendo considerados brancos. Em seguida, a placa foi incubada por 1h sob

agitação constante de 300 rpm em shaker Orbit P4 (Labnet, NJ, USA) à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outra placa de 96 poços e a leitura foi realizada a partir do sobrenadante em espectrofotômetro de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Redwood, CA, USA) a 540 nm.

O percentual de hemólise de cada concentração foi calculado pela fórmula:

$$\left(\frac{\text{Média de cada concentração} - \text{Média dos brancos de cada concentração} - \text{Média do controle negativo}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média dos brancos} - \text{Média do controle negativo}} \right) \times 100\%$$

3.9 Avaliação da mielossupressão em cultura Clonal

3.9.1 Preparação das células para a cultura clonal

A cultura clonal foi realizada utilizando células da medula óssea do fêmur de camundongos Swiss machos e saudáveis. Os animais foram anestesiados subcutaneamente com 10 mg/kg de Xilazina (Syntec, Cotia-SP, Brasil) e 100 mg/kg de Cetamina (Agener, Embu-Guaçu-SP, Brasil) e, após a constatação da ausência de reflexos da pata, foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram o fêmur exposto e removido nas extremidades distal, por deslocamento da cartilagem, e proximal por corte dos ligamentos.

A medula óssea foi transferida, com auxílio de agulha e seringa estéries para um tubo contendo meio RPMI, centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI. O número de células na suspensão foi contado em câmara de Neubauer, após diluição 1:10 em corante azul de tripano.

3.9.2 Preparação do meio semi-sólido e plaqueamento da cultura clonal

O meio de cultura foi preparado empregando-se 30% de DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 20% de SFB e 50% de ágar (bactoágar, BD, NJ, USA). Ao meio, na temperatura de 37 ^{o}C, foi acrecentada uma suspenção celular ($1x10^5$ células/mL), e 2 mL dessa suspensção anterior foi transferida para placas de 35 x 10 mm (Corning, NY, USA), após o acréscimo de 100 µL de fator de crescimento GM-CSF-M (Sigma-Aldrich, St, MO, USA), que promove a diferenciação de progenitores de medula óssea. O conteúdo das placas foi homogeneizado através de movimentos giratórios. As placas foram incubadas por sete dias a 37 ^{o}C, em estufa úmida com 5% de CO_2.

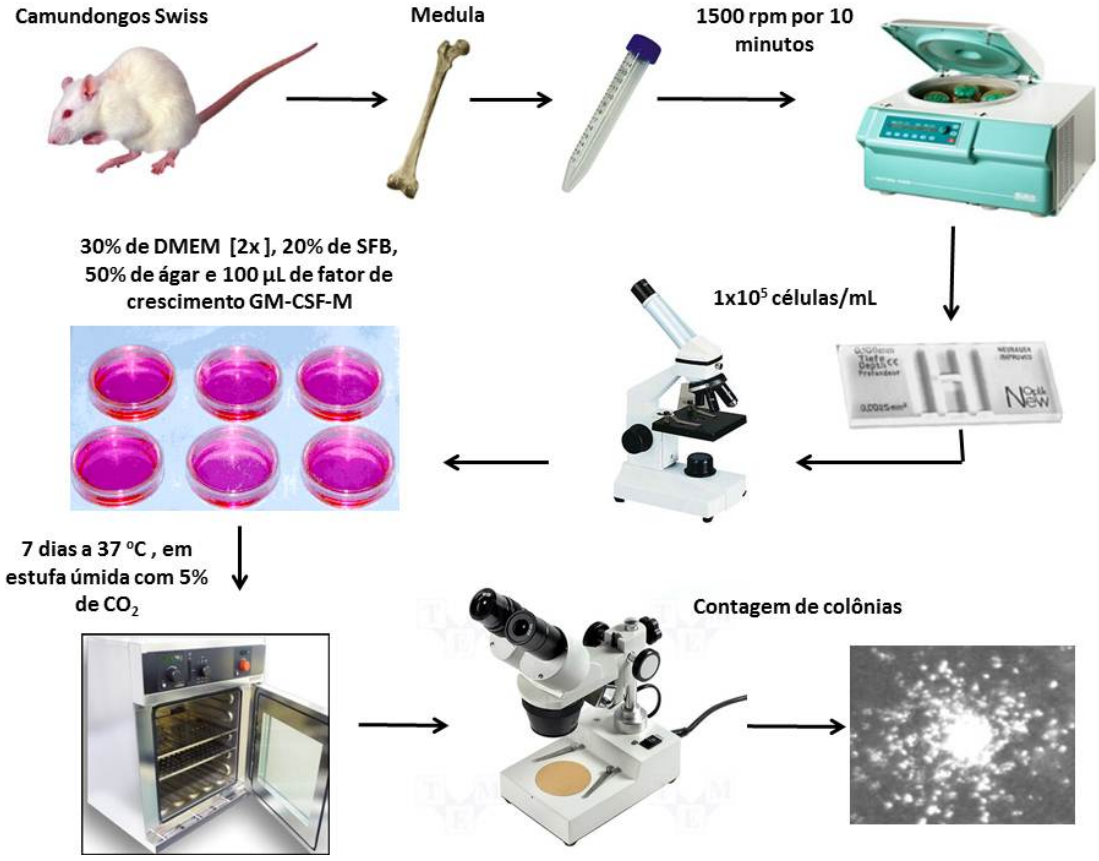
3.9.3 Efeito direto da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp* sobre progenitores hematopoiéticos granulócitos e macrófagos

Cada placa contendo o meio com ágar e as células de medula óssea recebeu 200 µL da solução-uso de resina ou látex de *Clusia sp* nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/ mL,

respectivamente, em triplicata. Foram preparadas placas controle, não tratadas.

A contagem de colônias foi realizada em microscópio de dissecção (Leica, Wetzlar, Germany), com aumento de 40x, Figura 11.

Figura 11. Esquema de plaqueamento das células da medula óssea para verificação do efeito da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp* sobre os progenitores hematopoiéticos.



3.10 Análise da expressão gênica de caspase-8 por Reação em Cadeia da Polimerase a partir da transcrição reversa (RT-PCR)

3.10.1 Tratamento

As células da linhagem eritroleucêmica humana K562 ($1x10^6$ células/mL) foram tratadas com 50% do valor da concentração de IC_{50} obtida no teste de citotoxicidade MTT, por 24 horas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37 ºC. Foi preparado um grupo controle (sem tratamento) para fins de comparação.

3.10.2 Extração do RNA total

O RNA das células foi isolado utilizando Trizol® (Life Technologies, USA). O Trizol® é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinki e Sacchi (1987). Após o tratamento com as amostras as células K562 foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e transferidas para microtubo tipo Eppendorf de 2 mL . Em seguida as células, foram tratadas com 0,75 mL de Trizol® para cada 0,25 mL de “pellet celular” (5-$10x10^6$ células). Procedeu-se a lise celular agitando-se constantemente. Em seguida foi realizada a separação das fases. As amostras celulares foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a dissociação completa do complexo nucleoproteíco.

Posteriormente foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por 1 mL de Trizol® usado. Os microtubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 ºC (RNA fica retido na fase aquosa). A fase aquosa das amostras foi removida e transferida para um novo microtubo e procedido o isolamento do RNA. Para a precipitação do RNA foram adicionados 0,5 mL de isopropanol 100% à fase aquosa por 1 mL de Trizol® empregado. As amostras foram então, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 ºC (o RNA forma um "pellet" no fundo do tubo).

Para a lavagem do RNA o sobrenadante foi removido deixando apenas o "pellet de RNA". O RNA foi lavado utilizando 1 mL de etanol 70% por 1 mL de Trizol® empregado. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 ºC. Novamente o sobrenadante foi descartado. O RNA isolado foi seco por 5 a 10 minutos e em seguida procedida sua ressuspensão utilizando água RNAse-free (o volume empregado na ressuspensão foi baseado no tamanho do "pellet de DNA"). Após a ressuspensão as amostras de RNA isolados foram incubados a 55-60 ºC por 15 minutos e estocados a -70 ºC.

3.10.3 Quantificação do RNA e avaliação da qualidade do RNA

A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectofotômetro

com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A integridade do RNA após a extração foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), visando observar possíveis contaminações por DNA, degradações e a relação entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S empregando para fins de comparação na eletroforese o RNA LADDER 1kB, Buffer 1x (Riboready™) Anexo 2.1.

3.10.4 Tratamento do RNA total com DNAse

O tratamento do RNA com DNAse tem por finalidade eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genônimo. Para tal, o RNA total das células foi tratado com DNAse livre de RNAse conforme kit QuantiTEct® Reverse Transcription (QUIAGEN®). Para cada 1 µg de amostra de RNA foram empregados 2 µL de gDNA Wipeout Buffer 7x (QUIAGEN®) e volume final da reação ajustado para 14 µL com água RNAse-free. A amostra foi incubada por 2 minutos a 42 °C, e imediatamente resfriada em gelo.

3.10.5 Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 1 µg de RNA e tratadas com DNAse foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação de volume final de 20 µL. A reação foi iniciada adicionando aos 14 µL da reação anterior (1 µg de RNA tratado), 1 µL de Reverse-transcription master mix (Quantiscript Reverse Transcriptase) (QUIAGEN®), 4 µL de Quantiscript RT Buffer 5x(QUIAGEN®), 1 µL de RT Primer Mix (QUIAGEN®). A mistura foi incubada por 15 minutos a 42 ºC, e em seguida foram imediatamente incubadas por 3 minutos a 95 ºC para inativar a transcriptase reversa. O cDNA foi armazenado a -20 ºC.

3.10.6 Padronização dos genes ß-actina, e Caspase 8 pela técnica de reação de cadeia em tempo real, após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)

A RT-qPCR consiste na determinação da quantidade de um produto amplificado a cada ciclo de PCR. São utilizados agentes fluorescentes para identificar o sinal, e o resultado obtido na fase exponencial da reação é extrapolado, de modo a se obter a quantidade de amostra. Entre as variações da técnica disponíveis, optou-se pela utilização do corante Rotor-Gene ™ SYBR Green® PCR kit (QUIAGEM).

Para a padronização e quantificação do conteúdo de mRNA (RNA mensageiro), foram empregados *primers* construídos pela IDT® (Integrated DNA Technologies, San Diego, USA), Tabela 2. Como normalizador do PCR, foi utilizado o gene que codifica a ß-actina (Actb).

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)

Primer	**Sequência *forward***	**Sequência *reverse***
ß-Actina	CCCAGGCATTGCTGACAGG	GCTGGAAGGTGGACAGTGAG
Caspase 8	5´ GAAAAGCAAACCTCGGGGATAC 3´	´5´CCAAGTGTGTTCCATTCCTGTC3'

Para cada gene em estudo foi realizada a curva de padronização, através da qual foram calculados os valores (em ng) das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR realizadas em duplicatas a partir de diluições seriadas (puro, 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} e 10^{-4}) de uma mistura de 1 µg de cDNA (1:1) de células K562 tratadas e não tratadas com com a resina floral e látex do fruto de *Clusia.* Foram utilizados pelo menos 4 pontos para a construção das curvas-padrão, que obtiveram uma eficiência superior a 90%. Somente foram consideradas curvas-padrão satisfatórias para referência aquelas com *slope* entre 3,1 e 3,9 (idealmente 3,3). As Curvas de Padronização e melt dos genes empregados encontram-se no anexo 2.2 e 2.3.

3.10.7 PCR em Tempo Real

Os experimentos para análise de expressão gênica foram realizados no equipamento Rotor-Gene Q, utilizando o kit Rotor-Gene ™ SYBR Green® PCR (QUIAGEM). Antes da realização dos experimentos foram testadas 3 diferentes diluições (100 nM, 200 nM e 400 nM) dos *primers*, a fim de se obter a melhor concentração a ser utilizada na reação. A reação de PCR foi padronizada em estudo-piloto para definição das melhores condições de

desnaturação, anelamento e amplificação. Para cada reação foram empregados 2 µL de cDNA (puro), 1,25 µL de cada primer em estudo a 100 nM (Foward e Reverse), 12,5 µL PCR Master Mix 2x Rotor-Gene SYBR Green e 8 µL de água RNAse-free, totalizando um volume final de reação de 25 µL. As reações foram realizadas em duplicata. O valor de 0,3067 de *threshold* obtido pelo gene de referência ß-actina foi utilizado para todos os outros genes em estudo.

Os tubos apropriados para PCR contendo as amostras foram submetidos a 40 ciclos nas seguintes condições: Desnaturação por 5 segundos em temperatura de 95 ^{0}C seguida de anelamento e extensão por 10 segundos a 60 ^{0}C. Ativação inicial no tempo de 5 minutos a temperatura de 95 ^{0}C para a termo-ativação da HotStarTaq Plus DNA polimerase.

3.11 Análise Estatística

Os dados resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa Graph Pad Prism (versão 5.00 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, USA). A avaliação da citotoxicidade foi realizada em dois experimentos independentes e em triplicada. Os resultados foram transformados em porcentagem em relação ao controle e o IC50 foi obtido por análise de regressão não-linear. A comparação entre as diferentes amostras foi realizada por análise de variância (one-way ANOVA) e teste a posteriori de Tukey para comparação de médias. Os demais ensaios foram analisados por teste t student. As médias foram consideradas

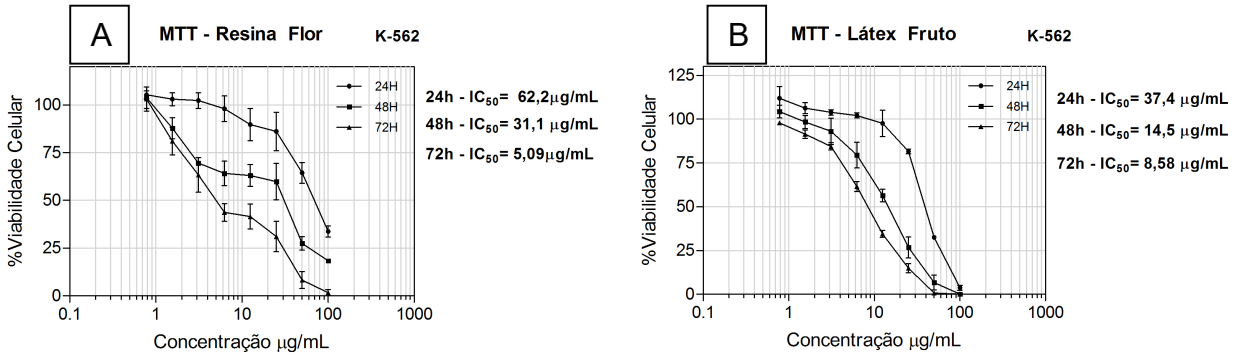
estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados graficamente em médias ± desvio padrão.

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp,* Imatinibe e Paclitaxel em Células K562

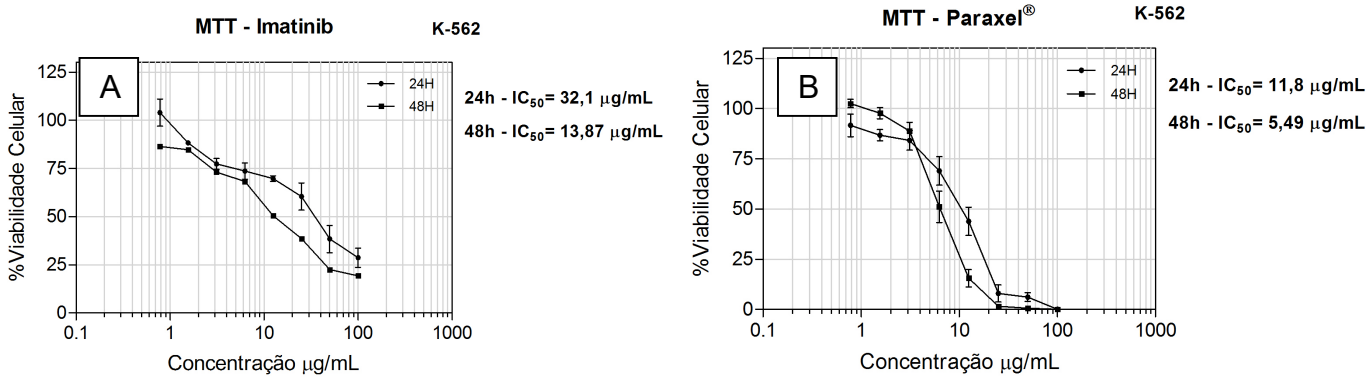
A avaliação da viabilidade em células K562 tratadas com as diferentes concentrações (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) de resina floral ou látex dos frutos de *Clusia sp* pelo ensaio de redução do MTT apresentou significativa atividade citotóxica de maneira concentração tempo-dependente. Os valores de IC50 obtidos a partir de regressão não-linear são apresentados na Figura 14. Pela curva obtida é possível observar que o látex apresentou efeito citotóxico mais potente quando comparado à resina floral e essa diferença foi estatisticamente significante com $p < 0,05$. Os valores de IC50 para a resina nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram de 62,2; 31,1 e 5,09 µg/mL e para o látex de 37,4; 14,5 e 8,58 µg/mL, respectivamente.

