

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

WANESSA MACHADO ANDRADE

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE)**

Goiânia

2011

**WANESSA MACHADO ANDRADE**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DA *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marize Campos Valadares Bozini.

**Co-orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. José Realino de Paula.

Goiânia

2011

**Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais (RÔMULO PIRES DE ANDRADE e ADELY APARECIDA MACHADO ANDRADE), à minha irmã (LARISSA MACHADO ANDRADE) e ao meu noivo (MARCOS JAMES DE OLIVEIRA VERAS) que sempre me ofereceram, de forma intensa e incondicional, todo o amor e companheirismo que precisei. Vocês são as minhas maiores riquezas! E esta conquista também é de vocês!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por não ter me deixado faltar saúde, paciência e força, além de nunca ter me desamparado durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis, pela oportunidade a mim concedida, além da credibilidade e confiança. Muito obrigada pela orientação, atenção e amizade. A tenho como exemplo profissional e humano a ser seguido e dedico sincera admiração, respeito e carinho!

Ao professor Dr. José Realino de Paula pela co-orientação, pela credibilidade e principalmente pela parceria. Graças ao senhor me senti amparada ao precisar realizar alguns trabalhos no LPPN. Um laboratório que admiro pela simplicidade, competência e união de seus freqüentadores. Dessa maneira, sou extremamente grata à atenção e à receptividade dos colegas do LPPN, em especial do Renê Oliveira do Couto.

A todos os professores que de maneira menos ou mais intensa contribuíram para minha formação.

Ao colega que com o tempo tornou-se um amigo, Alexandre Pereira dos Santos, por toda atenção, dedicação, companheirismo, cumplicidade e auxílio técnico e intelectual. Você me ensinou muito e por isso serei eternamente grata!

À colega Polyana Lopes Benfica, que também no decorrer do trabalho tornou-se uma amiga. Muito obrigada pela atenção, disponibilidade, conselhos e ensinamentos! Você terá sempre a minha admiração!

Ao colega Ramias Vieira Calixto Freire pelo auxílio na coloração histológica.

E novamente, agradeço aos meus pais, meu porto seguro, por todo apoio, educação, amor e dedicação. Muitas vezes se abdicaram de seus sonhos para me proporcionar uma formação. Sem a ajuda de vocês eu não seria quem sou e não teria conseguido realizar com êxito esta etapa!

A minha irmã, Larissa, pela amizade, paciência e por sempre acreditar em minha capacidade. Suas palavras sempre me tranquilizam e fortalece!

Ao meu noivo, Marcos, por todo amor, paciência, companheirismo e compreensão. Por estar sempre disponível para qualquer coisa que eu solicitar. Por me levar e buscar no laboratório. Por muitas vezes ficar comigo nos finais de semana me ajudando a realizar algum teste e a cuidar dos animais no biotério. Você também é

meu porto seguro, minha fonte de inspiração e meu amor. Muito obrigada por me fazer tão feliz!

Aos colegas de laboratório Alane Pereira Cortez, Alexandre Pereira dos Santos, Fabiana Bettanin Costa, Fabrícia Saba Ferreira, Fernanda Stegar de Oliveira Costa Macêdo, Flávio Silva de Carvalho, Juliana Romano Troncoso Chaves, Larissa Cleres Moreira, Marcelo de Sousa Vieira, Mariana Flávia da Mota, Marilisa Pedroso Nogueira Gaeti, Paulo Henrique Ávila, Polyana Lopes Benfica, Relton Romeis de Oliveira, Renato Ivan de Ávila, Soraia Santana de Moura que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho. Realmente o LFTC conta com uma equipe eficiente, dedicada, solícita, competente e divertida! Tornamo-nos uma família durante o tempo que realizamos nossos trabalhos!

A secretária Fernanda Maura Ferreira Bellato pela atenção, cuidado, paciência, carinho e prontidão em sempre nos atender e ajudar.

A todos os demais amigos e familiares que estiveram ao meu lado, me acompanhando, torcendo e incentivando!

Ao CNPQ pela ajuda financeira que foi indispensável e de grande importância!

**“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória,  
é Dele a vitória alcançada em minha vida!  
Tudo é do Pai, se sou fraco e pecador,  
bem mais forte é o meu Senhor!”**

Frederico Cruz

**“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”**

Augusto Cury

## Resumo

Na busca por novos agentes antineoplásicos os produtos de origem natural têm um papel de destaque, uma vez que cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo são obtidos de plantas e aproximadamente 49% dos fármacos desenvolvidos nas últimas três décadas foram obtidos a partir de produtos naturais. *Eugenia dysenterica* DC. pertence à família Myrtaceae e é conhecida popularmente como “cagaita”, sendo empiricamente utilizada no Brasil para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e diabetes. Neste trabalho foram investigados a citotoxicidade e os mecanismos de indução de apoptose do extrato padronizado hidroalcoólico das folhas da *E. dysenterica* DC. sobre células leucêmicas HL60 e K562, atividade antitumoral *in vivo* em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich (TAE), bem como a atuação do extrato frente a células basais, como fibroblastos e eritrócitos, além do perfil de toxicidade oral aguda em camundongos. Os estudos de citotoxicidade foram realizados por meio dos ensaios de exclusão do azul de tripano e redução do tetrazólio (MTT). Os mecanismos de indução de apoptose celular foram investigados por microscopia de luz e de fluorescência e por citometria de fluxo. A investigação do potencial antitumoral *in vivo* foi feita através da curva de sobrevivência utilizando camundongos portadores do TAE tratados com diferentes doses do extrato padronizado hidroalcoólico das folhas da *E. dysenterica* DC. Os ensaios de segurança foram realizados pelo método de incorporação do corante vermelho neutro em células 3T3 (fibroblastos de camundongos), potencial hemolítico utilizando sangue de carneiro e toxicidade oral aguda de acordo com o guia OECD 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student e curva de Kaplan Meier para a análise da curva de sobrevivência. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . O extrato da *E. dysenterica* DC. foi citotóxico para as células leucêmicas HL60 e K562. A análise morfológica das células K562 indicou que o tratamento com o extrato hidroalcoólico da planta induziu morte celular por apoptose. A apoptose foi constatada também pelo aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, pela redução do potencial de membrana mitocondrial, pela externalização da fosfatidilserina, pela saída de citocromo c da mitocôndria, pela modulação de Bax/Bcl2, pela redução de NFκB e pela ativação das caspases 3 e 8. O extrato da planta também apresentou citotoxicidade concentração-dependente frente às células basais 3T3, porém essa citotoxicidade foi cerca de 7 e 2 vezes menor que para as células leucêmicas HL60 e K562, respectivamente. O extrato não provocou hemólise e nem causou toxicidade nos camundongos tratados com a dose de 2000 mg/Kg, apresentando toxicidade classe 5. A partir da análise dos resultados foi possível concluir que o extrato padronizado hidroalcoólico das folhas da *E. dysenterica* DC. apresenta atividade citotóxica e indutora de apoptose em células K562 e HL60, atividade antitumoral *in vivo* em camundongos com TAE, além de apresentar perfil de segurança *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Eugenia dysenterica* DC.; Myrtaceae; produtos naturais; apoptose; K562; HL60; Tumor ascítico de Ehrlich.

## Abstract

In the search for new antineoplastic agents from natural products have an important role, since about 25% of prescribed drugs worldwide are obtained from plants and approximately 49% of drugs developed in the last three decades were obtained from natural products. *Eugenia dysenterica* DC. belongs to the Myrtaceae family and is popularly known as "cagaita" and is empirically used in Brazil for the treatment of intestinal disorders and diabetes. The present study investigated the cytotoxicity, the mechanisms of apoptosis induction of *E. dysenterica* DC. on HL60 and K562 leukemic cells, the antitumor activity *in vivo* in mice with Ehrlich ascites tumor (EAT), as well as the action of the extract against basal cells, fibroblasts and erythrocytes and the profile of acute oral toxicity in mice. The cytotoxicity studies were carried out by testing for trypan blue exclusion and reduction of tetrazolium (MTT). The mechanisms of induction of apoptosis were investigated by light microscopy and fluorescence and by flow cytometry. The investigation of potential antitumor *in vivo* was done by using the survival curve of mice bearing EAT treated with different doses of padronized hydroalcoholic extract from the leaves *E. dysenterica* DC. And the safety tests were performed by the method of incorporation of neutral red dye in 3T3 cells (fibroblasts mice), hemolytic potential using sheep blood and acute oral toxicity according to OECD Guide 423 "Acute Oral Toxicity Class", 2001. Data were analyzed by Student's *t* test and Kaplan Meier analysis of survival curve. Means were considered statistically significant when  $P < 0.05$ . *E. dysenterica* DC. was cytotoxic to HL60 and K562 cells and morphological analysis of K562 cells indicated that treatment with the hydroalcoholic extract of the plant induced cell death by apoptosis. Apoptosis was also evidenced by increased generation of reactive oxygen species, reduction of the mitochondrial membrane potential, externalization of phosphatidylserine, release of cytochrome c from mitochondria, modulation of the BAX/BCL2, reduction of the NF $\kappa$ B expression and activation caspases 3 and 8. The plant extract also showed concentration-dependent cytotoxicity against 3T3 basal cells, but this cytotoxicity was about 7 and 2 times lower than for HL60 and K562 leukemic cells, respectively. The extract did not cause hemolysis and caused no toxicity in mice treated with a dose of 2000 mg/kg, showed toxicity class 5. The presented data showed that hydroalcoholic extract of leaves *E. dysenterica* DC. had cytotoxic activity to HL60 and K562 leukemic cells and induced these cells to apoptosis, besides presenting antitumor activity in mice EAT-bearing and present safety profile *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** *Eugenia dysenterica* DC.; Myrtaceae; natural products; apoptosis; K562; HL60; Ehrlich ascitic tumor.