Figura 12. Efeito citotóxico após tratamento com a resina (A) e látex (B) de *Clusia* nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sobre a viabilidade das células k562 ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.



Para fins de comparação e no intuito de verificar potência foram avaliados os efeitos citotóxicos de dois fármacos empregados na terapêutica do câncer, o Imatinibe e o Paclitaxel (Paraxel®). Ambos os fármacos foram empregados nas mesmas condições e concentrações propostas para a resina floral e látex do fruto de *Clusia* sp. Os valores de IC50 obtidos para o Imatinibe nos tempos de 24 e 48 horas foram de 32,1 e 13,87 µg/mL e paclitaxel nos mesmos tempos de 11,8 e 5,49 µg/mL respectivamente (Figura 13).

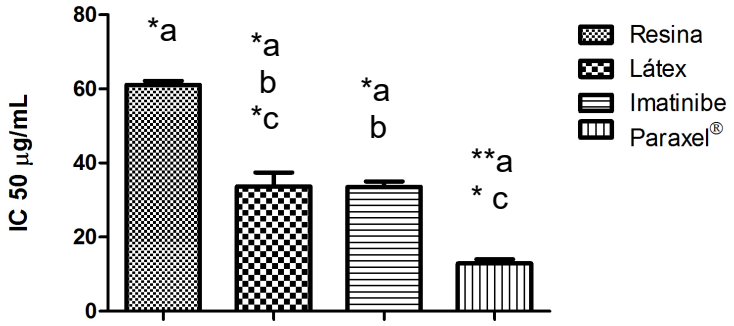
Figura 13. Efeito citotóxico frente às células K562 ($5x10^5$ células/mL). (A) tratamento em 24 e 48 horas com Imatinibe e (B) tratamento em 24 e 48 horas com Paraxel®. Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.



A partir dos resultados de IC 50 no tempo de 24 horas obtidos para as amostras testadas nas células K562 foi possível verificar que houve diferença estatística entre elas com exceção entre o látex e mesilato de imatinibe. Tal resultado é interessante, pois infere que o látex apresenta potência equivalente a um fármaco já empregado para o tratamento da leucemia mielóide crônica, Figura 14.

Figura 14. Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*, Imatinibe e Paraxel®. **A**. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras analisadas no teste de redução do MTT no tempo de 24 horas na linhagem k562 ($5x10^5$ células/mL). **B**. A tabela apresenta os valores de IC50 obtidos pelo teste de redução do MTT frente às células K562.

A



B

Amostras	IC50 24 horas
Resina Floral	62,2 µg/mL
Látex do Fruto	37,4 µg/mL
Imatinibe	32,1 µg/mL
Paraxel®	11,8 µg/mL

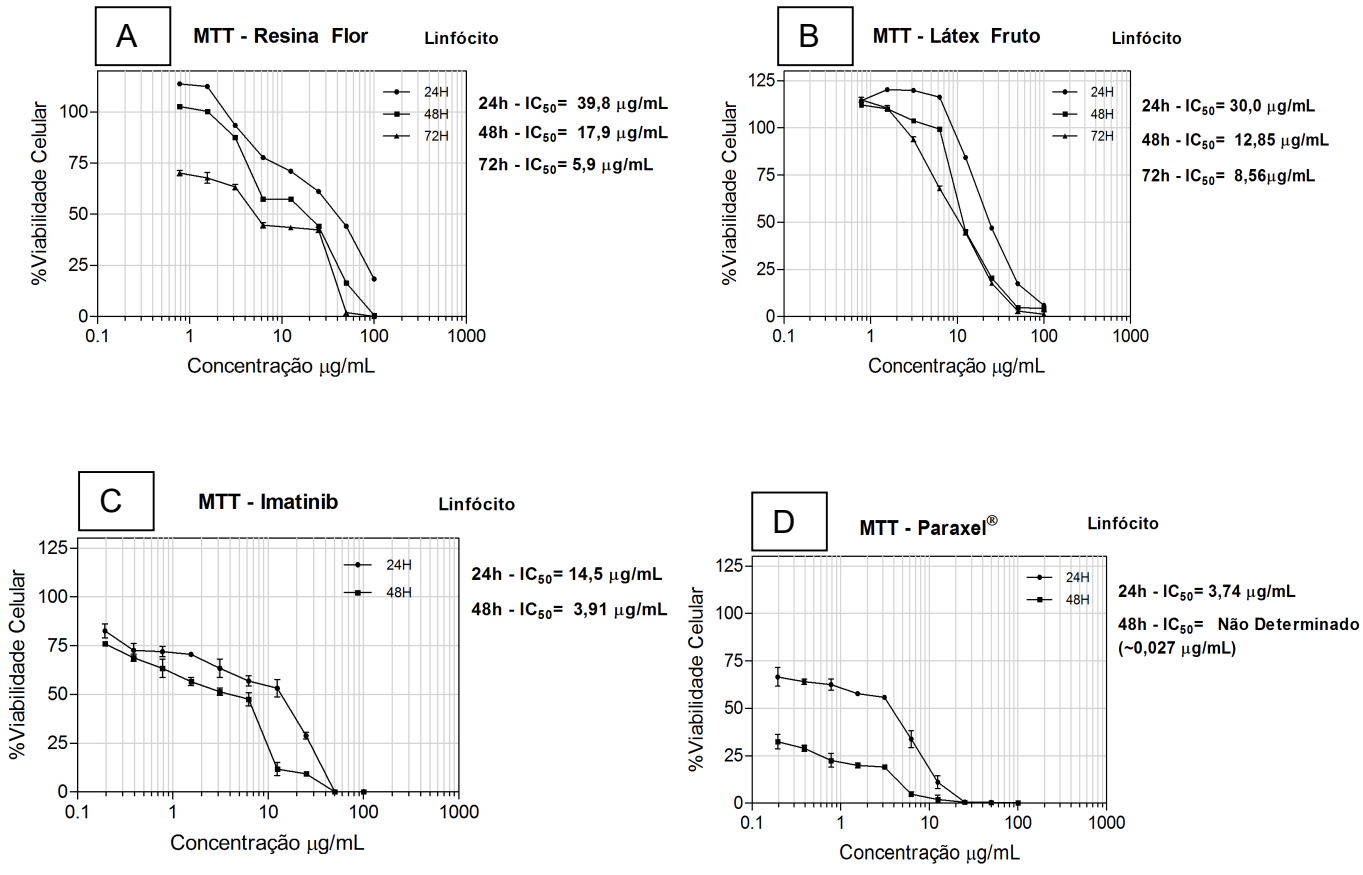
Legenda: *a - p < 0,05 diferença estatística entre a resina floral e as demais amostras testadas, b - não houve diferença estatística entre o látex e o imatinibe. *c - p < 0,05 diferença estatística entre látex e Paraxel ®.

Dados da literatura revelam que muitos extratos vegetais apresentam valores de IC50 para K562 superiores aos encontrados para a resina floral e látex de *Clusia sp* (AMPASAVATE; OKONOGI; ANUCHAPREEDA, 2010). No caso dos extratos de plantas como *Euphoria longan* Lam, *Salvia officinalis*, *Citrus hystrix*, *Punica granatum* L. entre outras, os valores de IC50 encontrados foram superiores a 100 µg/mL. Nossos resultados revelaram, dessa forma, que a atividade antitumoral apresentada é bastante significativa, em especial para o látex (AMPASAVATE; OKONOGI; ANUCHAPREEDA, 2010; GARCIA, et al., 2012).

4.2 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp*, Imatinibe e Paclitaxel em Linfócitos

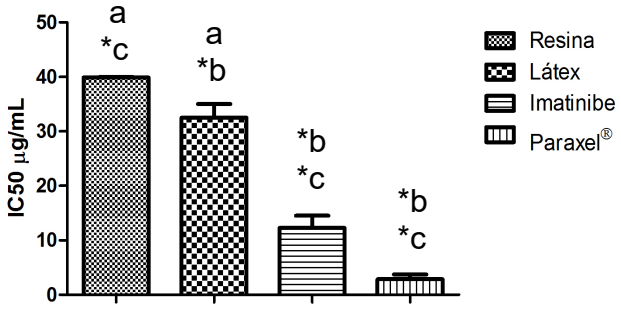
Para avaliar os efeitos citotóxicos da resina floral e látex dos frutos em células normais, bem como a segurança e seletividade foram realizados experimentos a partir de linfócitos obtidos de cultura primária, pelo teste de redução do MTT. Os valores de IC50 são apresentados na Figura 15. Mediante os resultados obtidos pode-se inferir que a resina e látex foram menos citotóxicos em linfócitos quando comparados com o Imatinibe e Paraxel®. Para todas as amostras testadas os efeitos citotóxicos ocorreram de maneira concentração e tempo-dependente.

Figura 15. Efeito citotóxico da resina floral (A) e látex do fruto (B) de *Clusia sp*, Imatinibe (C) e Paraxel®(D) em cultura primária de linfócitos. Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.



A citotoxicidade em linfócitos após tratamento com a resina e látex dos frutos de *Clusia sp* não apresentou diferença estatística, o que evidencia que para células normais o comportamento de ambas as amostras vegetais é semelhante como verificado na Figura 16.

Figura 16. Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*, Imatinibe e Paraxel®. **A**. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras testadas no teste de MTT no tempo de 24 horas em cultura primária de linfócitos (5x10^5 células/mL). B. A tabela mostra os valores de IC50 obtidos pelo teste de MTT em linfócitos



Amostras	IC50 24 horas
Resina Floral	39,8 µg/mL
Látex do Fruto	30,0 µg/mL
Imatinibe	14,5 µg/mL
Paraxel®	3,74 µg/mL

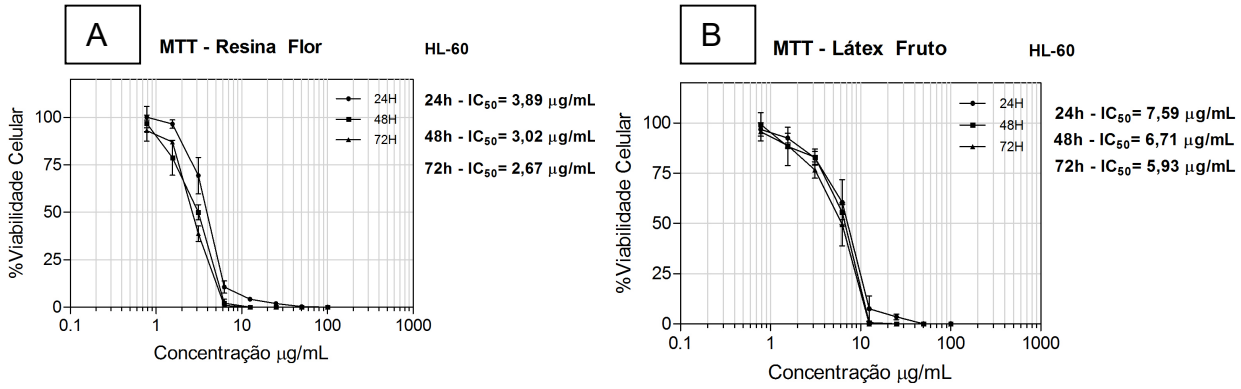
Legenda: a - não houve diferença estatística entre resina floral e látex. *b - houve diferença estatística entre a resina, Imatinibe e Paraxel®. *c - p < 0,05 diferença estatística entre látex, Imatinibe e Paraxel ®.

4.3 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* em Células HL60

Avaliação da citotoxicidade em linhagem de leucemia promielocítica aguda HL-60 foi realizada pelo método de redução do MTT frente à exposição da resina e látex nas mesmas concentrações empregadas nos testes anteriores, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados encontram-se plotados na Figura 17.

Os valores de IC50 obtidos evidenciam interessante citotoxicidade frente a esta linhagem. E quando comparados com os obtidos para o tratamento em células normais, despertam o interesse das amostras vegetais para aplicação frente a esse tipo de leucemia.

Figura 17. Efeito citotóxico após tratamento com a resina (A) e látex (B) de *Clusia* nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, sobre a viabilidade das células HL-60 ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.



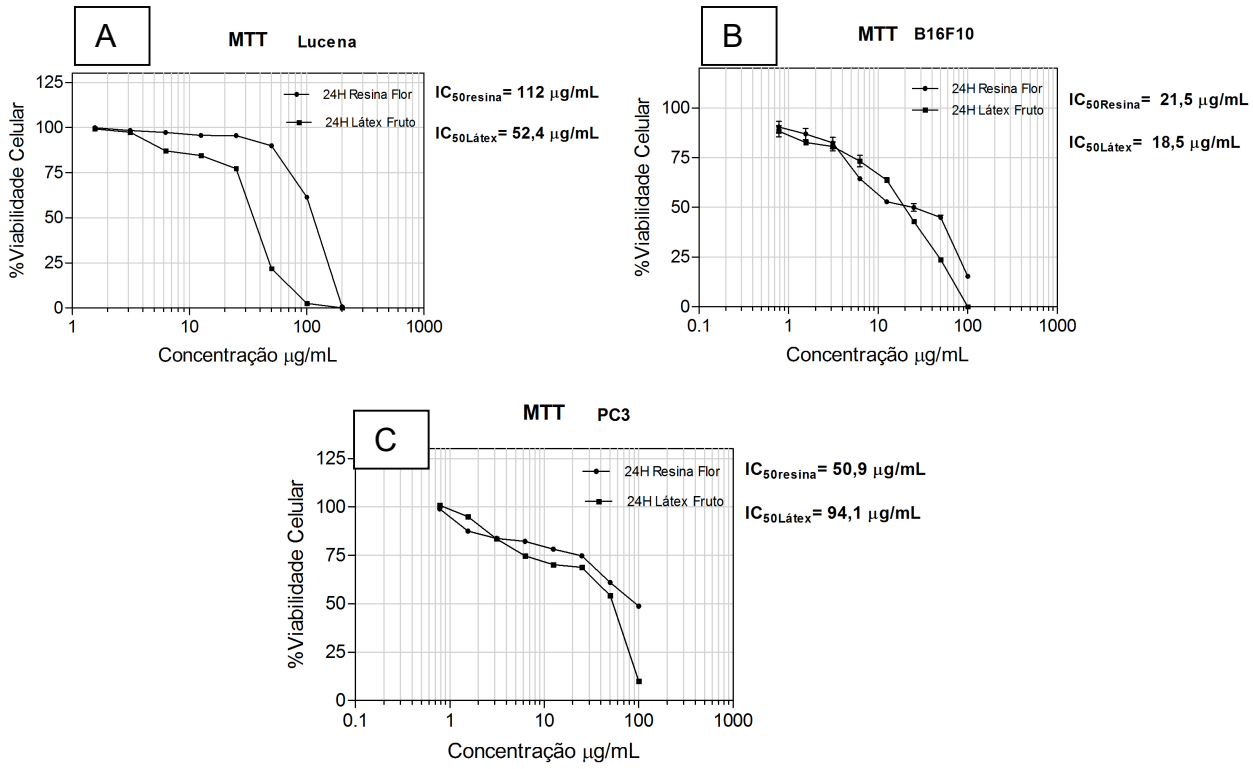
Estudos utilizando extratos de diversas plantas como *Serjania lethalis* e *Magonia pubescens* apresentaram valores de IC50 para a linhagem HL-60 superiores aos observados para as amostras de *Clusia sp*. Contudo, outras espécies apresentaram poder citotóxico maior. Esses resultados confirmam

o grande potencial que as plantas têm para o tratamento do câncer (MESQUITA, et al., 2009).

4.4 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* em Células Lucena, B16F10 e PC3.

Uma triagem foi realizada com outras linhagens tumorais na tentativa de evidenciar possível seletividade. Para tal, as linhagens Lucena, B16F10 (melanoma) e PC3 (câncer de próstata) ($5x10^5$ células/mL) foram submetidas ao tratamento com a resina e látex de *Clusia* sp nas mesmas condições e concentrações empregadas nos ensaios de citotoxicidade a partir do método de redução do MTT, nos tempos de 24 e 48 horas. Os valores de IC50 obtidos estão plotados na Figura 28.

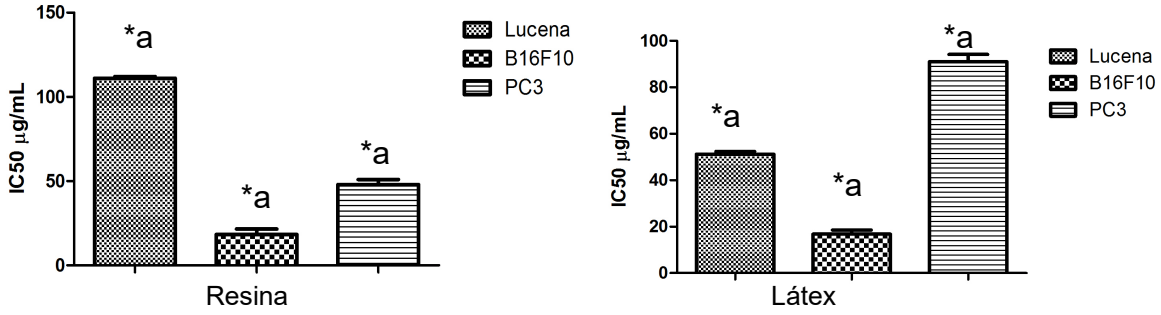
Figura 20. Efeito citotóxico após tratamento com a resina e látex de *Clusia* sp nas diferentes concentrações testadas nos tempos de 24 e 48 sobre a viabilidade das células Lucena (A), B16F10 (B) e PC3 (C) ($5x10^5$ células/mL). Resultados obtidos a partir do teste de redução do MTT.



A comparação entre os valores de IC50 para as linhagens Lucena, B16F10 e PC3 apresenta diferença estatística, com marcante atividade citotóxica da resina e látex de *Clusia* sp frente à linhagem B16F10. O elevado valor de IC50 para Lucena, já era previsto, visto que se trata de uma linhagem utilizada como modelo de resistência a fármacos, via glicoproteína-P (RUMJANEK, et al., 2012). A Figura 19 apresenta os dados de IC50 e análise estatística para a triagem. Segundo Itarath e colaboradores (2004), extratos com valores de IC50 < 30 µg/mL são considerados ativos.

Figura 19. Efeito citotóxico da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*, . **A**. O gráfico apresenta a análise estatística (ANOVA) das amostras testadas no teste de MTT no tempo de 24 horas frente as linhagens Lucena, B16F10 e PC3 ($5x10^5$ células/mL). **B**. A tabela mostra os valores de IC50 obtidos a partir da regressão não-linear dos valores percentuais obtidos pelo teste de MTT nas células K562.

A



B

Linhagens	IC50 24 horas resina	IC50 24 horas látex
Lucena	112 µg/mL	52,4 µg/mL
B16F10	21,5 µg/mL	18,5 µg/mL
PC3	50,9 µg/mL	94,1 µg/mL

Legenda: *a - p < 0,05 diferença estatística entre todas as linhagens submetidas ao tratamento com as amostras vegetais.

A citotoxicidade pode ser considerada um indicativo inicial da atividade antitumoral presente na maioria dos quimioterápicos. Atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem pronunciada atividade citotóxica (AJITH e JANARDTHANAN, 2003; OLIVEIRA et al., 2009). O método de redução do MTT fornece informações sobre a função mitocondrial através da avaliação da atividade da succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Baseado nesse pressuposto pode-se inferir que a resina floral e látex obtidos dos frutos de *Clusia sp* possuem potencial no desenvolvimento de fármacos antitumorais, haja visto que sua citotoxicidade foi compatível a produtos empregados no tratamento do câncer.

4.5 Análise das alterações morfológicas

4.5.1 Morfologia celular com corante de Giemsa

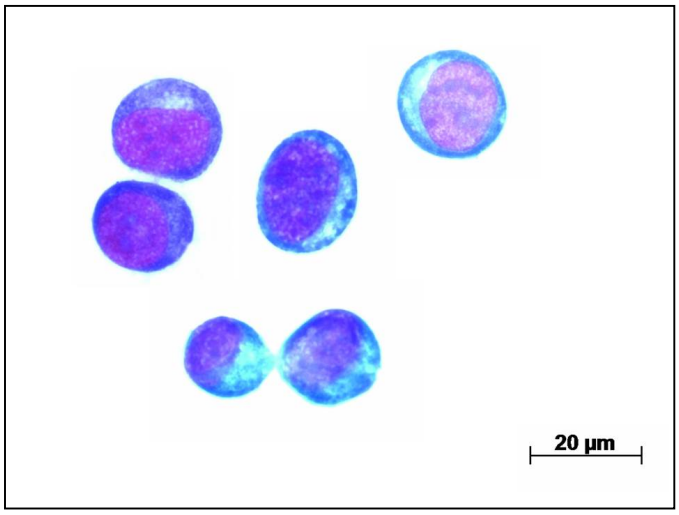
Para a análise das alterações morfológicas que pudessem evidenciar a morte celular foi empregado o corante Giemsa. As células K562 foram incubadas por 24 horas com os valores de IC50 da resina (62,2 µg/mL) e látex (37,4 µg/mL). A partir das lâminas confeccionadas e em comparação com o controle (células não tratadas), é possível evidenciar o processo de indução a morte celular, Figura 20.

Os eventos morfológicos observados evidenciam a morte celular principalmente por apoptose, após tratamento com resina ou látex. Os aspectos detectados envolvem a condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear e formação de prolongamentos da membrana celular, denominados de *blebbings.* Há subsequente desintegração do núcleo, estrangulamento do citoplasma e modificação da morfologia esférica das células K562 para aspecto cilíndrico, principalmente após tratamento com a resina floral de *Clusia* sp (Figura 20 B).

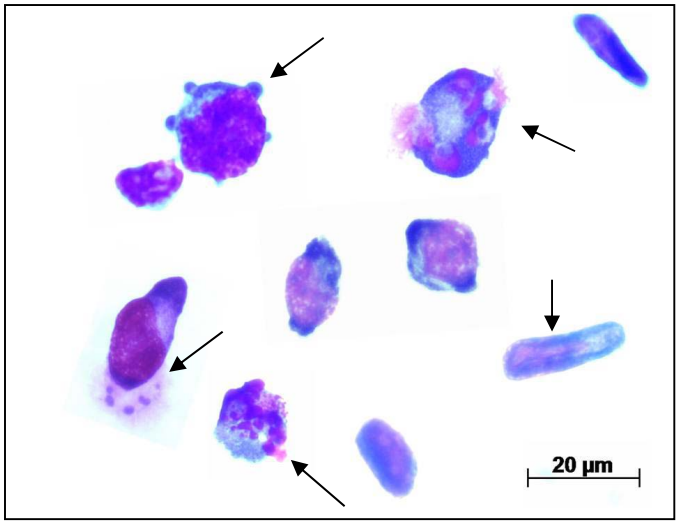
Segundo Shaha (2006) uma série de eventos morfológicos é desencadeada em resposta a indução da morte celular, tais como redução do volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos (blebs) na membrana celular, desintegração do núcleo e clivagem do DNA por endonucleases resultando em fragmentos de 180-200pb ou múltiplos deles (HORIKAWA; PEÑA, 2011). Como descrito, a presença de todos esses eventos foi corroborada pela coloração de Giemsa nas células expostas às amostras de *Clusia* sp.

Figura 20. Alterações morfológicas observadas por meio do corante Giemsa nas células K562 após tratamento com o IC50 das amostras vegetais obtido no teste de redução do MTT. A. Controle, B. Tratamento com a resina floral e C. Tratamento com o látex dos frutos. As setas indicam as alterações morfológicas.

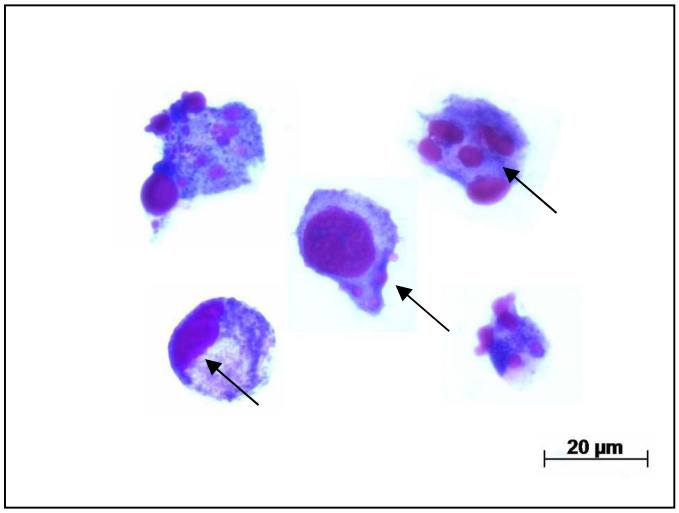
A



B



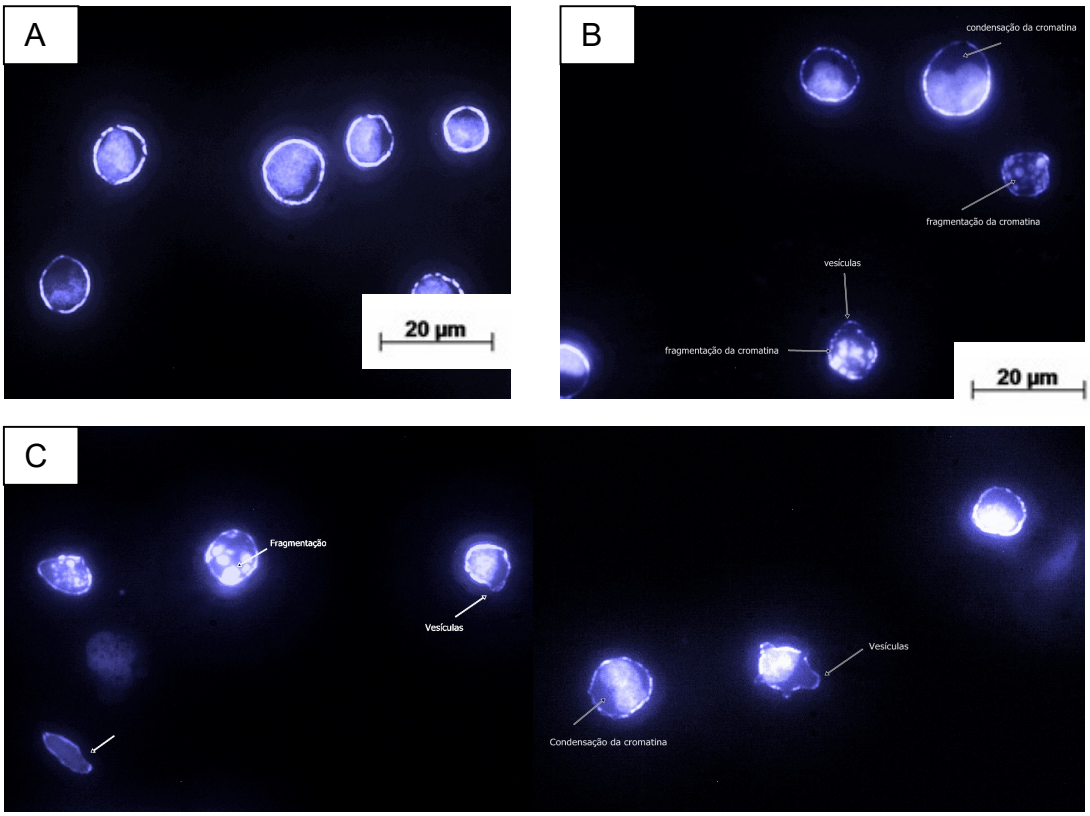
C



4.5.2 Verificação das alterações nucleares a partir do emprego do corante Hoechst 33342

A aplicação do corante de Hoechst 33342 é considerada um ensaio conveniente para verificar alterações morfológicas pronunciadas durante a morte celular, principalmente nos casos de apoptose. Assim como no ensaio de Giemsa, as células k562 foram tratadas com concentrações relativas aos valores de IC50 obtidos no ensaio de redução do MTT. Em comparação com o controle (células não tratadas) foi possível observar alterações morfológicas descritas para morte celular. As células tratadas com a resina ou o látex apresentaram condensação da cromatina, fragmentação do núcleo. Formação de *blebbing*s também foi constada, Figura 21.

Figura 21. Coloração de Hoechst 33342 evidenciando as alterações morfológicas após tratamento das células k562 com a resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A - controle, B – K562 tratada com resina, C – k562 tratada com o látex dos frutos. As setas indicam as alterações.



4.6 Avaliação do Potencial Indutor de Apoptose

4.6.1 Análise da externalização da fosfatidilserina (FS)

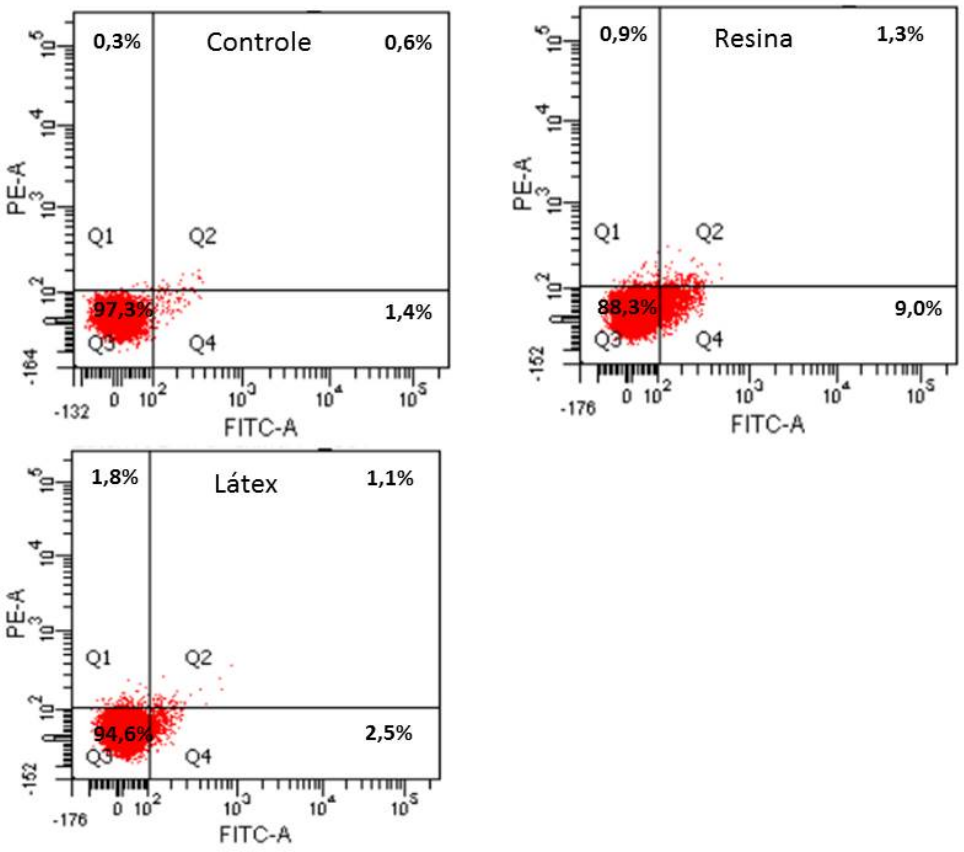
Os eventos que marcam a apoptose podem ser avaliados inicialmente pela exposição do fosfolípide fosfatidilserina na face externa da membrana. A exposição da FS funciona como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos e células adjacentes (BOERSMA et al., 2005; CHINKWO, 2005).

A externalização da fosfatidilserina após incubação das células K562 com a resina floral (62,2 µg/mL) ou o látex (37,4 µg/mL) dos frutos de *Clusia sp* foi observada a partir da marcação das células com a anexina V e PI. A análise foi efetuada por meio de gráficos de pontos onde as células que são positivas para FITC-Anexina V e negativas para PI encontram-se em estágio precoce de apoptose, quadrante Q4 (Figura24). Células que são positivas para FITC-Anexina V e PI estão no final do estágio de apoptose Q2. As células que se encontram em estágio de necrose ou estão completamente mortas são negativas para FITC-Anexina V e positivas para PI e as células negativas para ambas as marcações estão viáveis.

Após 24h de tratamento das células K562 com a resina floral foi possível verificar que 7,4% das células estavam em apoptose recente, 0,7% em apoptose tardia e 0,6% em necrose, Figura 22. A partir desses resultados pode-se inferir que o principal mecanismo de morte mediado pelo tratamento com a resina é a apoptose, diferentemente do observado para o látex uma vez que foi verificado somente 1,1% de células em apoptose após o tratamento. A indução de necrose e apoptose tardia após tratamento com

látex não foram significativos como apresentado na Figura 22. Embora os percentuais de apoptose para a resina tenham sido relativamente pequenos, valores similares de apoptose foram encontrados para K562 após 24h de tratamento com 1μM de imatinib (KUROSU, et al., 2007).