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 CÂNCER.....	12
1.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA .....	14
1.3 MORTE CELULAR / APOPTOSE.....	16
1.4 CICLO CELULAR .....	29
1.5 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS .....	33
1.6 FAMÍLIA MYRTACEAE NO CONTEXTO DO CÂNCER .....	37
1.7 <i>Eugenia dysenterica</i> DC. ....	40
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	42
2.2 OBJETIVO GERAL .....	42
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 FLUXOGRAMA.....	43
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO PADRONIZADO DE <i>Eugenia dysenterica</i> DC. ....	43
3.2.1 Preparo das soluções estoque e uso do extrato padronizado de <i>Eugenia dysenterica</i> DC. para os testes <i>in vitro</i> .....	44
3.3 LINHAGENS CELULARES.....	44
<b>3.3.1 Linhagem K562</b> .....	44
<b>3.3.2 Linhagem HL-60</b> .....	45
<b>3.3.3 Linhagem 3T3</b> .....	45
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE <i>Eugenia dysenterica</i> DC. SOBRE AS LINHAGENS HL60 E K562 PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPANO E PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO TETRAZÓLIO (MTT) .....	46
<b>3.4.1 Preparo da suspensão celular</b> .....	46
<b>3.4.2 Plaqueamento</b> .....	47
3.5 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR.....	49
<b>3.5.1 Morfologia celular com corante Rosenfeld</b> .....	50
3.5.1.1 Preparo da solução de Rosenfeld.....	50
3.5.1.2 Preparo das lâminas .....	50
3.5.1.3 Coloração das lâminas .....	50
3.5.1.4 Índice de células com fragmentação na cromatina .....	51
<b>3.5.2 Avaliação da morfologia celular com corante Hoechst 33342</b> .....	51
3.5.2.1 Preparo da solução de Hoechst 33342 .....	51
3.5.2.2 Coloração das lâminas .....	51
3.6 EFEITOS DE <i>E. dysenterica</i> DC. SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	51
<b>3.6.1 Análise da expressão de ciclina D1</b> .....	52
3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INDUTOR DE APOPTOSE DE <i>E. dysenterica</i> E OS MECANISMOS DE INDUÇÃO DE APOPTOSE .....	53
<b>3.7.2 Avaliação de estresse oxidativo pelo aumento da geração de ERO intracelular</b> .....	53

3.7.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	54
3.7.4 Estruturas envolvidas no processo apoptótico: bax, bcl2, TNF-R1, FAS, NF $\kappa$ B e citocromo c .....	55
3.7.4 Detecção da externalização da fosfatidilserina através da marcação com anexina V- FITC .....	56
3.7.5 Atividade das caspases 3 e 8 .....	56
3.8 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i> .....	57
3.8.1 Animais .....	57
3.8.2 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) .....	57
3.8.3 Realização da curva de sobrevida .....	58
3.9 ENSAIOS DE SEGURANÇA .....	59
4.9.1 Avaliação do potencial hemolítico .....	59
3.9.2 Ensaio de incorporação do vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) em linhagem basal 3T3.....	60
3.9.1.1 Preparo da suspensão celular .....	61
3.9.1.2 Plaqueamento.....	61
4.9.3 Avaliação da Toxicidade Oral Aguda do extrato padronizado hidroalcolico das folhas de <i>E. dysenterica</i> CD.....	63
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1 – Artigo .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estimativa mundial de incidência de câncer .....	14
<b>Figura 2:</b> A translocação cromossomal e os oncogenes associados na LMC. ....	15
<b>Figura 3:</b> Alterações morfológicas na necrose apoptose.....	18
<b>Figura 4:</b> Vias Extrínseca e Intrínseca da apoptose .....	21
<b>Figura 5:</b> Indução da apoptose pelo aumento da geração de ERO intracelular. ....	26
<b>Figura 6:</b> Externalização da fosfatidilserina em células apoptóticas.....	28
<b>Figura 7:</b> Ciclo celular e os pontos de checagem .....	30
<b>Figura 8:</b> Árvore de <i>Eugenia dysenterica</i> DC. ....	41
<b>Figura 9:</b> Método de exclusão do azul de tripano. ....	47
<b>Figura 10:</b> Método de redução do MTT .....	48
<b>Figura 11:</b> Teste de hemólise .....	60
<b>Figura 12:</b> Método de captura do corante vermelho neutro .....	63
<b>Figura 13:</b> Procedimento para classificação de toxicidade oral aguda iniciando com a dose de 2000 mg/Kg. Fonte: OECD 423, 2001. ....	65

#### **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:**

ABL	gene <i>Abbelson murine leukemia</i>
ABL	proteína <i>Abbelson murine leukemia</i>
AIF	Fator indutor de apoptose ( <i>apoptosis-inducing factor</i> )
ANT	Translocador de nucleotídeo adenina
Apaf-1	Fator 1 de ativação de proteases de apoptose ( <i>apoptotic protease-activating factor-1</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bad	Promotor de morte associado a Bcl-XL/Bcl-2 ( <i>Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter</i> )
Bak	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma 2 de célula B ( <i>B-cell lymphoma 2</i> )
Bcl-w	Membro anti-apoptótico da família Bcl-2
Bcl-XL	Variante longa de Bcl-X
Bcl-XS	Variante curta de Bcl-X
BCR	gene <i>Breakpoint cluster region</i>
BDC	proteína <i>Breakpoint cluster region</i>
BH1	Domínio homólogo a Bcl-2 1
BH2	Domínio homólogo a Bcl-2 2
BH3	Domínio homólogo a Bcl-2 3
BH4	Domínio homólogo a Bcl-2 4
Bid	Agonista de BH3 que interage com o domínio de morte
Bik	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2
Bim	Mediador celular que interage com Bcl-2
Boo	Membro anti-apoptótico da família Bcl-2
CARD	Domínio de recrutamento de caspase ( <i>caspase recruitment domains</i> )
Caspases	Proteases baseadas em cisteína ( <i>Cysteine-aspartic-acid-proteases</i> )
CD 95	Receptor de morte celular ( <i>cell death</i> ) também chamado de Fas ou Apo-1
CDK	Quinases ciclina-dependentes ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
CI50	Concentração inibitória para 50% das células ( <i>inhibitory concentration</i> )
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína-diacetato
DD	Domínio de morte ( <i>death domain</i> )
DED	Domínio efetor de morte ( <i>death Effector Domain</i> )
DIABLO	Proteína mitocondrial que inibe proteínas inibidoras de apoptose
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte ( <i>death- inducing signalling complex</i> )
DMEM	Meio de cultura ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FACS	( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> )
FADD	Domínio de morte associado a FAS ( <i>FAS-associated death domain containing protein</i> )
FAS	Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
Fase G0	Fase <i>gap</i> 0 do ciclo celular
Fase G1	Fase <i>gap</i> 1 do ciclo celular
Fase G2	Fase <i>gap</i> 2 do ciclo celular
Fase M	Fase de mitose do ciclo celular
Fase S	Fase de síntese de DNA do ciclo celular
FASL	Ligante de FAS
FA	Fase aguda da Leucemia Mielóide Crônica
FB	Fase blástica da Leucemia Mielóide Crônica
FC	Fase crônica da Leucemia Mielóide Crônica
FF	Faculdade de Farmácia
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
GHS	Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos ( <i>Global Harmonized System</i> )
IAP	Proteína inibidora de apoptose ( <i>inhibitor of apoptosis proteins</i> )
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interinstitucional sobre a Validação de Métodos Alternativos ( <i>Interagência Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> )
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Intraperitonal

IQUEGO	Indústria Química do Estado de Goiás
Ki67	Proteína nuclear expressa em células em proliferação
LFTC	Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
Mcl-1	Proteína anti-apoptótica relacionada a Bcl-2 ( <i>myeloid cell leukemia</i> )
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]
NCCD	Comitê de nomenclatura em morte celular ( <i>Nomenclature Committee on Cell Death</i> )
NF $\kappa$ B	Fator nuclear do <i>locus</i> $\kappa$ de imunoglobulina em células B ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
NGF	Fator de crescimento neuronal ( <i>nerve growth factor</i> )
Omi/HtrA2	Proteína mitocondrial requerida em altas temperaturas
PA	Padrão analítico
PBS	Tampão fosfato salina ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PBS-BSA	PBS com albumina sérica bovina
PBS-T20	PBS com 0,05% de Tween 20
PE	Ficoeritrina ( <i>phycoerythrin</i> )
PI	Iodeto de propídio ( <i>propidium iodide</i> )
PS	Fosfatidilserina ( <i>phosphatidylserine</i> )
PTP	Poros de transição de permeabilidade (da membrana mitocondrial)
Puma	Modulador de apoptose regulado pela proteína p53
Rh 123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
SE	Solução de eritrócitos
SFB	Soro Fetal Bovino
SMAC	Segundo ativador mitocondrial de caspases ( <i>second mitochondria derived activator of caspases</i> )
TAE	Tumor ascítico de Ehrlich
TNF	Fator de necrose tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRADD	Receptor 1 de TNF associado ao domínio de morte ( <i>TNF-associated death domain</i> )

TRAIL	Ligante relacionado ao fator de necrose tumoral ( <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> )
TRAIL-R1	Receptor 1 indutor de apoptose, membro da família TNF
TRAIL-R2	Receptor 2 indutor de apoptose, membro da família TNF
UFG	Universidade Federal de Goiás
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER

O câncer resulta de alterações nos mecanismos reguladores responsáveis pelo comportamento normal das células, as quais passam a se dividir descontroladamente, disseminando pelo corpo e comprometendo as funções teciduais normais. As células tumorais possuem um acúmulo de anormalidades genéticas em seus sistemas reguladores, resultando em uma perda generalizada do controle do crescimento (SACOMAN, 2007; STRICKER & KUMAR, 2008). Portanto, pode-se afirmar que o câncer é uma doença genética (KUMAR et al., 2008; PEREIRA, 2009).

Uma lesão genética nas células somáticas pode ser adquirida por agentes ambientais como substâncias químicas, radiação ou vírus ou pode ser herdada na linhagem germinativa (STRICKER & KUMAR, 2008). E os principais alvos dessa lesão englobam quatro classes de genes reguladores normais: os protooncogenes promotores do crescimento, os genes supressores do tumor e inibidores do crescimento, os genes que regulam a morte celular programada e os genes envolvidos no reparo do DNA. Basicamente, lesões ocasionadas nesses genes acarretam em mutações e conseqüente desenvolvimento neoplásico (STRICKER & KUMAR, 2008; PEREIRA, 2009).

Para o desenvolvimento de um tumor as células normais tornam-se auto-suficientes quanto aos sinais mitogênicos, insensíveis aos sinais inibitórios de proliferação, perdem a capacidade de executar apoptose, apresentam capacidade de replicação ilimitada, promovem angiogênese e difundem para outros tecidos criando sítios metastáticos (FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009). Todas essas transformações culminam com a formação de uma massa tumoral devido ao desequilíbrio entre os processos de proliferação, diferenciação e morte celular.

As neoplasias ou tumores podem ser classificados de acordo com diferentes critérios: pelo comportamento clínico (benigno ou maligno), pelo aspecto microscópico (critério histomorfológico) ou pela origem da neoplasia (critério histogenético). O critério mais usado é o histomorfológico, no qual a neoplasia é identificada pelo tecido ou célula que está se proliferando. Neste sentido, normalmente, o sufixo *oma* é empregado em qualquer neoplasia (benigna ou maligna), a palavra carcinoma, para denominar as neoplasias malignas epiteliais e

a palavra sarcoma para indicar as neoplasias malignas mesenquimais (**Quadro 1**). Porém, a denominação de alguns tumores exclui tais palavras, como leucemia (tumor maligno de células do sangue) e nevo (tumor benigno do sistema melanógeno) (FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009). Os carcinomas incluem aproximadamente 90% dos cânceres humanos, as leucemias 8% e os sarcomas são raros em humanos (SACOMAN, 2007).

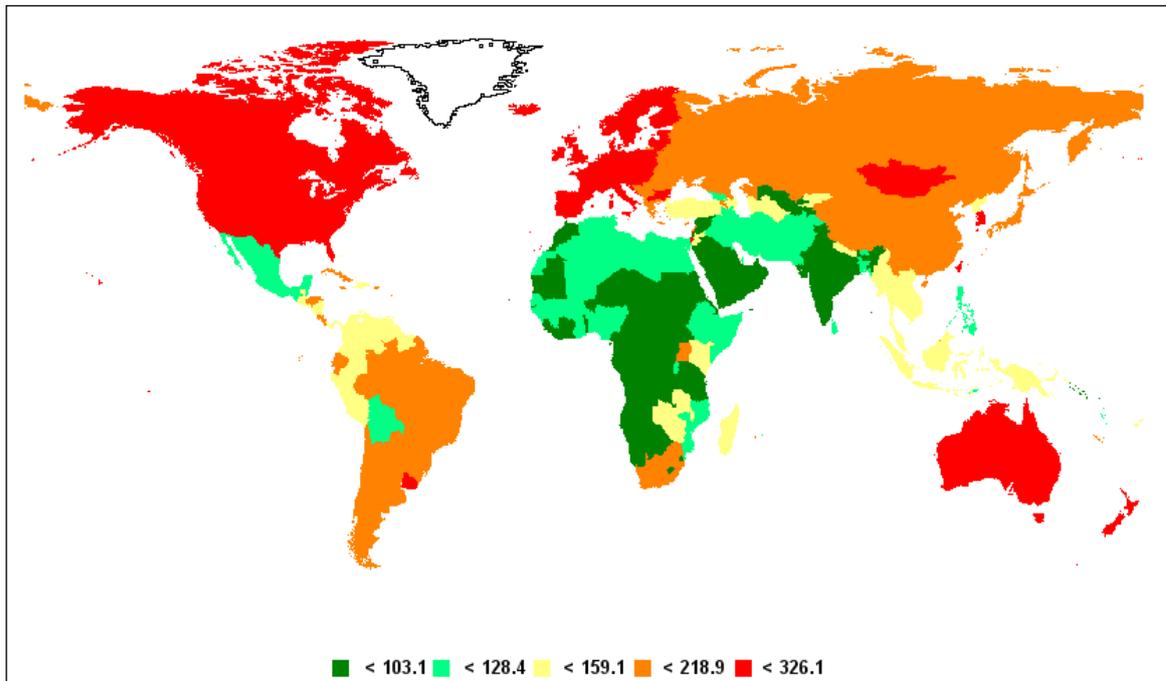
**Quadro 1:** Nomenclatura de alguns tumores segundo o critério histomorfológico. Adaptado de: FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009

<b>ESTRUTURA PROLIFERADA</b>	<b>TUMOR BENIGNO</b>	<b>TUMOR MALIGNO</b>
<b>Tecidos epiteliais</b>		
Epitélio de revestimento	Papiloma	Carcinoma
Epitélio glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
<b>Tecidos conjuntivos</b>		
Fibroso	Fibroma	Fibrossarcoma
Adiposo	Lipoma	Lipossarcoma
Cartilaginoso	Condroma	Condrossarcoma
Ósseo	Osteoma	Osteossarcoma
<b>Tecidos musculares</b>		
Liso	Leiomioma	Leiomiossarcoma
Estriado	Rabdomioma	Rabdomiossarcoma

De maneira concomitante ao aumento da expectativa de vida da população a incidência de câncer também tem aumentado mundialmente. Cerca de 12 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano, sendo a causa de aproximadamente 7 milhões de mortes por ano (PARK et al., 2008). As Américas do Norte e do Sul e o continente Euroasiático possuem as maiores taxas de incidência (IARC, disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em 05 de abr. 2011) (**Figura 1**). E até o ano de 2020, estima-se que sejam registrados 16 milhões de novos casos de câncer, fazendo com que esta doença tenha um imenso fator de impacto nos índices de mortalidade mundial (PARK et al., 2008).

No Brasil estima-se uma incidência de mais de 490 mil novos casos de câncer no ano de 2011 e mais de 12 mil novos casos de neoplasias para Goiás, sendo 3.610 apenas em Goiânia (BRASIL, 2009).

Diante essa realidade, fica comprovada a extrema necessidade de se implantar novas alternativas para o tratamento do câncer.