Figura 22. Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp* na morte celular de k562 após 24 horas de incubação

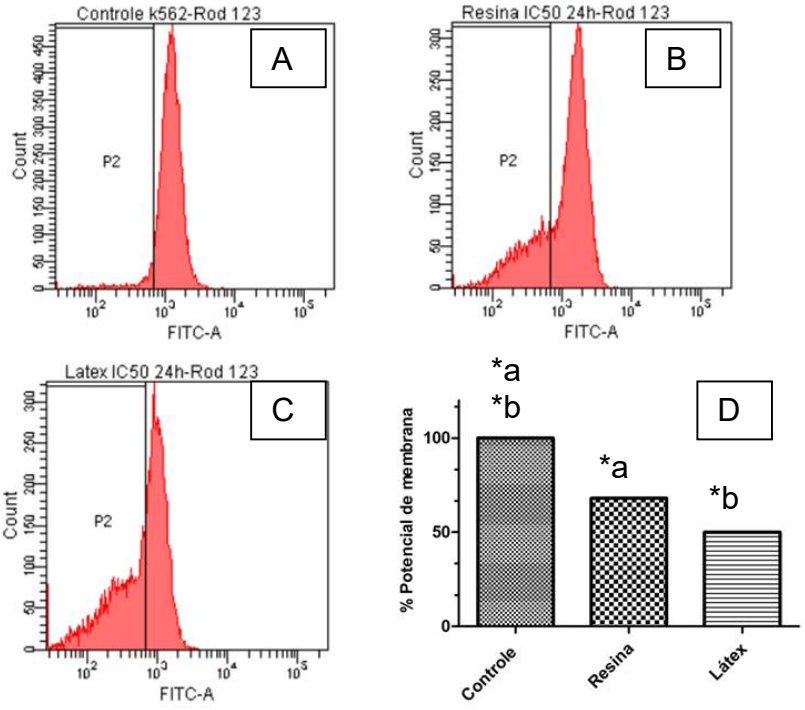


4.6.2 Alteração do potencial de membrana mitocondrial (*ΔΨm*)

As células k562 após tratamento com a resina floral e látex de *Clusia sp* foram avaliadas quanto a capacidade destas amostras promoverem a despolarização da membrana mitocondrial. Após marcação com Rh-123 foi

observado decréscimo do potencial de membrana em 32% para tratamento com a resina floral e 50% pós-tratamento com o látex (Figura 23). Esses resultados indicam alterações na integridade mitocondrial, pois o aumento da fluorescência citosólica é resultado da difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol. O decréscimo do potencial de membrana mitocondrial após tratamento com as amostras vegetais apresentou diferença estatística quando comparado com o controle (células não tratadas).

Figura 23. Efeito da resina floral e látex de *Clusia sp* no potencial de membrana mitocondrial. A – controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex, D – Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, $p < 0,05$. *a - diferença estatística entre controle e resina, *b – diferença estatística entre controle e Látex.



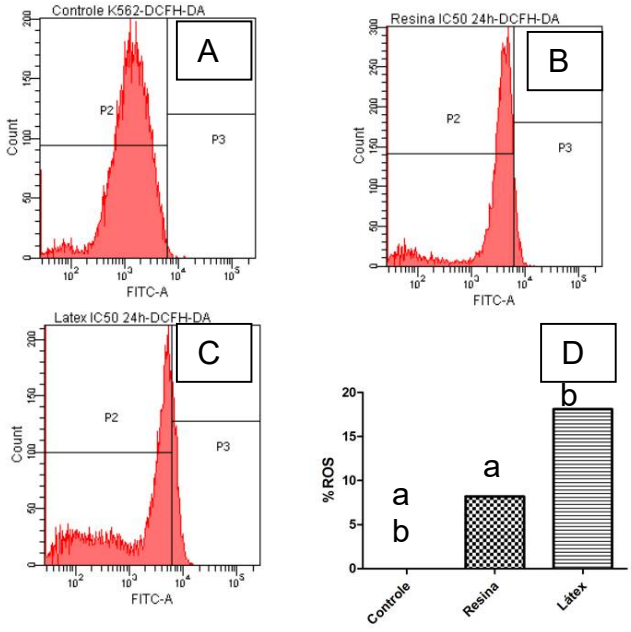
Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, colapso no potencial da membrana mitocondrial interna é gerado (Δψ), além de transição na permeabilidade mitocondrial. Concomitante, a água do espaço entre as membranas difunde-se para a matriz mitocondrial, resultando na

ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (LOEFFLER; KREMER, 2000; GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria a alteralçao do potencial de membrana Δψ, promove a perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. O aumento dos níveis de ERO levam a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando ainda mais o colapso do Δψ (GREEN e KROEMER, 2004).

4.6.3 Produção de espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O tratamento das células k562 com a resina ou látex de *Clusia sp* promoveu aumento das espécies reativas de oxigênio em 8,2% e de 18,1%, respectivamente. A Figura 24 apresenta os percentuais de geração de ERO.

Figura 24. Produção de ERO após tratamento com a resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A – controle, B- tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, p < 0,05. a - não foi observada diferença estatística entre controle e resina, b – não foi observada diferença estatística entre controle e Látex.



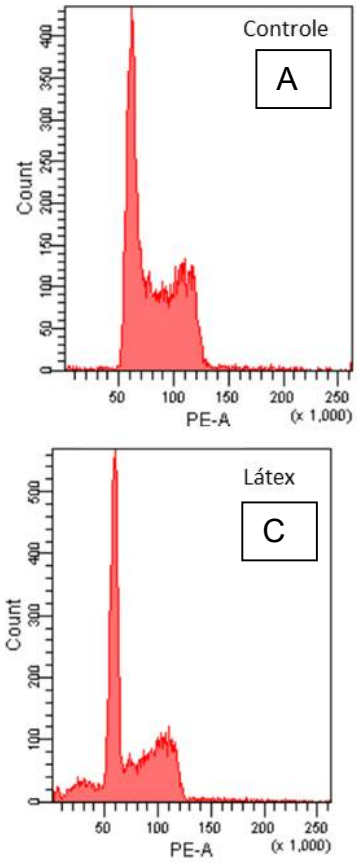
Segundo alguns estudos a super geração de espécies reativas de oxigênio podem estar associada a vários tipos de morte como a apoptose e até mesmo a necrose. Acredita-se que essa super produção de ERO ative um circuito de amplificação do sinal apoptótico, bem como, a indução da ruptura da membrana plasmática, ativação de proteases com consequente interferência no extravasamento do conteúdo celular (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009).

O estado redox (oxidantes e redutores equivalentes) das células é um reflexo do balanço entre os níveis de espécies reativas de oxigênio. A elevação dos níveis de ERO acima da capacidade fisiológica resulta em estresse oxidativo potencialmente citótoxico. Sob essa condição pró-oxidante, as ERO podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, induzindo a morte celular (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009). O ataque de ERO ao DNA é especialmente importante, pois pode ocasionar danos irreparáveis e desencadear um processo de morte (ALLEN; TRESINI, 2000).

4.6.4. Progressão do Ciclo Celular

Os efeitos da resina ou látex nas fases do ciclo celular em células K562 estão apresentados na Figura 25. Como observado, ambas as amostras aumentaram a fase Sub-G1 e o tratamento com o látex dos frutos bloqueou o ciclo celular na fase G1/G0.

Figura 25. A, B e C - Efeitos da resina e látex de Clusia na progressão do ciclo celular em células K562 (1x10^6 células/mL); D – A tabela apresenta a porcentagem de variação para cada amostra durante as fases do ciclo celular.



D

	Sub G1	G_0/G_1	S	G_2
Controle	0,8 %	40,1%	25,6%	30,75%
Resina	12,5%	41,3%	23,1%	21,85%
Látex	11,3%	49,9%	17,5%	22,4%

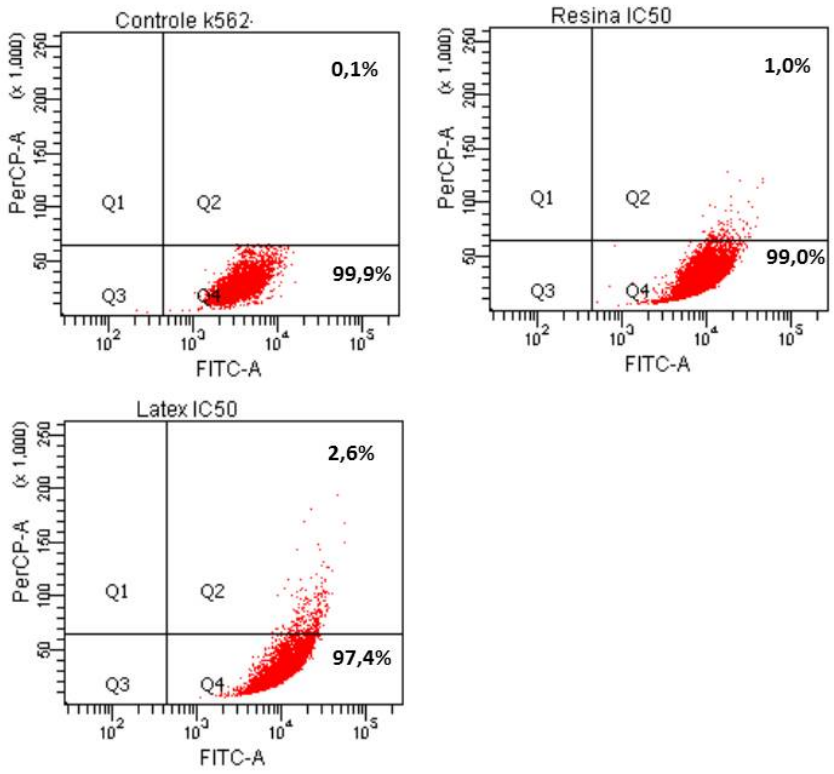
A célula normal segue uma sequência de eventos controlados por fatores intrísecos e extrínsecos que atuam sobre o ciclo celular. Na fase G1 ocorre o crescimento celular, na fase S a célula passa a sintetizar DNA e em G2 a célula prepara-se para entrar em mitose. Durante o processo de passagem de uma fase para a outra, existem mecanismos que checam se o ciclo celular está ocorrendo a contento (ALMEIDA et al., 2005). No entanto, na célula cancerígena não são observados esses eventos regulatórios, o que leva a célula a um crescimento e proliferação desordenados, como resultado as células cancerígenas não entram em apoptose (ALMEIDA et al., 2005).

Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos, como os alcalóides da vinca, podofilotoxina, paclitaxel entre outros (ALMEIDA et al., 2005). Um segundo grupo de agentes denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de promover a morte das células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G_0 (ALMEIDA et al., 2005). Pelo exposto e a partir dos resultados obtidos pela progressão do ciclo celular, a resina pode ser classificada como ciclo-celular não específico e o látex como ciclo-celular específico, uma vez que este último atua sobre a fase G_1.

4.6.5 Potencial indutor de autofagia

Para detectar outros mecanismos de morte celular foi avaliado o potencial indutor de autofagia da resina e principalmente do látex de *Clusia sp,* uma vez que não houve indicativo de morte por apoptose das células K562 após o seu tratamento. A partir da análise por citometria de fluxo foi possível verificar que ambas as amostras não induzem a formação dos vacúolos autofágicos, não favorecendo a hipótese da morte celular por essa via (Figura 26).

Figura 26. Efeito indutor de autofagia em células k562 (1x10^6 células/mL) após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*.

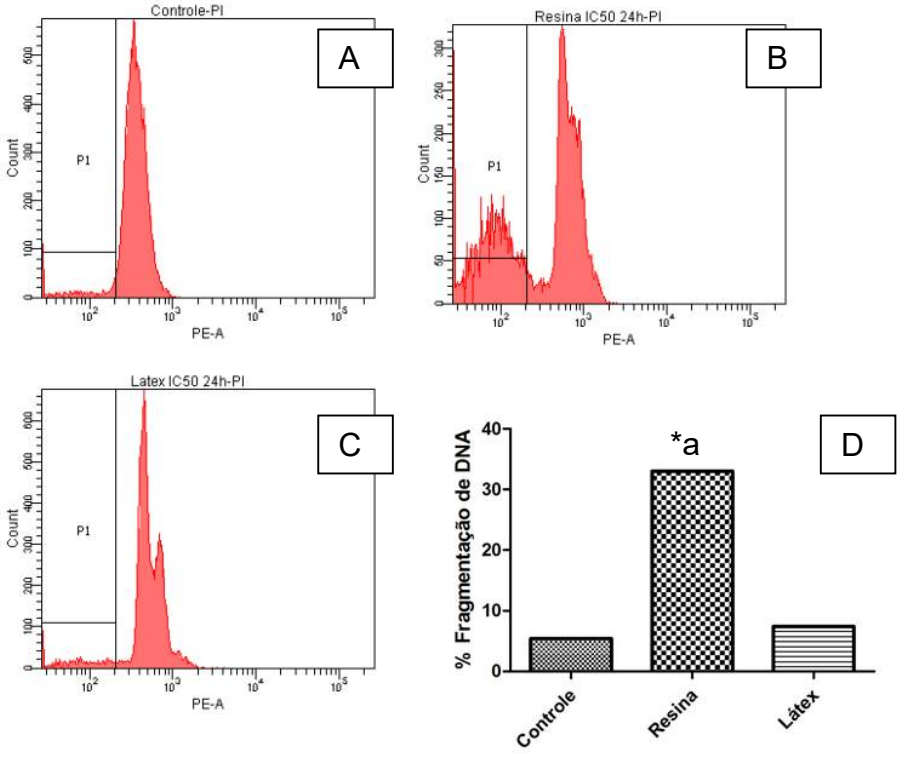


A autofagia, também conhecida como morte celular programada do Tipo II, é caracterizada pela formação de autofagossomos maduros e autofagolisossomos, com organelas ácidas que podem ser detectadas com determinados corantes. Esse processo de morte é independe de caspases, e promove um colapso nuclear que ocorre em consequência da destruição das organelas (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009). Estudos revelaram que a autofagia pode ser observada em alguns tipos tumorais como câncer de mama após tratamento por radioterapia e quimioterapia, e em células de mieloma múltiplo e leucemia promielocítica aguda após tratamento com arsênico (KANZAWA et al., 2003).

4.6.6 Fragmentação do DNA

Uma característica marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA (SARASTE; PULKKI, 2000). Desta forma, a fim de avaliar a fragmentação do DNA após tratamento com a resina ou látex de *Clusia sp*, as células foram marcadas com IP. Observou-se que a resina induziu a fragmentação do DNA em 33%, apresentando diferença estatística quando comparada com o controle. Já o látex promoveu 7,4% de fragmentação (Figura 27).

Figura 27. Fragmentação do DNA em células k562 ($1x10^6$ células/mL) após tratamento (24h) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A- controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, $p < 0,05$.



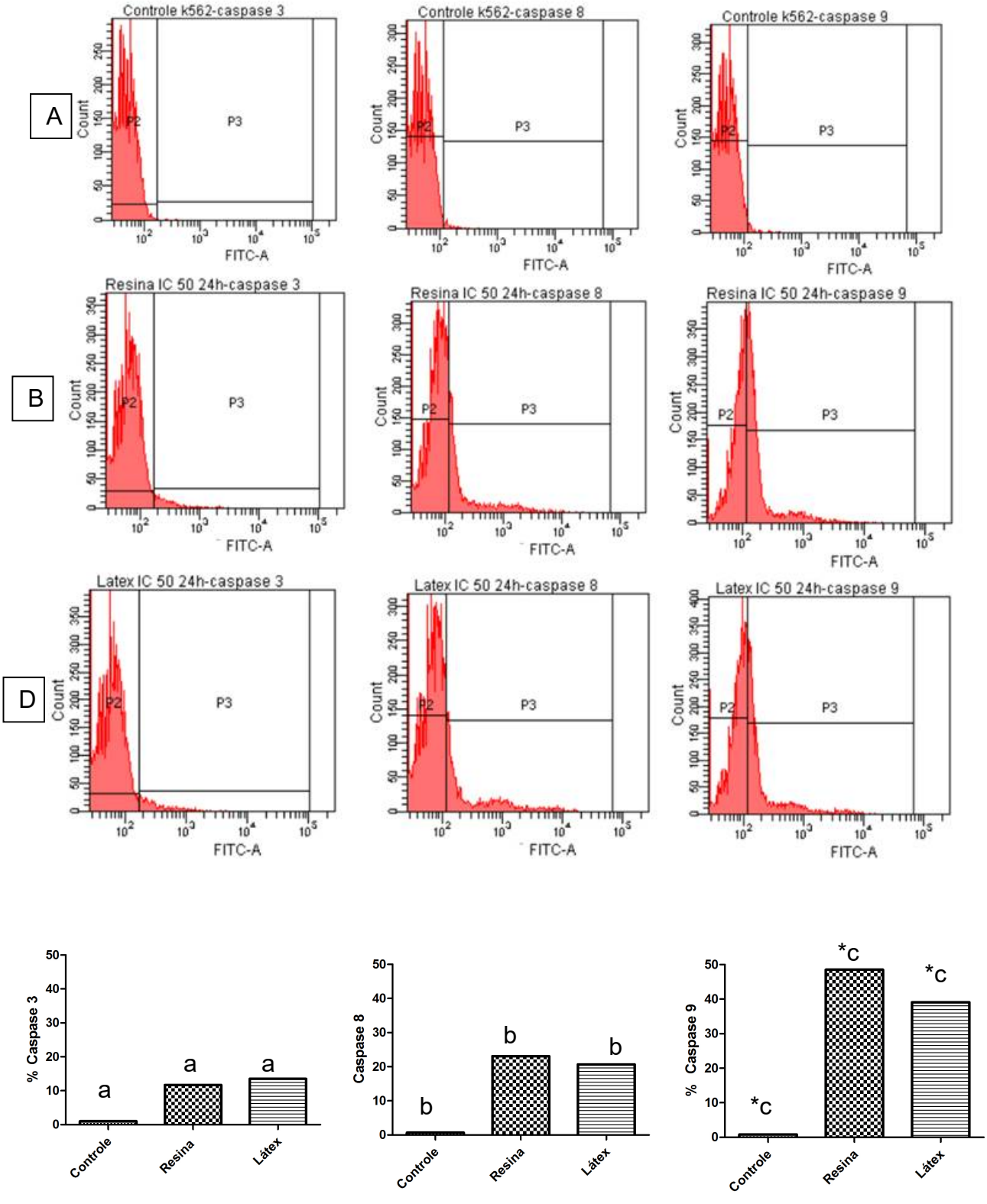
Legenda: a - diferença estatística entre controle e resina, b – não foi observada diferença estatística entre controle e Látex.