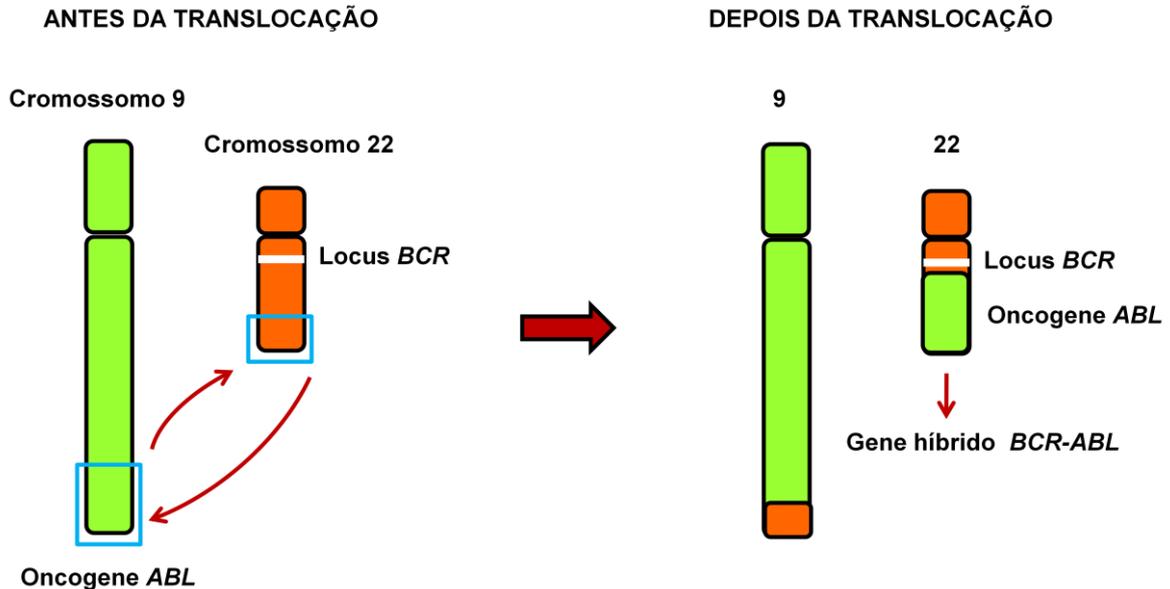
**Figura 1:** Estimativa mundial de incidência de todos os cânceres, menos o câncer de pele não melanoma, por 100 mil habitantes, para o ano de 2011, segundo o IARC – International Agency for Research on Câncer. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em 05 de abr. 2011.

## 1.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Dentre os diversos tipos de câncer existe a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que se caracteriza como uma neoplasia de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que leva a proliferação de progenitores granulocíticos. Esta doença compromete os dois sexos, com ligeira predominância do sexo masculino. Incide em todas as raças, sendo mais rara nos negros e pode ser observada em todos os grupos etários, com maior frequência em adultos entre 25 e 60 anos. Responde por 15 a 20% de todos os casos de leucemia (ASTER, 2008; FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009).

É decorrente de uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo Philadelphia (**Figura 2**). Esse cromossomo é resultado de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 que move o gene *ABL* do cromossomo 9 para uma posição no cromossomo 22 adjacente ao gene *BCR*, levando a formação do gene *BCR-ABL*, um gene leucemia-específico (CONDUTAS DO INCA, 2003; ASTER, 2008). Conseqüentemente, este gene translocado produz

uma proteína híbrida BCR-ABL com atividade tirosina quinase potente e desregulada.



**Figura 2:** A translocação cromossomal e os oncogenes associados na leucemia mielóide crônica.

Alguns estudos têm revelado uma nova função do gene *ABL* na oncogênese (STRICKER & KUMAR, 2008). A proteína *ABL* que se localiza no núcleo tem a função de promover a apoptose das células lesadas geneticamente, porém a *BCR-ABL* não pode realizar esta função uma vez que fica retida no citoplasma devido atividade tirosino quinase anormal. Dessa forma, as células com este tipo de translocação é desregulada de duas maneiras: a atividade tirosino quinase descompensada leva a autonomia do crescimento, enquanto a apoptose é impedida simultaneamente (STRICKER & KUMAR, 2008; ABRALE, 2010).

A presença da proteína tirosino quinase de *BCR-ABL* gera sinais que mimetizam os efeitos da ativação do receptor do fator de crescimento fazendo com que os progenitores desta leucemia não dependam dos sinais gerados pelos fatores de crescimento e seus receptores para manter a capacidade de diferenciação durante as primeiras fases da doença (ASTER, 2008). Portanto, essa leucemia permite o desenvolvimento de outras células normais na medula óssea e esta característica peculiar explica a progressão menos severa da doença e melhores prognósticos (ABRALE Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, disponível em: < <http://www.abrale.org.br/> >. Acesso em 20 de jan. 2011).

Durante o transcorrer desta neoplasia ocorre uma excessiva proliferação da linhagem mielóide (Fase Crônica - FC), seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular (Fase Acelerada - FA) e terminando em um quadro de leucemia aguda (Fase Blástica - FB). Durante a FC ocorre hiperplasia medular, as células mielóides ainda apresentam capacidade de maturação e as manifestações da doença podem ser controladas com terapia medicamentosa convencional. Durante a FA, a LMC é resistente à terapia farmacológica, caracterizando-se com uma evolução clonal. E na FB, a doença é agressiva, com quadro clínico de leucemia aguda e permite ao doente uma sobrevida muito curta (CONDUTAS DO INCA, 2003).

O tratamento medicamentoso da LMC continua sendo um desafio. A identificação de resistência ao Mesilato de Imatinib (Gleevec<sup>®</sup>), medicamento de escolha contra esta neoplasia, tem levado à intensa pesquisa sobre os seus mecanismos e de que forma essa resistência pode ser prevenida (CONDUTAS DO INCA, 2003). Normalmente os pacientes que tornam resistentes ao fármaco sofreram mutações no sítio ativo da proteína BCR-ABL impedindo que o fármaco se ligue e impeça a atividade tirosino quinase. Comumente, estes pacientes sofrem recaídas e evoluem, mais facilmente, para as fases seguintes da doença (ASTER, 2008).

Outro fator desfavorável ao tratamento é a toxicidade ocasionada em muitos pacientes. Grande parte dos doentes submetidos ao tratamento com Imatinib sofre grave intoxicação mesmo quando expostos à menor dose recomendada (CONDUTAS DO INCA, 2003). Para esses pacientes o tratamento com esta droga é suspenso, e eles ficam mais vulneráveis à doença e com piores prognósticos.

Diante das intercorrências oferecidas com as terapias existentes, as poucas opções quimioterápicas além da incompleta compreensão dos mecanismos que desencadeiam a LMC, pesquisadores são constantemente estimulados a buscar novos protótipos com potencial antileucêmico.

### 1.3 MORTE CELULAR / APOPTOSE

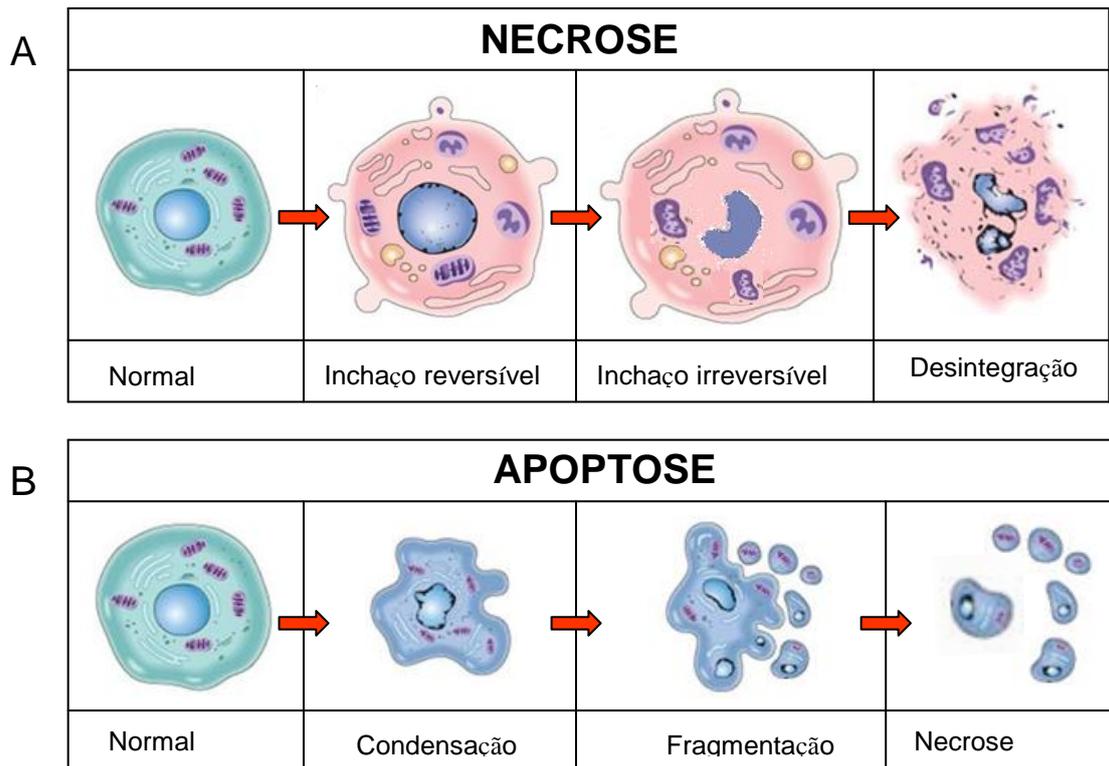
Morte celular é um processo que abrange uma sucessão de eventos a partir da ação de agentes lesivos (KUMAR et al., 2008; PEREIRA, 2009). Ela pode ser classificada de acordo com diferentes critérios: características morfológicas (autofagia, cornificação, necrose e apoptose), aspectos funcionais (fisiológica ou

patológica, programada ou acidental), características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) ou aspectos enzimáticos (com ou sem a ação de nucleases ou proteases, como caspases, transglutaminases, catepsinas e outras). Também existem modelos atípicos de morte celular como paraptose, piroptose, pironecrose, entose, mitose catastrófica, degeneração veleriana e entose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008; KROEMER et al., 2009; PEREIRA, 2009).

Se a morte celular no organismo vivo é seguida de autólise o processo é denominado necrose. Quando as funções vitais são interrompidas, os lisossomos perdem a capacidade de conter as hidrolases (proteases, lipases, glicosidases, ribonucleases e desoxirribonucleases) as quais, no citoplasma, digerem praticamente todos os substratos celulares e as células passam a apresentar alterações morfológicas características (aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da função mitocondrial, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura celular) (**Figura 3A**). Geralmente este processo afeta células adjacentes e provoca inflamação (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008; PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008; PEREIRA, 2009).

A denominação apoptose tem origem grega e significa “caindo fora” devido às observações morfológicas de fragmentação celular que se separam no final do processo (PEREIRA, 2009). Foi inicialmente introduzido por Kerr, Wyllie e Currie (1972) nos anos 70 para definir um tipo de morte celular diferente da necrose uma vez que não se observava danos à membrana plasmática, nem processo inflamatório.

A célula em apoptose não sofre autólise; ela é fragmentada e endocitada por células vizinhas e especializadas. Antes da endocitose, a célula se encolhe, o citoplasma fica mais denso, a cromatina torna-se condensada e disposta em grumos, o núcleo se fragmenta, a membrana citoplasmática emite prolongamentos que englobam os fragmentos nucleares terminando com a fragmentação do restante celular em múltiplos brotos chamados corpos apoptóticos (**Figura 3B**) (BOLETI et al, 2008; PEREIRA, 2009).



**Figura 3:** Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por necrose e apoptose. Na necrose (A), a célula sofre um intumescimento, algumas organelas também intumescem e se rompem, a célula perde a integridade da membrana plasmática e ocorre extravasamento do material intracelular. Na apoptose (B), ocorre uma diminuição do volume celular, condensação e fragmentação da cromatina, culminando com o empacotamento do conteúdo celular em vesículas ou corpos apoptóticos, sem extravasamento do conteúdo citoplasmático. Adaptado de: ANAZETTI & MELO, 2007 e [http://1.bp.blogspot.com/\\_TKGTYY7-4/TG2g\\_nJz7LI/AAAAAAAAAFg/cgwE-z-KH-E/s1600/Imagem1.jpg](http://1.bp.blogspot.com/_TKGTYY7-4/TG2g_nJz7LI/AAAAAAAAAFg/cgwE-z-KH-E/s1600/Imagem1.jpg). Acesso em 13 de abr. 2011.

A apoptose é uma modalidade de morte celular comum aos estados fisiológicos e patológicos. Em situações fisiológicas funciona para eliminar células que já tenham cumprido sua função e para manter constante o número de células nos tecidos; dessa forma, participa no controle da proliferação e diferenciação celular. E em condições patológicas elimina células lesadas geneticamente ou células com lesões irreparáveis sem iniciar uma reação acentuada no indivíduo (KUMAR et al., 2008; PEREIRA, 2009).

O equilíbrio entre apoptose e proliferação celular mantém a homeostase. Fisiologicamente a apoptose é necessária para renovação tissular, seleção negativa e positiva de linfócitos, eliminação de células durante a embriogênese, eliminação das células dos ácinos após o período de amamentação, eliminação de células endometriais durante o calapso da menstruação, deleção de células nas criptas intestinais dentre várias outras situações. O controle da apoptose é crucial pois

qualquer distúrbio na sua regulação pode culminar em doenças. A apoptose em excesso pode causar doenças como Alzheimer, Parkinson e isquemia cardíaca e a falta de apoptose pode acarretar em neoplasias e artrite reumatóide (SZABADKAI & RIZZUTO, 2004, ANAZETTI & MELO, 2007; PEREIRA, 2009).

O processo apoptótico é enfatizado como um mecanismo de morte celular de maior importância em respostas aos agentes quimioterápicos (GALEANO et al., 2005; ANAZETTI & MELO, 2007). Portanto refere-se a um modelo bastante estudado na área oncológica, pois a elucidação dos seus mecanismos moleculares pode favorecer a descoberta de novos alvos terapêuticos além de auxiliar na formulação de fármacos eficazes mesmo em células mutadas resistentes às terapias convencionais (LEE et al., 2002; ANAZETTI & MELO, 2007).

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos exógenos e/ou endógenos, mas por ser um processo enzimático ativo, independente do estímulo, sempre ocorre a ativação de proteases. Estas enzimas são as responsáveis por induzir as modificações funcionais e morfológicas características do processo. As principais representantes são as *caspases* (de *cysteine asparagil specific proteases*), enzimas que possuem cisteína no sítio ativo e que clivam proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico. São produzidas como pró-caspases, e ativadas por clivagem proteolítica em sítios com ácido aspártico ou por deslocamento da molécula inibidora. Em humanos já são conhecidas pelo menos 14 caspases (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009).

Embora apresentem uma estrutura comum, as caspases podem ser separadas em dois grupos funcionais, as que participam da apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 e 12) e as que estão envolvidas nos processos inflamatórios por clivarem pró-interleucinas durante o processo imunológico (caspases 1, 4, 5 e 11) (PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008; PEREIRA, 2009).

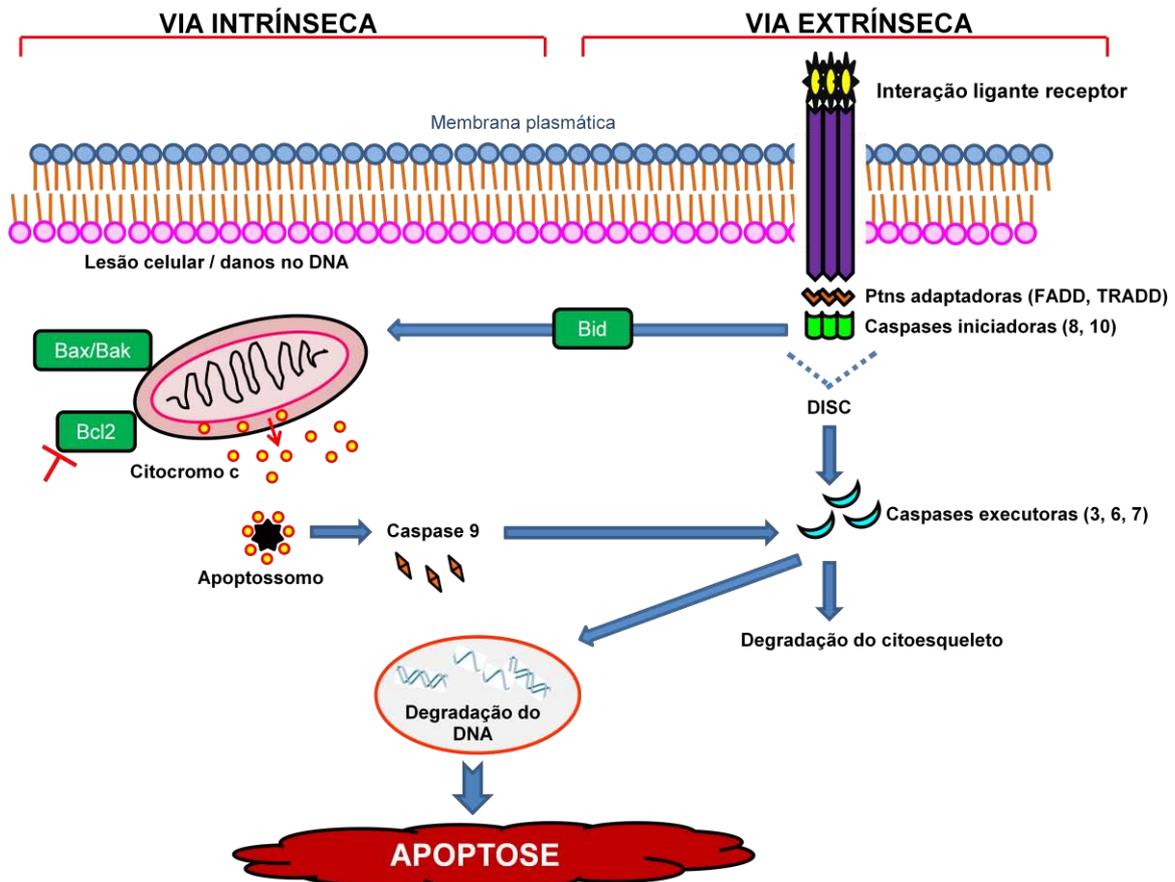
As caspases envolvidas na apoptose são divididas em caspases ativadoras (caspases 8, 9 e 10) e caspases efetadoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) de acordo com a estrutura e função de seus pró-domínios. As iniciadoras possuem um pró-domínio funcional grande e ativo, onde ocorre a associação com proteínas adaptadoras, como Apaf-1 (fator 1 de ativação de proteases de apoptose) e FADD (domínio de morte associado a FAS). E as efetadoras possuem pró-domínios pequenos ou inexistentes responsáveis pela clivagem de substratos (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008; KUMAR et

al., 2008; PEREIRA, 2009). Os domínios de associação estão presentes na porção N-terminal das caspases e podem ser de dois tipos: DED (domínio efetor de morte) ou CARD (domínio de recrutamento de caspases). As proteínas adaptadoras quando ligadas em qualquer um destes domínios, provoca o recrutamento de caspases, de forma que uma fique próxima da outra e auto-ativem (PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008; KUMAR et al., 2008; PEREIRA, 2009).