4.6.7 Determinação da ativação das caspases- 3, -8 e -9

Foi verificada a ativação de caspases iniciadoras (caspase-8,-9) e efetoras (caspase-3) após tratamento com o IC50 de 24 horas da resina floral (62,2 µg/mL) ou látex dos frutos (37,4 µg/mL) de *Clusia sp*. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 28.

Os percentuais de ativação das caspases em comparação com o controle para caspase-3 foram de 11,7% para resina e 13,5% para o látex, capase-8 de 23,1% para resina e 20,7% para látex e para caspase-9 de 48,5% para resina e de 39,1% para o látex. Pronunciada ativação da caspase-9 foi constatada após tratamento de ambas as amostras vegetais com significativa diferença estatística com $p < 0,05$.

Figura 28. Ativação das caspases 3,8 e 9 em células k562 (1x10^6 células/mL) após tratamento (24h) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A- controle, B – tratamento com resina, C – tratamento com látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, P < 0,05. a – não foi observda diferença estatística entre controle, resina e látex , b – não foi observada diferença estatística entre controle, resina e látex, c – para ambos os tratamento é observada diferença estatística com p < 0,05.



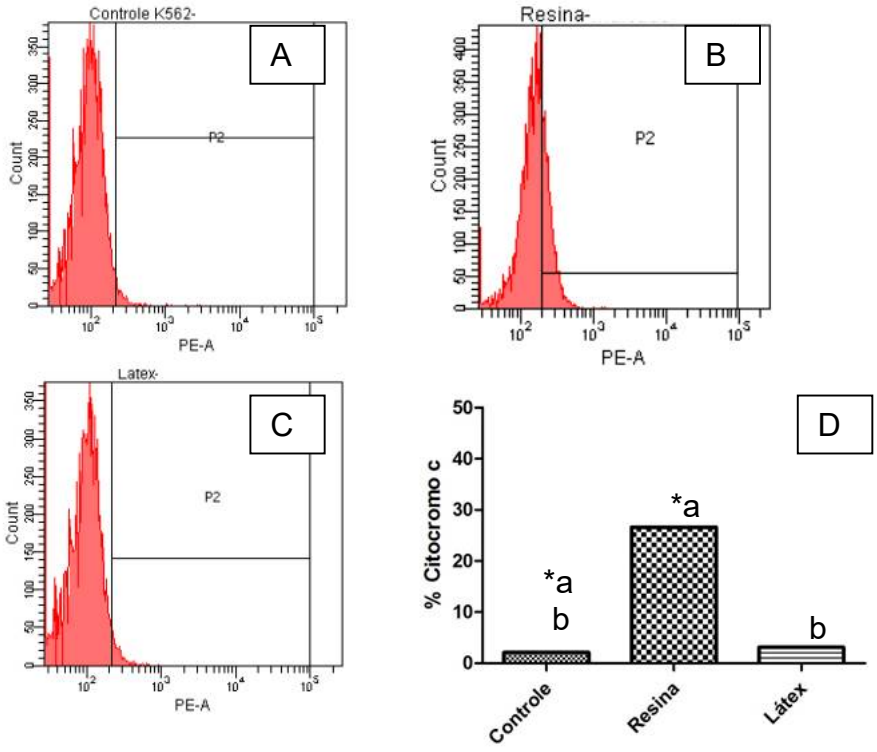
Caspases representam um grupo de proteases com uma sequência de cisteína conservada no seu sítio ativo capazes de clivar substratos celulares com ácido aspártico. Compreendem parte de uma família que engloba cerca de 14 membros. Estudos evidenciam que tais proteases são capazes de atuar sobre diversos substratos resultando em ativação ou inibição, mas não degradação de proteínas envolvidas no *splicing* do RNA, reparo do DNA, manutenção da estrutura celular, entre outros. Embora as caspases não sejam as únicas proteases envolvidas na morte celular, sua ação na apoptose é crítica (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009).

Os primeiros estudos apontam para a importância das caspases como mediadores na fase de execução do processo apoptótico (MIURA et al., 1993; ZOU et al., 1997; FRITZ et al., 2006). Entre os vários tipos de morte celular uma cascata de ativação de caspases é observada, onde o acionamento de uma caspase efetora é mediada por caspases iniciadoras através de clivagem intra-cadeia. São classificadas com base nas suas funções em duas subfamílias: caspases pró-apoptóticas e caspases pró-inflamatórias. As caspases pró-apoptóticas (caspase-2, -3, -6, -7, -8,-9, -10) são conhecidas por atuarem na mediação da morte celular e pela geração de sinalizadores (LI; YUAN, 2008). Pelo exposto, observa-se que a resina floral e o látex de *Clusia* sp estimularam a ativação de caspases pró-apoptóticas sugerindo a morte celular por esse mecanismo.

4.6.8 Avaliação da liberação de citocromo c

A avaliação da liberação de citocromo c para o citosol em célula K562 ($1x10^6$ células/mL) foi verificada após tratamento com a resina floral e látex de *Clusia sp* por de citometria de fluxo. Os resultando encontram-se expressos na Figura 29. É possível observar que o tratamento com a resina floral induziu a liberação considerável de citocromo c (26,6%), o mesmo não é observado para o tratamento com o látex dos frutos (3,1%).

Figura 29. Liberação de citocromo c após tratamento das células k562 ($1x10^6$ células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex e D - Análise estatística teste *t* student variável Mann Whitney, $p < 0,05$. *a – foi observada diferença estatística entre controle e resina , b – não foi observada diferença estatística entre controle e látex.



Estudos apontam que durante a apoptose ocorre formação de um megaporo que abrange as membranas interna e externa da mitocôndria. Através desse poro ocorre liberação de citocromo c para o citoplasma. Os

diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela membrana mitocondrial, promovendo desacoplamento da cadeia respiratória e consequentemente liberação de citocromo e outras proteínas ativadoras de apoptose para o citosol (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009). Uma vez presente no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1, configurando o apoptossomo, que atua sobre a clivagem da pró-caspase-9, ativando a caspase-9 (KROEMER et al., 2005; KROEMER et al., 2009).

4.6.9 Ativação de Bcl2 e Bax

Os resultados da ativação de Bcl-2 e Bax nas células K562 ($1x10^6$ células/mL) após tratamento com a resina floral (62,2 µg/mL) ou látex dos frutos (37,4 µg/mL) de *Clusia sp* são apresentados nas Figuras 30 e 31. É possível observar pelos histogramas que não houve alteração na ativação de Bcl-2 após os tratamentos. Entretanto, considerável ativação de Bax é observada com aumentos de 18,2% após tratamento com resina e 18% para látex.

Figura 30. Ativação de Bcl-2 após tratamento das células k562 (1x10^6 células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex.

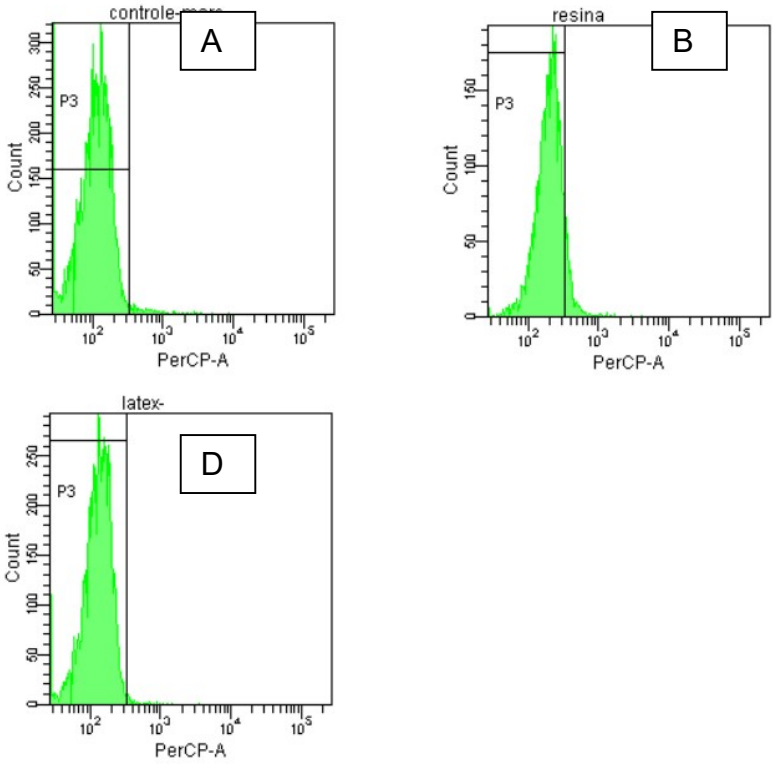
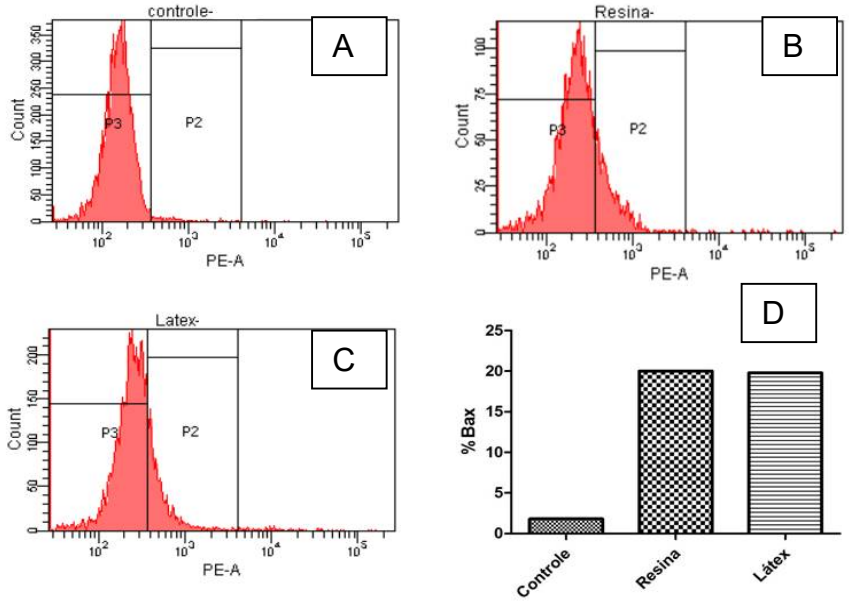


Figura 31. Ativação de Bax após tratamento das células k562 (1x10^6 células/mL) com resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp*. A- controle, B – tratamento com a resina, C – tratamento com o látex. Diferença estatística entre os tratamentos e o o controle não foi observada, D – percentual de ativação de Bax.



A família Bcl-2 representa um grupo de proteínas indutoras e repressoras da morte celular e participam ativamente da regulação da apoptose. Os membros da família Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são, portanto, denominados de reguladores anti-apoptóticos. Em contrapartida outras proteínas como Bax, Bid e Bak são descritos como pró-apoptóticos (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio, bem como estabilizar o potencial da membrana mitocondrial. A homeostasia é mantida pelo controle do equilíbrio entre proteínas antiapoptóticas e pró-apotóticas. Estímulos, como danos ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas (KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

Bax é uma proteína comumente encontrada nos processos apoptóticos atuando diretamente no colapso mitocondrial. De fato, nos nossos experimentos observamos um aumento de Bax em ambas as amostras de *Clusia sp*. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por citometria em que verificamos uma disfunção mitocondrial através da perda do potencial de membrana.

A partir dos dados obtidos por citometria de fluxo em conjunto com análises morfológicas foi possível observar uma cascata de eventos que culminam com a morte celular. Assim, os resultados sugerem que o mecanismo de morte nas células K562 após tratamento com as amostras de *Clusia sp* é a apoptose por via extrínseca e intrínseca. A Tabela 3 resume esses eventos.

Tabela 3. Resultados obtidos a partir da citometria de fluxo para o estudo das vias de morte celular

Evento	Resina	Látex
Exposição de fosfatidilserina	Apoptose recente em 7,4%	Apoptose recente em 1,1%
ΔΨm	Redução de 32%	Redução de 50%
ERO	Aumento de 8,2%	Aumento de 18%
Citocromo c	Aumento de 26,6%	Aumento de 3,1%
Ciclo celular – SubG1	Aumento de 12,5% - Ciclo-celular não específico	Aumento de 11, 3% com parada do cliclo celular em G1 – Ciclo-celular específico
Autofagia	Não foi observada	Não foi observada
Bcl-2	Sem alteração	Sem alteração
Bax	Aumento de 18,2%	Aumento de 18%
Fragmentação do DNA	Aumento de 33%	Aumento de 7,4%
Caspase 3	Aumento de 11,7%	Aumento de 13,5%
Caspase 8	Aumento de 23,1%	Aumento de 20,7%
Caspase 9	Aumento de 48,5%	Aumento de 39,1%

Diversos estudos têm mostrado que a ativação de ambas as vias intrínseca e extrínseca é comum no processo de morte desencadeado por agente naturais. Entre eles podemos citar a apigenina em câncer de pulmão e a fração diclometânica de *Melissa officinalis* em células leucêmicas K562 e Jurkat (EBRAHIMNEZHAD e AMIRGHOFRAN, 2013).

4.7 Avaliação da sobrevida dos camundongos Swiss inoculados com tumor de Ehrlich após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*

No modelo de tumor ascítico, a atividade anticâncer da resina floral e do látex dos frutos de *Clusia sp* foi confirmada através do aumento na sobrevida dos animais tratados. As doses de 125 mg/kg da resina e de 125 mg/kg e 250 mg/kg para o látex aumentaram a sobrevida do animal portador

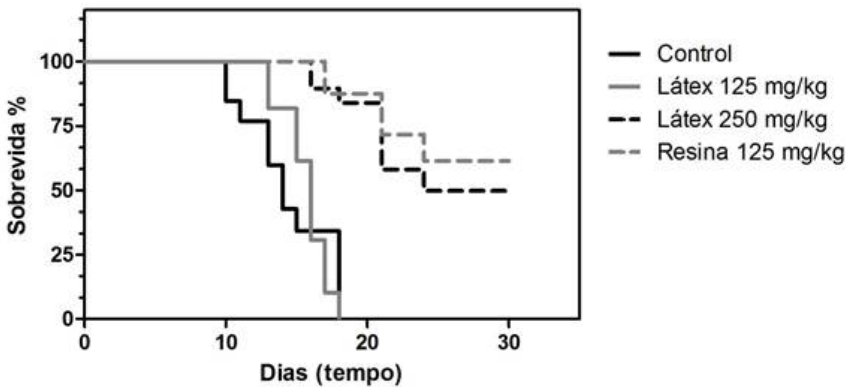
do tumor (Figura 32). A resina promoveu um aumento de sobrevida de 49% na dose mencionada e o látex aumento de 60% na dose de 250 mg/kg. O efeito das amostras vegetais sobre o crescimento do tumor ascítico promoveu significativa redução do volume abdominal (Figura 32 [B]). Esses dados indicam que além da ação antileucêmica, tanto a resina quanto o látex são capazes de inibir a proliferação de câncer de mama *in vivo.*

Altas doses das amostras (250 e 500 mg/kg da resina floral e 500 mg/kg para de látex do fruto) levaram a 100% de óbito dos animais tratados, no primeiro dia de administração, indicando toxicidade nessa faixa.