As caspases executoras, após serem ativadas pelas caspases iniciadoras, amplificam os sinais de morte, ativando mais caspases iniciadoras e/ou interagem com outras moléculas, principalmente proteínas reguladoras e estruturais, clivando-as e favorecendo a morte celular. Tais proteínas podem ser ativadas ou inativadas ou modular a função de outras proteínas. São diretamente inativadas algumas proteínas do citoesqueleto, componentes das junções aderentes, proteínas envolvidas no metabolismo e reparo do DNA, proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL), ativadores transcricionais (NF $\kappa$ B) e quinases (KUMAR et al., 2008; MOTA, 2010).

A ativação das caspases representa um estágio tardio comum a todas as células apoptóticas e depende de um equilíbrio delicadamente sintonizado entre vias moleculares pró- e antiapoptóticas (KUMAR et al., 2008).

Existem duas vias distintas que convergem para a ativação das caspases, a via extrínseca ou dos receptores de morte da membrana plasmática e a via intrínseca ou mitocondrial (**Figura 4**). Em geral, cada via é induzida sob diferentes condições, envolvem diferentes moléculas, exercem papéis diferentes na fisiologia e na doença, porém podem interagir (KUMAR et al., 2008).



**Figura 4:** Vias Extrínseca e Intrínseca da apoptose. As duas culminam com a ativação da cascata das caspases e com a degradação de substratos celulares específicos que levam às alterações características deste processo de morte.

A via extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes de morte extracelulares aos seus respectivos receptores, presentes na superfície da membrana plasmática. Os receptores de morte são membros da superfamília de fatores de necrose tumoral (TNF), como TNF-R1, Fas/CD95, TRAIL, e do fator de crescimento neuronal (NGF). Esses receptores são estruturas transmembranares, cuja porção externa acopla o ligante e a porção citoplasmática possui o domínio de morte (*death domain* – DD) conservado que interage com outras proteínas. Entre os ligantes de morte estão o TNF $\alpha$ , FasL e NGF-L. Quando acontece a ligação, os receptores de morte mudam sua conformação e aproximam seus DD, resultando no recrutamento de proteínas adaptadoras presentes no citoplasma, como FADD e TRADD, as quais também possuem DD e DED. Essas proteínas recrutam as pró-caspases iniciadoras 8 e 10, que também possuem o DED, formando o complexo DISC (complexo de sinalização de indução de morte) e resultando na auto-ativação dessas pró-caspases. A caspase 8, por sua vez, cliva e ativa a pró-caspase 3, a qual

amplifica o sinal apoptótico e culmina no colapso celular (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008; KUMAR et al., 2008; MOTA, 2010).

A via intrínseca envolve diretamente a mitocôndria. Esta organela foi tida durante muitos anos como exclusiva para a produção de energia, porém hoje é considerada fundamental no processo que define a morte das células, por apoptose ou necrose (PEREIRA, 2009). Durante o estresse celular as alterações mitocondriais possuem um limite a partir do qual a progressão para a morte é inevitável, não havendo possibilidade de retorno à normalidade; e esta situação é marcada por alterações na permeabilidade das membranas mitocondriais (interna e externa). A permeabilidade da membrana externa é controlada pelos canais VDAC (*Voltage Dependent Anions Channels*) que se encontram superpostos aos canais ANT (*Adenine Nucleotide Transferase*) situados na membrana interna, formando os poros de permeabilidade transicional. Com a permeabilidade controlada é permitida a passagem por esses canais apenas de moléculas pequenas (até 5 KD), as moléculas maiores, como fatores apoptogênicos, ficam isolados no espaço intermembranar. Como exemplos de fatores apoptogênicos podem ser citados o citocromo c, AIF (fator de indução de apoptose), pró-caspases 2, 3 e 9, SMAC (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*) ou DIABLO (*Direct IAP Binding protein with Low pI*) e endonucleases, os quais, na presença de sinais apoptóticos, são liberados no citoplasma e alguns deles participam da ativação das caspases (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008; PEREIRA, 2009; MOTA, 2010).

A permeabilidade da membrana externa mitocondrial é controlada pelas proteínas da família Bcl (*B Cell Lymphoma*) as quais possuem domínios homólogos do tipo BH (*Baculovir Homologue domain*). As proteínas que possuem quatro destes domínios (BclBH4), como as proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, são consideradas estabilizadoras de membranas; e as proteínas que compartilham de três domínios (BclBH3), como as proteínas Bax e Bak, e de um único domínio (BclBH1), como as proteínas Bid, Bad, Bcl-2L1, Bim e Puma, são tidas como desestabilizadoras da membrana, aumentando a permeabilidade e induzindo a liberação de moléculas pró-apoptóticas. Até o momento são conhecidos pelo menos 20 membros da família Bcl e dependendo da função de cada um, são didaticamente divididos em dois grupos, o grupo pró-apoptótico (Bax, Bcl-XS, Bak, Bad, Bik entre outros) e o antiapoptótico

(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, Boo, entre outros) (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009; MOTA, 2010).

A maioria dos membros pró e antiapoptóticos, na ausência de um sinal de morte, se localizam em compartimentos subcelulares separados. Os membros antiapoptóticos se encontram inseridos em membranas intracelulares, como as da mitocôndria, do retículo endoplasmático e a do envelope nuclear, enquanto alguns membros pró-apoptóticos situam-se no citoplasma ou no citoesqueleto em uma forma inativada. Após o estímulo apoptótico, estes são ativados e migram para seu local de ação. A proteína Bax, por exemplo, que se localiza no citosol, quando ativada, desloca-se até a membrana externa mitocondrial, interage com a Bcl-2 e induz o aumento da permeabilidade. Também, as proteínas BclBH1, quando translocadas para a membrana mitocondrial externa, ativam as proteínas Bak lá existentes ou inativam as proteínas Bcl-2, induzindo a permeabilidade. Assim, a formação de heterodímeros entre os membros pró e antiapoptóticos sugere anulação competitiva de suas atividades. Portanto, uma desarmonia na concentração de um destes grupos, em parte, define a sobrevivência ou a morte da célula. Por exemplo, a produção exacerbada da proteína Bcl-2 previne a morte celular, e normalmente esta superprodução acontece em células de algumas neoplasias como forma de resistência a muitos fármacos citotóxicos anticâncer (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; MOTA, 2010).

Muitos estudos descritos na literatura evidenciam a existência de dois mecanismos principais para explicar a maneira com que Bax e Bak provocam a liberação dos fatores apoptogênicos da mitocôndria, especialmente o citocromo c. Devido a oligomerização de Bax e Bak, há a formação de canais específicos para a passagem do citocromo c, e talvez de outros fatores como AIF, para o citoplasma, definindo o primeiro mecanismo, o de permeabilização seletiva da membrana externa mitocondrial. E o segundo mecanismo baseia-se na regulação de canais já existentes, os poros de permeabilidade transicional, os quais além de permitir a difusão não seletiva de moléculas pequenas através da membrana mitocondrial interna, também são responsáveis por assegurar a manutenção do gradiente eletroquímico definido como  $\Delta\psi_m$  (delta-fi mitocondrial – potencial de membrana interna mitocondrial). Quando estes poros são abertos, logo a membrana mitocondrial externa é danificada e acontece a liberação inespecífica dos fatores apoptogênicos. No entanto, de qualquer maneira, a inserção de Bax na membrana

mitocondrial causa a saída de citocromo c e a dissipação do  $\Delta\psi_m$  levando a perda das funções mitocondriais (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009; MOTA, 2010).

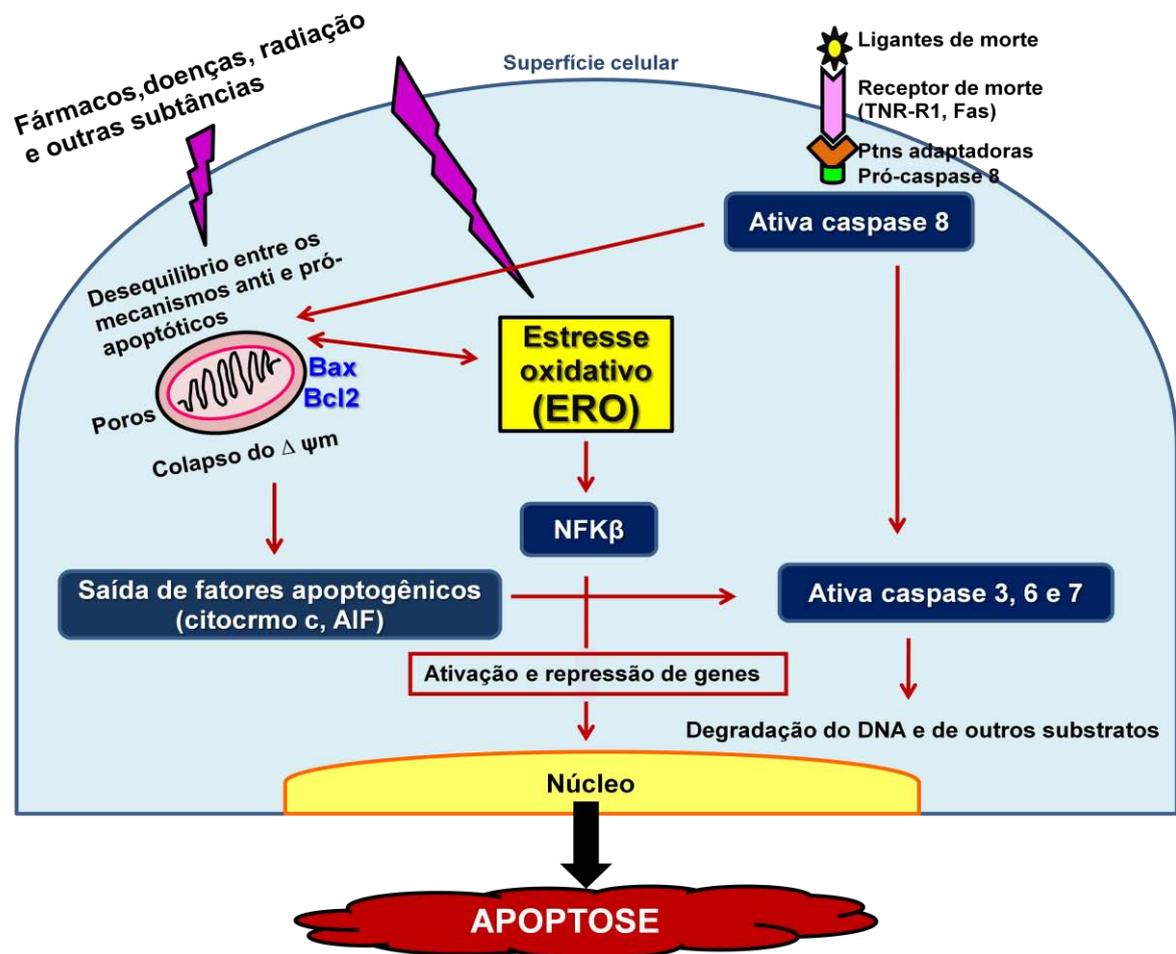
Quando o citocromo c é liberado no citoplasma ele participa como co-fator da formação do apoptossomo, um grande complexo ativador das caspases, especialmente a caspase 9. Na presença do citocromo c no citosol e de energia (didesoxi-ATP ou ATP), a molécula Apaf-1 oligomeriza com outras Apaf-1 adjacentes e também forma o apoptossomo, que culmina na ativação das caspases e apoptose. Nesta situação, o apoptossomo recruta a pró-caspase 9 e quando um sítio da Apaf-1 se liga ao ATP ou dATP ocorre uma alteração conformacional suficiente para ativar a pró-caspase 9. Esta se torna uma holoenzima ativa capaz de ativar as pró-caspases 3 e 7. A caspase 3 então, processa e ativa as pró-caspases 2, 6 e 9. A caspase 6 cliva e ativa as pró-caspases 8 e 10, e a caspase 9 amplifica o sinal de morte. Na ausência de citocromo c, as moléculas de Apaf-1 apresentam-se como monômeros compactos e inibidos (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009; MOTA, 2010).

Outros fatores apoptogênicos relevantes também são liberados da mitocôndria, tais como a proteína SMAC ou DIABLO, OMI/Htra2, AIF, e endonuclease G. As proteínas SMAC ou DIABLO e OMI/Htr2 ligam-se aos inibidores naturais da apoptose, as IAPs (proteínas inibidoras da apoptose), bloqueando sua atividade. As IAPs ligam-se as caspases 3 e 9 e as inibem. Assim, na presença de SMAC ou DIABLO essas caspases ficam ativadas e o processo apoptótico é desencadeado. O AIF, além de ativar a caspase 9 diretamente, é ativador de endonucleases, possivelmente pela ativação das caspases 3 e 7. Quando AIF e a endonuclease são liberados no citoplasma, eles também podem migrar diretamente para o núcleo e induzir a fragmentação do DNA com subsequente fragmentação da cromatina, e dessa maneira, tornam-se importantes no processo de apoptose por via independente das caspases (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009; MOTA, 2010).

Para enfatizar a informação de que as vias intrínseca e extrínseca da apoptose, mesmo sendo induzidas de maneiras independentes, podem estar correlacionadas, é importante mencionar a atuação dos ligantes FAS e TNF- $\alpha$  aos seus respectivos receptores de morte. Eles ativam a pró-caspase 8, que também cliva a proteína Bid, provocando sua translocação para a mitocôndria e resultando na saída

do citocromo c. Dessa maneira, o sinal de morte é amplificado e o processo iniciado extrinsecamente é difundido envolvendo a atuação dos mecanismos mitocondriais (KUMAR et al., 2008, MOTA, 2010).

A morte celular por apoptose também pode ser induzida pelas lesões ocasionadas pelos radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (ERO) (**Figura 5**). Os radicais livres são espécies químicas que tem um único elétron não pareado em uma órbita externa, tornando-os muito instáveis e prontamente reativos. Quando gerados nas células atacam com avidez muitas classes de biomacromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos celulares, além de iniciarem reações autocatalíticas, nas quais, as moléculas envolvidas nessa reação também são convertidas em radicais livres e a cadeia de danos é propagada. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são um tipo de radical livre derivado do oxigênio, normalmente produzidas nas células durante a respiração e geração de energia mitocondrial. Quando a produção de ERO aumenta ou quando os sistemas de remoção são ineficientes ocorre uma condição denominada estresse oxidativo devido ao excesso desses radicais livres. A mitocôndria é a maior produtora de ERO, portanto por estar continuamente exposta a essas espécies tornam-se os principais alvos do estresse oxidativo. Além da respiração celular, as ERO também podem ser produzidas por radiação, quimioterápicos, produtos químicos citotóxicos, bem como, sob estímulos apoptóticos, o ligante TNF- $\alpha$  pode elevar os níveis de ERO intracelular (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008, PEREIRA, 2009).



**Figura 5:** Indução da apoptose pelo aumento da geração de ERO intracelular. Quando ERO aumentam no interior celular ocorre estresse oxidativo, alterações nas membranas mitocondriais, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, liberação dos fatores apoptogênicos para o citoplasma, culminando com a ativação da cascata das caspases e apoptose.

Os principais artifícios de proteção aos danos causados pelas ERO que as células aeróbicas possuem são os mecanismos antioxidantes. No entanto, quando não existe um equilíbrio satisfatório entre os mecanismos pró e antioxidantes, ou quando a produção de ERO é maior que a capacidade de detoxificação da célula, ocorre estresse oxidativo. Dessa maneira, a mitocôndria sofre peroxidação dos lipídeos da membrana, ruptura do DNA mitocondrial e interrupção da produção de energia, estimulando a apoptose com passagem de água do espaço entre membranas para a matriz mitocondrial, conseqüente abertura dos poros de permeabilização transicional e passagem de moléculas como o citocromo c (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008, PEREIRA, 2009).

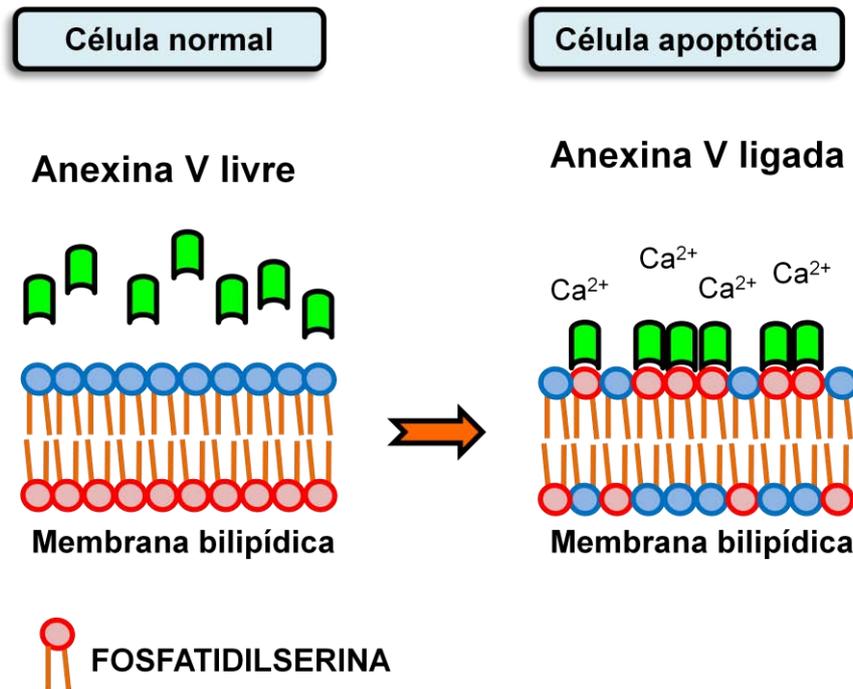
O aumento nos níveis de ERO também leva ao colapso do  $\Delta\psi_m$  com conseqüente indução de estresse oxidativo e morte celular. Esse evento ocorre na fase recente da apoptose e induz à liberação de fatores apoptogênicos da

mitocôndria, culminando com a ativação de caspases e a morte celular (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008, PEREIRA, 2009).