Os animais que receberam as doses mais elevadas apresentaram sinais de toxicidade antes do óbito, como manifestação da posição trem posterior, anestesia, letargia e contorção.

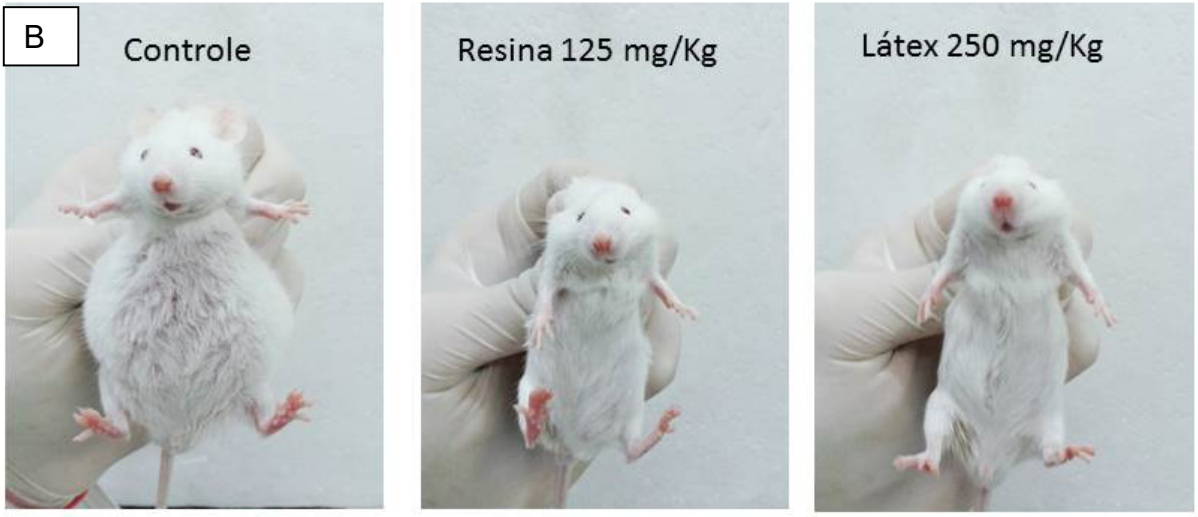
Figura 32. Avaliação do aumento da sobrevida de camundongos Swiss após tratamento com a resina floral. A – curva de Kaplan-Meier, B – Aspecto do abdome dos camundongos após 10 dias de tratamento com a resina floral (125 mg/kg) e látex (250 mg/kg).

A



Após 10 dias de tratamento

B



De forma similar, o extrato de *Calea pinnatifida* também apresentou toxicidade aos animais tratados com doses próximas à dose que promoveu aumento da sobrevida. Essa estreita faixa terapêutica é observada na maioria dos agentes antitumorais (MARCHETTI, 2008).

4.8 Avaliação da citotoxicidade da resina floral e látex obtido dos frutos de *Clusia sp* em células 3T3

A exposição das células 3T3 a resina e látex de *Clusia sp* evidenciou a redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente (100-0,78 µg/mL), quando comparadas ao controle não exposto. As Figuras 33 e 34 apresentam a regressão não-linear obtida a partir da viabilidade celular *versus* concentração das amostras vegetais. Os valores de IC50 para a resina e o látex foram de 4,5 µg/mL e 8,7 µg/mL, respectivamente. Estes valores foram utilizados para estimar a DL50 (µg/mL) a partir da equação de regressão linear proposta pelo protocolo experimental da ICCVAN para extratos vegetais, Equação 1.

Equação 1

$$(\log DL50\ [mg/kg] = 0{,}372 \times \log IC50$$

Interessante observar que nas menores concentrações houve aumento da proliferação (acima de 100%) destas células, empregadas para determinar a segurança.

Figura 33. Efeito citotóxico da resina floral obtida de *Clusia sp* frente a linhagem 3T3, em 48 horas de exposição.

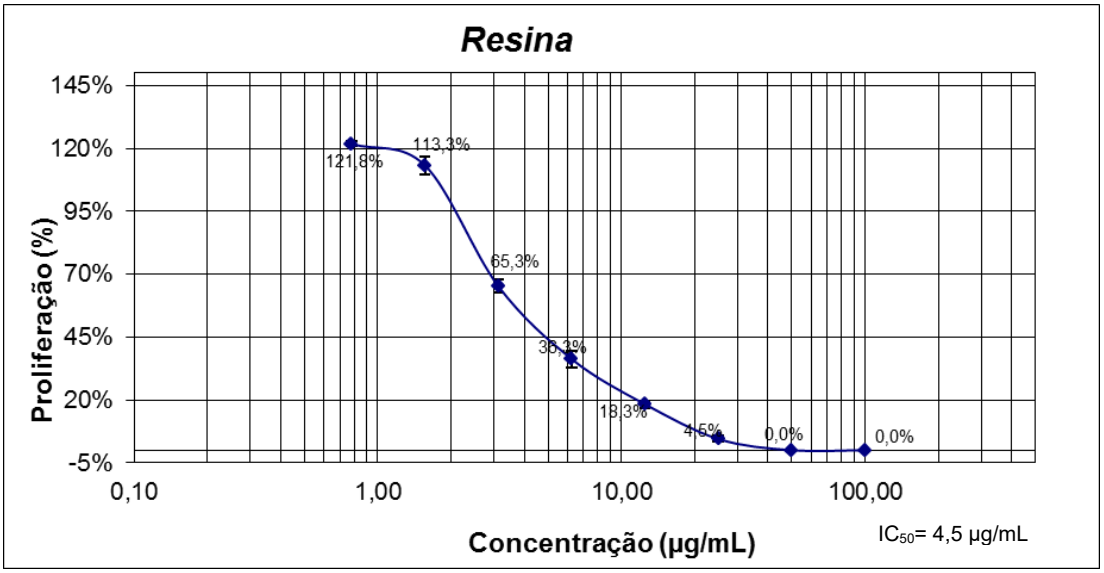
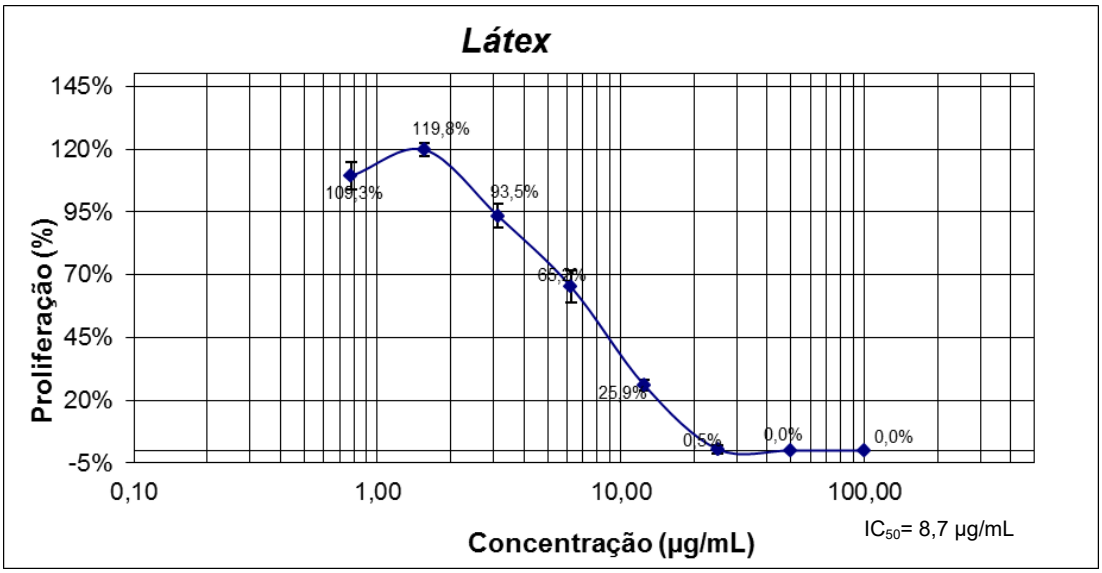


Figura 34. Efeito citotóxico do látex do fruto obtido de *Clusia sp* frente a linhagem 3T3 em 48 horas de exposição.

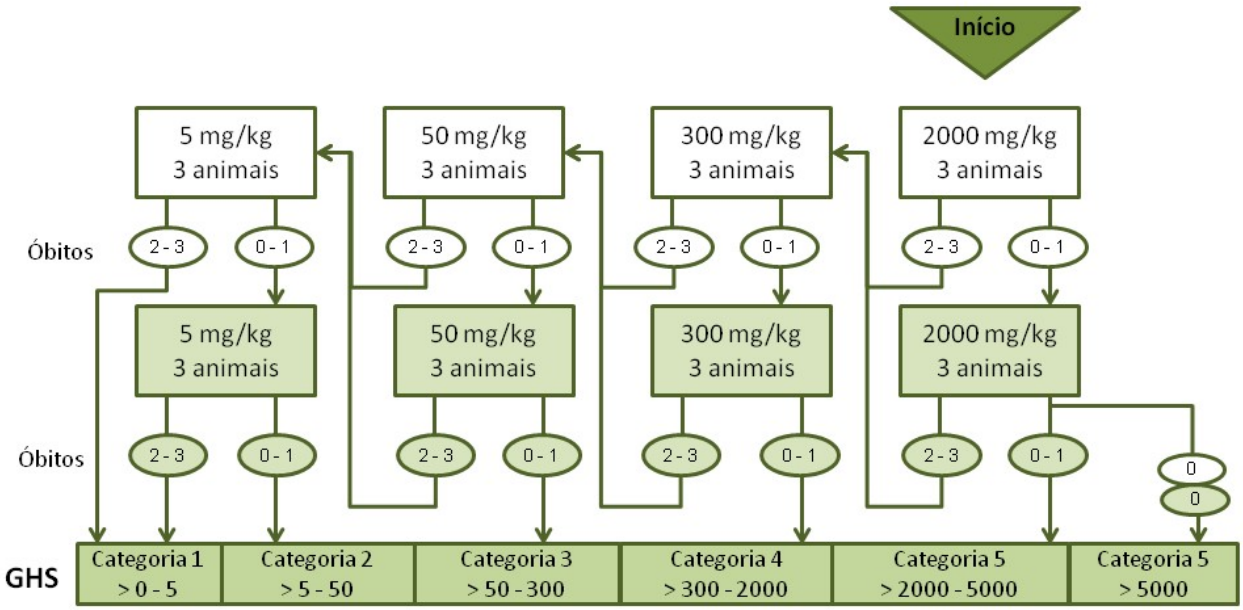


Os valores estimados de DL50 para a resina e látex são de 176,99 mg/kg e 229,06 mg/kg, respectivamente. Conforme o esquema de classificação global harmonizada de risco tóxico GSH, a partir do teste de toxicidade oral aguda proposta pela Organização para a Cooperação e

Desenvolvimento Econômico (OECD 423) os resultados de DL50 obtidos encontram-se entre 50 mg/kg e 300 mg/kg, faixa preconizada pela (GSH) como categoria 3, ver Figura 35. Baseada nessa classificação pode-se inferir que tanto a resina quanto o látex apresentam perfil de moderada toxicidade.

Vale ressaltar que os valores estimados de DL50 confirmam a toxicidade da resina floral e látex de *Clusia sp* observados no ensaio de sobrevida dos camundongos. Conforme verificado, doses superiores a DL50 induziram a morte de 100% dos animais tratados.

Figura 35. Esquema de classificação de risco tóxico segundo sistema GSH.



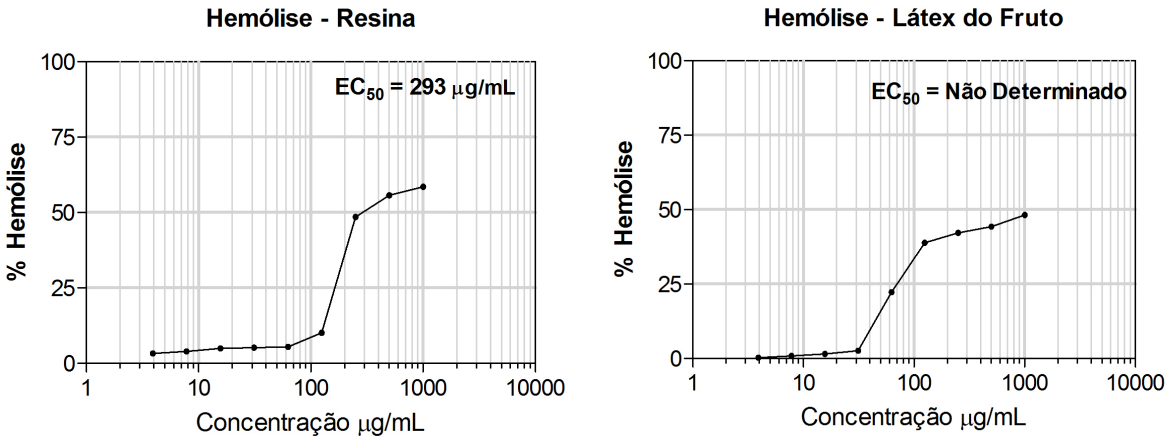
Fonte: OECD 423. Fonte: MOURA, 2012.

4.9 Avaliação do potencial hemolítico da resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*

Para avaliar a atividade hemolítica da resina e látex foi empregado sangue de doador saudável e testadas diferentes concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/ mL). Os valores de EC50

(hemólise 50%) foram obtidos conforme descrito em métodos. Para a resina o EC50 foi de 293 µg/mL e para o látex não foi possível determinar o EC50 nas concentrações empregadas. Cabe ressaltar que o DMSO empregado para solubilizar a resina e o látex promoveu hemólise, podendo somar a essa atividade hemolítica parcial observada em ambas as amostras a utilização do agente solubilizante, (Figura 36).

Figura 36. Efeito do potencial hemolítico da resina floral e látex de *Clusia sp*.

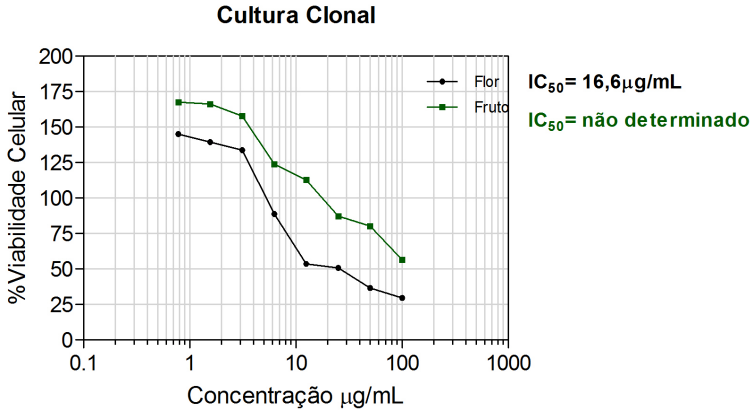


Embora tenha sido observado atividade hemolítica após tratamento com as amostras de *Clusia sp*, os valores de EC50 obtidos foram significativamente superiores aos valores de IC50 para células leucêmicas demonstrando uma boa margem de segurança quanto a utilização dessas amostras.

4.10 Avaliação do efeito citotóxico em precursores da medula óssea de camundongos

Considerando que os agentes antitumorais frequentemente apresentam toxicidade em células precursoras da medula óssea, foi verificada o potencial de indução de mielossupressão em células obtidas da medula óssea de camungondos Swiss, após tratamento da resina ou látex de *Clusia sp*, em diversas concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/ mL). Os resultados estão apresentados na Figura 37.

Figura 37. Efeitos da resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp* em células progenitoras da medula óssea.



Ambas as amostras vegetais inibiram o crescimento e a diferenciação das células progenitoras de granulócitos/macrófagos de maneira concentração e tempo-dependente. Para a resina o valor de IC50 obtido foi de 16,6 µg/ mL e para o látex não foi possível determinar esse parâmetro a partir das concentrações empregadas no ensaio.

Embora as amostras apresentem efeitos mielotóxicos vale chamar a atenção para os resultados observados para as concentrações abaixo dos valores de 6,25 µg/mL para resina e de 25 µg/mL para o látex. As concentrações mais diluídas induziram a proliferação das colônias em 45%

para a resina e em até 67% para o látex na última concentração (0,78 µg/ml), Figura 37. Esse comportamento revela uma curva dose resposta do tipo hormese.

A presença de efeitos opostos, estimulação e inibição, para uma mesma substância é denominado de hormese. Na literatura vários casos já foram descritos, como de prostaglandinas, óxido nítrico, glicocorticoides, aspirina e outros (BELLAVITE, 2002).

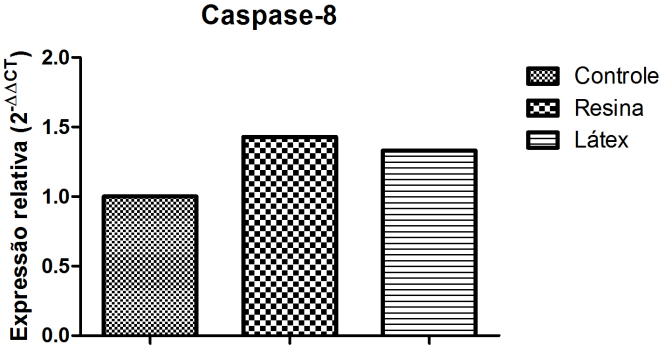
O emprego de ensaios clonogênicos trata-se de uma ferramenta investigativa em estudos pré-clinicos de novas substâncias. *In vitro*, em presença de meio de cultura e de uma mistura de citocinas específicas para cada linhagem celular, os progenitores formam colônias distintas fenotipicamente de células diferenciadas (VALADARES, 2004).

As drogas antitumorais não fazem distinção entre células malignas e células normais, potencialmente destruindo ambas. O apropriado para quimioterapia do câncer seria a destruição das células tumorais e a minimização dos danos às células normais. Infelizmente, muito fármacos antineoplásicos possuem uma margem curta entre dose tumoricida e tóxica. Combinação de fármacos com distintos mecanismos de ação estendem a atividade antitumoral e diminuem o risco de toxicidade (AZEVEDO, 2009). Sendo assim, apesar da resina e látex terem apresentando pronunciada mielotóxicidade não devem ser descartados como promissores no desenvolvimento de agentes antitumorais.

4.11 Avaliação da expressão gênica da caspases-8 por PCR

A expressão do gene caspase -8, envolvido no processo de morte celular, foi determinada por PCR em tempo real, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de β-actina foi utilizado como controle endógeno. Células leucêmicas K562 após exposição com resina e látex apresentaram variações na expressão do gene para caspase-8. Os resultados obtidos revelam um aumento relativo, ou seja, baseia-se na comparação com um gene endógeno conhecido - gene de referência (Figura 38).

Figura 38. Análise da expressão do gene Caspase-8 na linhagem k562 após tratamento com a resina floral e látex do fruto de *Clusia sp*. A expressão relativa foi calculada pelo método$2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando o valor de Ct do transcrito do gene β-actina (controle endógeno) para normalização.



A caspase-8 é um membro das proteases de cisteína, envolvidas na apoptose e processamento de diversas citocinas. É ativada por clivagem proteolícia, ou através do recrutamento por um complexo multimérico ou ainda por clivagem-trans de outras caspases. Na apoptose ela está envolvida com receptores de morte, e após o estímulo dos receptores por algum agente externo, a caspase-8 é clivada e ativada. Subsequentemente,

há clivagem da proteína Bcl-2 BH3, que conduz a liberação de citocromo c das mitocôndrias, provocando a ativação de caspase-9 num complexo com dATP e Apaf-1, que irão atuar no processo de morte celular (KRUIDERING; EVAN, 2000; KROEMER, 2007; CHO, et al., 2009).

Desta forma, foi possível verificar que a resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp* possuem propriedades antitumorais *in vivo* e *in vitro*, além de apresentarem boa margem de segurança. Os resultados obtidos por morfologia, citometria e PCR em tempo real sugerem que o mecanismo de morte desencadeado por estas amostras é a apoptose.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados sugerem interessante atividade citotóxica da resina floral e látex de *Clusia sp* frente a linhagens tumorais;
- Potencial atividade antitumoral para leucemia mielóide crônica (k562) e leucemia promielocítica aguda (HL-60) foi constatada;
- A resina e látex quando comparados com fármacos empregados na terapêutica mostraram-se menos citotóxicos à células normais (linfócitos);
- As alterações morfológicas observadas a partir do tratamento com a resina e látex sugerem morte celular por apoptose via intrínseca e extrínseca após tratamento com ambas as amostras;
- As doses de 125 mg/ kg de resina e de 250 mg/kg de látex promoveram o aumento da sobrevida em 49% e 60% respectivamente, com redução do volume ascítico.
- Os valores de EC50 da resina e látex para avaliação do potencial hemolíco foram elevados quando comparados com a concentração empregada para promover a morte de 50% das células tumorais, sugerindo segurança quanto ao seu uso.
- Ambas as amostras apresentaram atividade mielosupressora granulócitos/macrófagos, entretanto, concentrações basais estimularam o crescimento destas células, constatando efeito hormético.
- Os resultados desse conjunto de experimentos revelaram que a resina floral e látex dos frutos de *Clusia sp* apresentam potencial para pesquisa e produção de medicamentos no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, Phellinus rimosus (Berk) Pilat. **Journal Ethnopharmacoly**, n.84, p.157-162, 2003.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT, L. D. C.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Cancer and cell cicle-specific and cell cicle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALLEN R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 28, p. 463-499, 2000.

AL-SHAWI ,M. K.; OMOTE, H. The remarkable transport mechanism of P-Glycoprotein: a multidrug transporter. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.37, n.6, p.489-496, 2005.

AULT, P. Overview of Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors for Patients With Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia**. Clinical Journal of Oncology Nursing**. v.11, n.1, p.125-129, 2006.

AMPASAVATE, C.; OKONOGI, S.; ANUCHAPREEDA, S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 4, n.1, p.13-21, 2010.

ANDRADE, M. R.; ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v.47, p. 1431, 1998.

ANDRADE-LIMA, D, DE.; MAULE, A. F.; PEDERSEN, T. M.; RAHN, K. Marcgrave Brasilian Herbarium Collected. **Botanisk Tidsskrift**, v.71, p.121-160, 1997.

ARMBRUSTER, W. S. The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. **Botonical Society of America**, Baltimore, v.71, p. 1149–1160, 1984.

AZEVEDO, R. A. Avaliação da atividade proliferativa, antitumoral e hematológica dos peptídeos derivados da caseína INKKI e YPVEPFTE no melanoma experimental. **Dissertação de mestrado**, p.130, 2009.

BANO, D.; YOUNG, K. W.; GUERIN, C.J.; LEFEUVRE, R.; ROTHWELL, N. J.; NALDINI, L.; et al. Cleavage of the plasma membrane Na^{+}/Ca^{2+} exchanger in excitotoxicity. **Cell**, v.120, p.275–285, 2005.

BELLAVITE, P. Biodinâmica e Patologia. **Medicina Biodinamica**. Editora Papirus, p-23, 2002.

BERGANTINI, A. P. F.; CASTRO, F. A. SOUZA, A. M. FEET-CONTE, A. C. Leucemia Mielóide Crônica e o Sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, n.2, p.120-125, 2005.

BITENCOURT, R.; ZALCBERG, I.; LOURO, I. D. Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloidleukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.33, n.6, p.470-475, 2011).

BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E. Flower morphology and pollination biology of some *Clusia* species from the Gran Sabana (Venezuela) **Kew Bull**, v.51, p. 681–694, 1996.

BITTRICH, V.; AMARAL, M.C.E. Floral biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. **Kew Bull**, v.52, p. 617, 1997.

BOLETI, A. P. A.; VENTURA, C. A.; JUSTO, G. Z.; SILVA, R. A.; SOUSA A. C. T.; FERREIRA, C. V.; YANO, T.; MACEDO, M. L. R. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, v. 51, p. 1321-1330, 2008.

BOERSMA, H. H.; KIETTSCLAER, B. L. J. H.; STOLK, L.M. L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A. K.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method of evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Techonologie**, v.28, p.25-30, 1995.

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

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. Resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia and therapeutic approaches to circumvent the problem. **Cardiovascular & Haematological Disorders - Drug Targets**, v.9, n.1, p.21-8. 2009.

BRECCIA, M.; EFFICACE, F.; ALIMENA, G. Imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia: what have we learnd so far? **Cancer Letters**, v. 30, n. 2, p. 115-121, 2011.

CARMO, R. M.; FRANCESCHINELLI, E. V. Polinização e biologia floral de *Clusia arrudae* Planchon & Triana (Clusiaceae) na Serra da Calçada, município de Brumadinho, MG**. Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.3, p.351-360, 2002.

CARVALHO, J. E.; Construindo a história dos produtos naturais. In: **Multiciência**, v.7, n.1, p. 2006.

CEZAROTTO, V. S. Influência da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de Baccharis articulate (Lam) Pers e Achyocline satureioides (Lam) DC. **Dissertação de mestrado**, 97p, 2009

CHENG, K. C.; HUANG, H. C.; CHEN, J. H.; HSU, J. W.; CHENG, H. C.; OU, C. H.; YANG, W. B.; CHEN, S. T.; WONG, C. H.; JUAN, H. F. Ganoderma lucidum polysaccharides in human monocytic leukemia cells: from gene expression to network construction. **BMC Genomics**, v.9, n.8, p.441, 2007.

CHO, Y. S.; CHALLA, S. MOQUIN, D. GENGA, R. RAY, T. D. GUILDFORD, M.; et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v,137, p.1112–1123, 2009.

COOPER, G. M. Câncer. In.: _____ **A célula: uma abordagem molecular**. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2002a. Cap. 15, p. 633- 674.

CORREIA, M. C. R.; ORMOND, W. T.; PINHEIRO, M. C. B.; LIMA, H. A. Estudo da biologia floral de *Clusia cruiva* Camb. Um caso de mimetismo. **Bradea**, v.6, n.24, p.209-219, 1993.

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D. J. Discovery and development of antineoplasic agents from natural sources. **Cancer investigation**, v.17, p.153-163, 1999.

DEGTEREV, A.; HITOMI, J.; GERMSCHEID, M.; CH'EN, I. L.; KORKINA, O.; TENG, X.; et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. **Nature Chemical Biology**, v.4, p.313–321, 2008.

DIAZ-CARBALLO, D.; STRUMBERG, D.; SEEBER, S.; HILGER, R. A. Antitumoral activity of a polyisoprenylated benzophenone (CLU-502) isolated from *Clusia sp*. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 2, p.172, 2004.

DÍAZ-CARBALLO, D.; MALAK, S.; FREISTÜHLER, M.; ELMAAGACLI, A.; BARDENHEUER, W.; REUSCH, H. P. Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**. v.46, n.8, p.428-439, 2008.
DRUKER, B .J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. **Blood**, v.112, n.13, p.4808-4817, 2008.

EBRAHIMNEZHAD, D. S.; AMIRGHOFRAN, Z. Dichloromethane fraction of Melissa officinalis induces apoptosis by activation of intrinsic and extrinsic pathways in human leukemia cell lines. **Immunopharmacoly Immunotoxicoly**, v. 25, p.1-8, 2013.

ENGLER, A. Guttiferae: In Engler, A., Prantl, K. (Eds.), Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Duncker & Humblot. **Berlin**. v. 21, p. 154, 1925.

FARIAS, J. A.; FERRO, J. N.; SILVA, J. P.; AGRA, I, K.; OLIVEIRA, F. M.; CANDEA, A. L.; CONTE, F. P. FERRARI, F. K.; HENRIQUES, M. G.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Modulation of Infl ammatory Processes by Leaves Extract from *Clusia nemorosa* Both *In Vitro* and *In Vivo* Animal Models. **Inflammation**, v.35, n.2, p.764-771, 2012.

FAVA, C.; SAGLIO, G. Can we should improve on frontline imatinibe therapy for chronic myeloid leukemia? **Semin Hematol**, v.47, n. 4, p.443-450, 2010.

FERRARA, F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. **Lancet Oncology**, v. 5, p. 443-50, 2004.

FRITZ, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nature Immunology** n.7, p.1250–1257, 2006.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M. ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M. et al., Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**. v. 19, p.107-120, 2012.

GILES, F. J.; CORTES, J.; JONES BERGSTROM, D.; KANTARJIAN, H.; FREEDMAN, S. J. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. **Blood**, v.109, n.2, p.500-502. 2007.

GORA-TYBOR, J.; ROBAK, T. Targeted Drugs in Chronic Myeloid Leukemia. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p. 3036-3051, 2008.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, n.305 p.626-629, 2004.

GRISWOLD, I. J.; MACPARTLIN, M.; BUMM, T.; GOSS, V. L.; O'HARE T.; LEE, K. A.; CORBIN, A. S.; STOFFREGEN, E. P.; SMITH, C.; JOHNSON, K.; MOSESON, E. M.; WOOD, L. J.; POLAKIEWICZ, R. D.; DRUKER, B. J.; DEININGER, M. W. Kinase domain mutants of BCR-ABL exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. **Molecular Cell Biology**, v.26, n.16, p.6082-6093. 2006.

GUO,, Q.; CHEN, Y.; ZHANG, B.; KANG, M.; XIE, Q.; WU, Y.; **Biochemical Pharmacoly**. v.77, n.11, p.1674-1683, 2009.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, n.2, p.15-20, 2003

GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y. T.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K.C. beta-lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Experimental Hematology**. v. 30, n.7, p.711-720, 2002.

GUSTAFSSON, M. H. G.; BITTRICH, V. Evolution of morphological diversity and resin secretion in flowers of *Clusia* (Clusiaceae): insights form ITS sequence variation. **Nordic Journal of Botany**, v.22, p.183-203, 2002.

GUSTAFSON, K. R.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; MEKEE, T. C.; CARDELINA, J. H.;MEMAHON, J. B.; GRAGG, G. M.; BOYD, M. R. **Terrahedron Letters**, n.48, p.10093-10102, 1992.

HAMERSCHLAK, N.; Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**. v.84, n.4, p.52-57,2008.

HANTSCHEL, O.; RIX, U.; Superti-Furga, G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. **Leukemia & Lymphoma**, v.49, n.4, p.615-61,. 2008.

HE, S.; WANG, L.; MIAO, L.; WANG, T.; DU, F.; ZHAO, L.; et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. **Cell**, v.137,p.1100–1111, 2009.

HIROSE, M.; HOSOI, E.; HAMANO, S.; JALILI, A. Multidrug resistance in hematological malignancy. **Journal of Investigative Medicine**, v.50, n.3-4, p.126-135, 2003.

HOCHHAUS, A.; O'BRIEN, S. G.; GUILHOT, F.; DRUKER, B. J.; BRANFORD, S.; et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic m yeloidleukemia. **Leukemia**, v. 23, p.1054 – 1061, 2009.

HOCHWALLNER, H.; WEBER, A. Flower development and anatomy of *Clusia valerioi*, a Central American species of Clusiaceae offering floral resin. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 201, p.407–418, 2006.

HOFFMEIER, K. 2006. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SYBR_Green_I_Spektrum.png, Acessado em Dezembro de 2011.

HORIKAWA, M. M.; PEÑA, M, S.; Apoptosis and apoptotic mimicry in leishmania : strategies for a successful infection. **Revista da Biologia**, n.6b, p.32-37, 2011.

ICCVAM – INTERAGENCY COORDINATING COMMITEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Report of the International**

Workshop. n.01-4499. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2001.

ICCVAM – INTERAGENCY COORDINATING COMMITEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Test Method evaluation report (TMER): in vitro cytotoxicity test methods for estimation starting doses for acute oral systemic toxicity tests. NIH publication**. No. 07-4519. Research triangle park, NC: National institute for environmetal health sciences, 2006.

INCA. Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2010. Distribuição Ministério da Saúde, 2012.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. *In vitro* cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacoly**. v. 90, p.33-8, 2004.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. C.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123**. Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.77, n.2, p.990-994, 1980.

KANTARJIAN, H.; GILES, F.; WUNDERLE, L.; BHALLA, K.; O'BRIEN, S.; WASSMANN, B.; TANAKA, C.; MANLEY, P., RAE, P.; MIETLOWSKI, W.; BOCHINSKI ,K.; HOCHHAUS, A.: GRIFFIN, J. D.: HOELZER, D.; ALBITAR, M.; DUGAN, M.; CORTES, J.; ALLAND, L.; OTTMANN, O. G. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n.24, p.2542-2551, 2006.

KANZAWA, T.; KONDO, Y.; ITO, H.; GERMANO, I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. **Cancer Research**, n.63, p.2103-2108, 2003.

KESTON, A. S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**., v.11, p. 1-5, 1965.

KINSTRIE, R.; COPLAND, M. Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. **Current Hematologic Malignancy Reports**. v. 8, p. 14-21, 2013

KUROSU, T.; TSUJI, K. T.; KIDA, A.; KOYAMA, T.; YAMAMOTO, M.; MIURA, O. Rottlerin synergistically enhances imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells through its mitochondrial uncoupling effectindependent of protein kinase C- δ. **Oncogene**, v.26, p.2975-2987, 2007.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W .S.; GOLSTEIN, P. PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P. et al. Classification of cell death: recommendations of

the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v.12 (Suppl 2), p.1463–1467, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L. BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death**. Physiological Reviews**, v.87, p.99–163, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v.16 : p.3–11, 2009.

KRUIDERING, M.; EVAN, G. L. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?, **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v.50, n.2, p.85-90, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ROBBINS, S. L., CONTRAN, R. S. **Pathology basis of disease**. 7ed. China:WB Saunders, 2004, 1552p.

KURAMATO, A. C. K.; SILVA, A. E. B. B.; ULBRICH, A. Desenvolvimento de abordagens moleculares para o estudo da transformação maligna por BCR-ABL: da genômica a novos quimioterápicos. In: **1 ° Prêmio Saúde Oncologia da América Latina**; 2006.

KUROKAWA, M.; KORNBLUTH, S. Caspases and kinases in a death grip. **Cell**, v.138, n.5, p.838-54. 2009.

KURZROCK,. R.; KANTARJIAN, H. M.; DRUKER, B. J.; TALPAZ, M. Philadelphia chromosomepositive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Annals of Internal Medicine**, v.138, n.10, p.819-830, 2003.

LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.20, p.3145-3167, 2008.

LEE, U. J.; CHOUG, S. R.; PRAKASH, K. V.; LEE, E. J.; LEE, M. Y. Dual knockdown of p65 and p50 subunits of NF-kappaB by siRNA inhibits the induction of inflammatory cytokines and significantly enhance apoptosis in human primary synoviocytes treated with tumor necrosis factor-alpha. **Molecular Biology Reports**,v35, n.3, p.291-298, 2008

LI, J.; YUAN J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, n.27, p.6194–6206,2008

LICTH, J. D.; STERNBERG, D. W. The Molecular Pathology of Acute Myeloid Leukemia, **Hematology**. v.2005, n.1, p.137-142, 2005.

LIU, G.; YAN, X.; TUNICI, P.; NG, H.; ABDULKADIR, I. R.; LU, L.; IRVIN, D.; BLACK, K. L.; YU, J. S. Analysis of gene expression and chemoresistance of

CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular Cancer**, v.2, n.5, p.67, 2006

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths**. J Insect Physiol,** v.10 p.643–649, 1964.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, v.256, p.19-26, 2000.

LOKVAM, J.; BRADDOCK, J. P. 2. Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Oecologia**, 119 , p. 534–540, 1999.

LOPES, A. V.; MACHADO, I. C. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v.213, p. 71, 1998.

MARCHETTI, G. M. Anticancer activity of *Calea pinnatifida* banks leaves crude extract and fractions. **Dissertação de mestrado**, p.107, 2008.

MARQUES, E. J.; EL-BACHÁ, R. S.; CRUZ, F. G. Efeito citotóxico de extratos e frações de *Clusia criuva* sobre a atividade de células GL-15 de glioblastoma humano. **Phytochemistry**, v55, n35, 2000.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**. v.123, p.439-445, 2009.

MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic Myeloid Leukemia. **American Society of Hematology**, p.132-152, 2003.

MIURA, M.; ZHU, H.; ROTELLO, R.; HARTWIEG, E. A.; YUAN, J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-convertingenzyme, a mammalian homologof the C. elegans cell death gene ced-3. **Cell**. n.75, p.653–660, 1993.

MOURA, A. C. G.; PERAZZO, F. F.; MOURA, E. L. The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term in vivo assays. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.4, p.1360-1368, 2008.

MOURA, S. S. Avaliação de toxicidade aguda e subaguda de um novo protótipo candidato a fármaco cardiovascular. **Dissertação de mestrado**, p.119, 2012

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v.65, p55-63, 1983.

MOTHY, M.; LABOPIN, M.; BOIRON, J. M.;THEORIN, N.; FAUSER, A.; RAMBALDI, A. Reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic stem cell transplantation (allo-STC) for patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL): A survey from European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). **Blood**, n. 106, Abstract, 2005.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural produtcs as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Procuts**, v.70, p. 461-477, 2007

NIRMALA, M. J.; SAMUNDEESWARI, A.; SANKAR, P. D., Natural plant resources in anti-cancer therapy-A review, **Research in Plant Biology**, v.1, n.3, p.1-14, 2011.

NOGUEIRA, P. C. L.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G. J.; LOPES, A. V. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, v.56, p.443-542, 2001.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 474- 478, 2008.

O'CONNOR, R. The pharmacology of cancer resistance. **Anticancer Research**, v.27, n.3A, p.1267-1272, 2007.

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.L.M.; BITTRICH, V.; VENCATO, I.; MARSAIOLI, A.J.. Floral resins of *Clusia spp*.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letter**, v.37, p. 6427, 1996.

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.L.M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A.J. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v.50, p. 1073, 1999.

OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de Punica granatum L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.201-207, 2010.

OLIVEIRA, R. F.; CAMARA, C. A.; DE AGRA, M. F.; SILVA, T. M. Biflavonoids from the unripe fruits of *Clusia paralicola* and their antioxidant activity. **Natural Product Communications**. v.7, n.12, p. 1597-1600, 2012.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell Death Differ**, v.10, n.1, p.26-35, 2003

PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M.B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M.; BARONEE, V.; RASTRELLI, L. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v.61, p.8206–8211, 2005.

PLANCHON, J.E.; TRIANA, J. Memoire sur la famille des Guttifères. **Annales des Sciences Naturelles**. sér. 4, Bot., v.13, p. 306, 1860.

POPOLO, A.; PICCINELLI, A. L.; MORELLO, S. SORRENTINO, R, OSMANY, C. R.; RASTRELLI, L.; PINTO, A. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.89, n.1, p.50-57, 2011.

PORTO, A. L. M.; MACHADO, S. M. F.; OLIVEIRA, C. M. A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C.;MARSAIOLI, A. J. Polyisoprenylated benzophenones from Clusia floral resins. **Phytochemistry**, v. 55, n.7, p.755-768, 2000.

REDAELLI, A.; BELL, C.; CASAGRANDE, J. STEPHENS, J.; BOTTEMAN, M.; LASKIN, B.; PASHOS, C. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.4, n.1, p.85-96, 2004.

RIBEIRO, P.R.; FERRAZ, C.G.; GUEDES, M.L.; MARTINS, D. CRUZ, F.G. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. **Fitoterapia**, v.82, n.2, p.1237-1240, 2011.

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

ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**, Ed. Cambrige University Press, 19119, N. Y., 1989.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M. C.; MARQUES-SANTOS, L. F.; MAIA, R. C.; CAPELLA, M. A. M. Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.73, n.1, p.57-69, 2000.

SACOMAN, J. L. Atividade anticâncer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) e *Potomorphe umbellata* (L.) Miquel (piperaceae). 2007.124 p. **Dissertação de Mestrado em Biologia celular e estrutural**, Universidade Estadual de Campinas.

SÁNCHES-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 76, p.270-276, 1998.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, n.45, p.528-537, 2000.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.340, n. 17, p.1330-1340, 1999.

SCHWEICHEL, J. U.; MERKER, H. J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues**. Teratology**, v.7, p.253–266, 1973.

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **The Indian Journal of Medical Research**. n.3, p.233-244, 2006.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. V. B. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

SILVA, G. C.; PILGER, D. A.; CASTRO, S. M, WAGNER, S. C. Laboratory diagnosis of acute myeloid leukemias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 77-84, 2006.

SILVA, M. C.; PAIVA, S. R. Antioxidant activity and flavonoid content of Clusia fluminensis Planch. & Triana. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v.84, n.13, p.609-613, 2012.

SIMPSON, B.B.; NEFF J.L. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar **Ann. Missouri Bot. Gard**., v.68, p. 301–322, 1981.

SOVERINI, S.; MARTINELLI, G.; ROSTI, G.; IACOBUCCI, I.; BACCARANI, M. dvances in treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitors: the evolving role of Bcr–Abl mutations and mutational analysis. **Pharmacogenomics**, v.13, n.11, p1271–1284, 2012.

SZAKACS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, n.3, p.219-234, 2006.

TALPAZ, M.; SHAH, N. P.; KANTARJIAN, H.; DONATO, N.; NICOLL, J.; PAQUETTE, R.; CORTES, J.; O'brien, S.; NICAISE, C.; BLEICKARDT, E.; BLACKWOOD-CHIRCHIR, M. A.; IYER, V.; CHEN, T. T.; HUANG, F.; DECILLIS, A. P. Sawyers C.L. Desatinibe in imatinibe-resistant philadelfia chromossome-positive. Leukemias,.**The New England Journal of Medicine**, v.354,n.24, p.2531-2541, 2006.

VALADARES, M. C. he use of clonal culture of hematopoietic progenitors in the investigation of the potential myelossuppresive of new chemicals. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, n.1, p.34-51, 2004

ZHANG, D. W.; SHAO, J. LIN, J.; ZHANG, N. L. U.; B. J.; LIN, S. C.; et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. **Science**, p.325: 332–336, 2009.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q.; THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes & Development**, v.18, p.1272–1282, 2004.

ZOU, H.; HENZEL, W. J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**. n.90, p.405–413, 1997.

YU, F. S.; HUANG, A. C.; YANG, J. S.; YU, C. S.; LU, C. C.; CHIANG, J. H.; CHIU, C. F.; CHUNG, J. G. Safrole induces cell death in human tongue squamous cancer SCC-4 cells through mitochondria-dependent caspase activation cascade apoptotic signaling pathways. **Environmental Toxicology**, 17. doi: 10.1002/tox.20658. [Epub ahead of print], 2011.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v.296, p.1635–1636, 2002.

Wang K, Li J, Degterev A, Hsu E, Yuan J, Yuan C. Structure–activity relationship analysis of a novel necroptosis inhibitor, Necrostatin-5. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p.1455–1465, 2007.

WARMUTH, M.; SIMON, N.; MITINA, O.; MATHES, R.; FABBRO, D.; MANLEY, P. W.; BUCHDUNGER, E.; FORSTER, K.; MOAREFI, I.; HALLEK, M. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant BCR-ABL kinases. **Blood**, v.101, n.2, p.664-672. 2003.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFG

PROTOCOLO
137/2009

Goiânia, 10 de fevereiro de 2010

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título **do projeto**: "Investigação do potencial antitumoral in vivo e in vitro de ativos de origem natural e sintética"

Pesquisador **Responsável:** Profª. Marize Campos Valadares Bozinis

Pesquisadores **Participantes:** Profª. Eliana Martins Lima, Alexandre Pereira dos Santos, Marcelo de Souza Vieira, Erika Crispim Resende, Wanessa Machado Andrade, Fabiana Bettanin Costa.

Local **de realização:** Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular (LFTC)
Faculdade de Farmácia (UFG)
Núcleo de Estudo e Pesquisas Tóxicos- Farmacológicas (NEPET)

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou,** o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

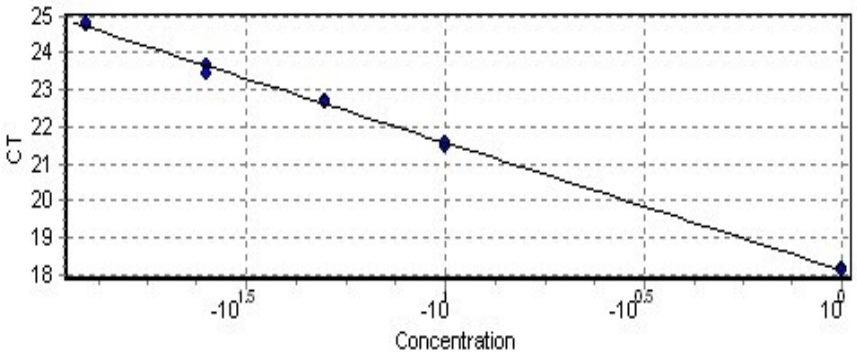
O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões) de acordo com as recomendações da Resolução 196/96.

Profa Dra Rita Goreti Amaral
Coordenadora do CEP/UFG

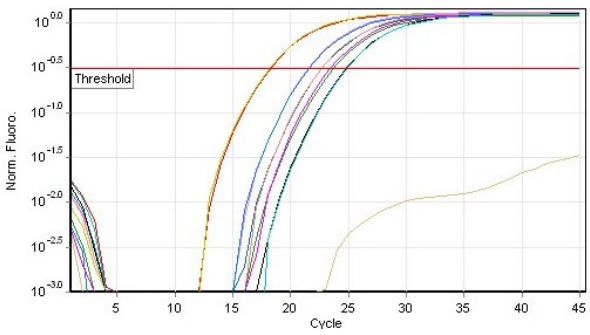
Anexo 2 – Outros anexos específicos de pesquisa

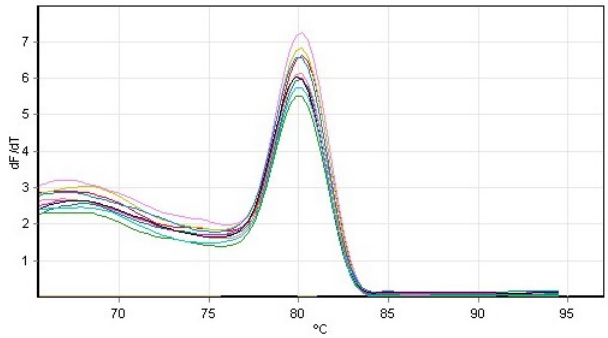
Anexo 2.1 Fotografia de eletroforese em gel de agarose. A figura ilustra as bandas 18Se 28S das amostras de RNA obtidas das células K562 tratadas e não tratadas com a resina floral e látex do fruto de Clusia sp, sem indicação de degração ou contaminação por DNA

Anexo 2.2 Curva de Calibração, Curva-padrão e melt para o gene ß-actina fornecida pelo aparelho Rotor-Gene G

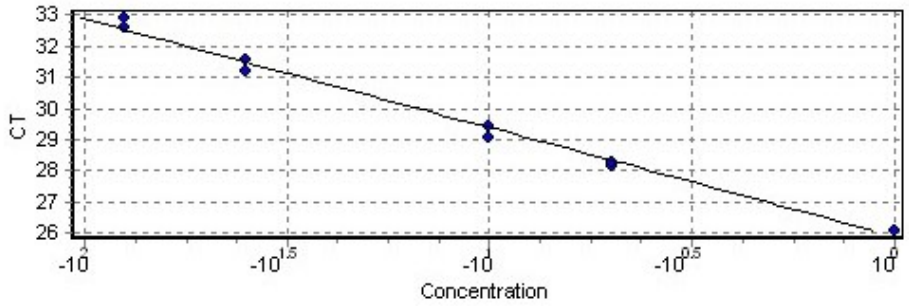
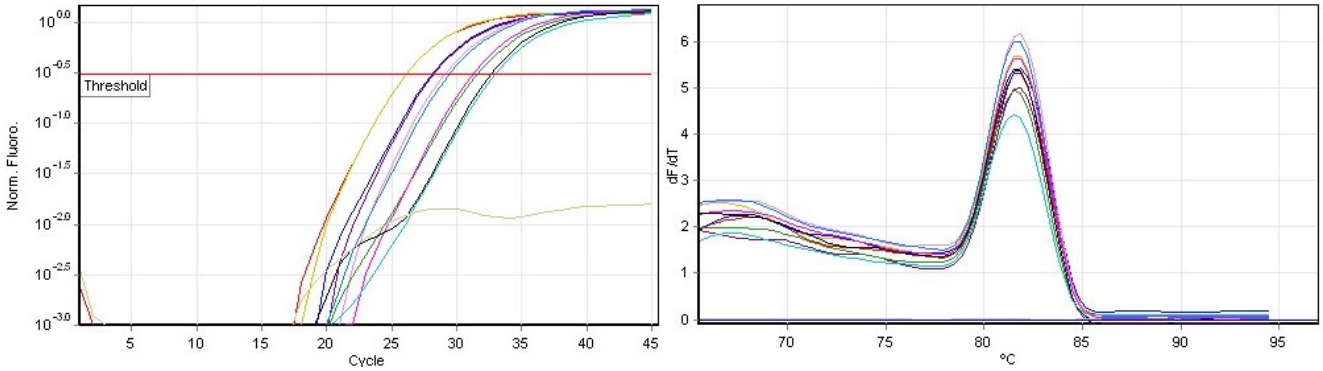


R^2 = 0.99823
Eficiência da reação = 0,95
CT = -3.445





Anexo 2.3 Curva de Calibração, Curva-padrão e melt para o gene Caspase-8 fornecida pelo aparelho Rotor-Gene G



R^2 = 0.99191
Eficiência da reação = 0,93
CT = -3.484