Alguns corantes fluorescentes, como a rodamina 123, com o auxílio da citometria de fluxo têm sido amplamente utilizados para averiguar o  $\Delta\psi_m$  de muitas células. A rodamina 123 é um fluorocromo catiônico capaz de atravessar a membrana mitocondrial, usando como força eletrostática o gradiente negativo da organela, e incorporar-se em seu interior. Com a citometria de fluxo é possível mensurar a intensidade de fluorescência emitida pela rodamina 123 dentro da mitocôndria. A diminuição da fluorescência significa redução do  $\Delta\psi_m$  (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

Diante de todas as observações expostas, pode-se afirmar que a mitocôndria possui uma função central e inicial no processo apoptótico, seja pela liberação de fatores apoptogênicos, pelas alterações do potencial de membrana mitocondrial e/ou pela geração de ERO, culminado com a ativação de caspases e morte celular (MOTA, 2010).

As células em apoptose também sofrem várias alterações em suas membranas que promovem sua fagocitose. A característica mais evidenciada e considerada universal é a externalização da fosfatidilserina (**Figura 6**). Em células normais, os fosfolídeos da membrana plasmática são distribuídos de forma assimétrica nos folhetos interno e externo da membrana plasmática. Ficam na camada externa da bicamada lipídica a fosfadilcolina e a esfingomiéline, enquanto que na superfície interna ficam a fosfatidiletolamina e 90% da fosfatidilserina. Quando a fosfatidilserina é translocada para a camada externa da membrana plasmática ocorre o rompimento dessa assimetria caracterizando o último evento da fase recente da apoptose. *In vivo* este evento favorece a sinalização para células fagocíticas, como os macrófagos, para que possam ser eliminadas. *In vitro* o conteúdo dos corpos apoptóticos acaba sendo extravazado devido à ausência de células fagocíticas especializadas, caracterizando um quadro de “necrose secundária” (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008).



**Figura 6:** Externalização da fosfatidilserina em células apoptóticas. Com o rompimento da assimetria dos fosfolípidos da membrana plasmática e a presença de íons cálcio ocorre a externalização da fosfatidilserina e a ligação da anexina V.

A anexina V é uma proteína anticoagulante de 37KD com capacidade de se ligar com avidéz a fosfolípidos de carga negativa da superfície celular, como a fosfatidilserina, na presença de íons cálcio. Portanto, ela é uma proteína que se liga apenas às células não viáveis, que tiveram a assimetria membranar plasmática rompida. E para identificar as células apoptóticas, esta proteína é conjugada com fluorocromos, como o FITC, e analisadas por citometria de fluxo. Também, quando conjugadas com FITC e combinadas com iodeto de propídio (PI) é possível separar as células viáveis e as células nos diferentes estágios da apoptose. As células que não perderam a integridade da membrana excluem o PI e não são marcadas com anexina V-FITC, as células em apoptose recente são marcadas apenas com anexina V-FITC, aquelas em apoptose tardia apresentam dupla coloração e as células necróticas apresentam apenas marcação com PI (LANDI & MARQUES JÚNIOR, 2003; MOTA, 2010).

Outra maneira de verificar a apoptose é através da coloração pancrômica com corantes como Rosenfeld, e da marcação do DNA com fluorocromos como o Hoechst 33342. Rosenfeld compreende uma mistura dos corantes Giemsa e May-Grunwald capaz de colorir em tons rosados os componentes ácidos (núcleo) e em tons azulados (citoplasma) os componentes básicos. E o corante Hoechst 33342

permite a visualização estrutural do material genético por se ligar, preferencialmente, as regiões adenina-timina (AT) do DNA (KUMAR, 2008).

A partir do ano de 2009 algumas comissões, como o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (*Nomenclature Committee on cell Death -NCCD*), vem incentivando os estudiosos a pesquisarem a morte celular por mais de uma metodologia afim de reduzir os riscos de artificialidade. Estes riscos são possíveis uma vez que as diferentes formas de morte celular possuem muitas características em comum, além das células em processo de morte poderem, ainda, reverter o processo até que apresentem características irreversíveis, como a ativação da cascata das caspases, perda do potencial de membrana mitocondrial e rompimento total das membranas mitocondriais. Portanto, o NCCD sugere, além da análise da morfologia celular, a investigação de outros eventos que confirmem a ocorrência de morte como: a ativação das caspases, a ativação das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax, Bak e Bid), a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, a fragmentação do DNA, a ruptura da membrana celular, a exposição da fosfatidilserina e o aumento de ERO intracelular (KROEMER et al., 2009). Em nosso trabalho, todos os mecanismos sugeridos foram investigados.

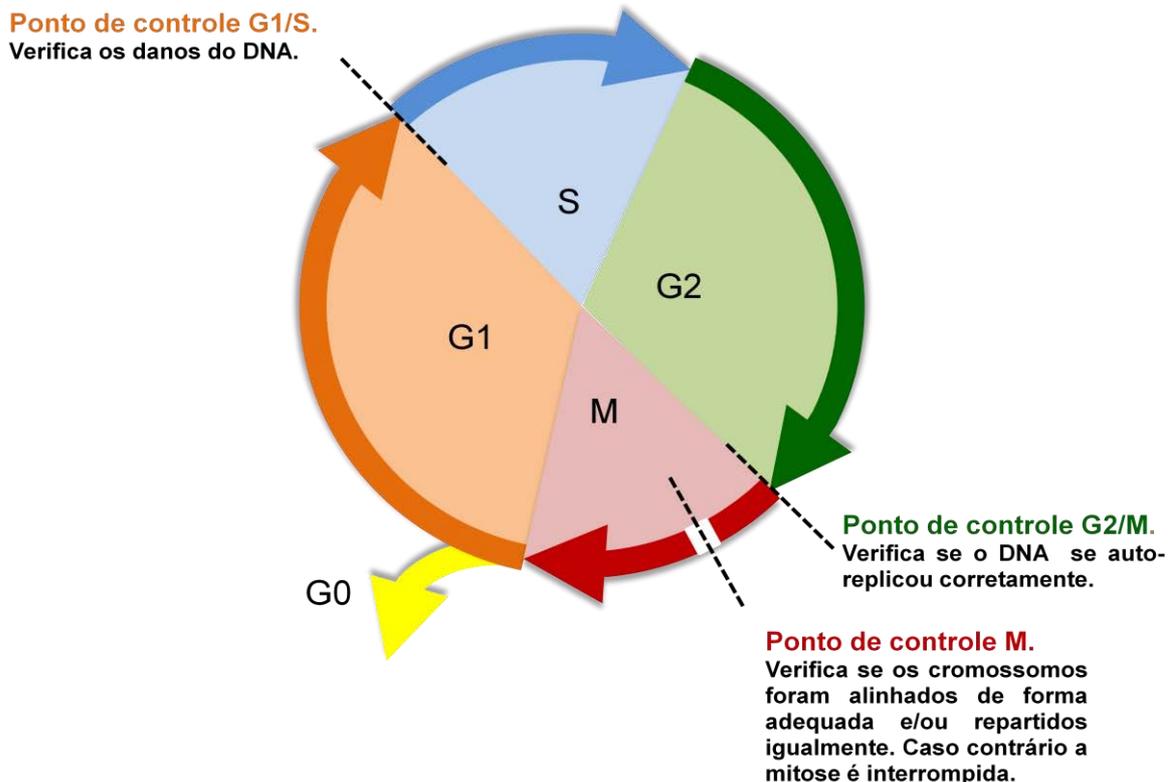
Nas pesquisas têm se observado a utilização de corantes catiônicos lipofílicos, como a rodamina 123, para análise das alterações no potencial de membrana mitocondrial, técnicas de microscopia e imunofluorescência para verificação da translocação de bax do citosol para a mitocôndria e do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, corantes fluorescentes, como o diacetato de diclorofluoresceína (DCFHDA), para mensurar o aumento na geração de ERO intracelular, a utilização de kits comercializáveis contendo substratos fluorescentes para caspases para verificar a ativação de caspases, a marcação com anexina-FITC para pesquisar a externalização da fosfatidilserina e a utilização da citometria de fluxo como uma ferramenta de extrema eficácia para identificar e mensurar células apoptóticas (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008; MOTA, 2010).

#### 1.4 CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo no qual as células somáticas se proliferam a partir da duplicação do seu material genético e o reparte igualmente às células filhas. Portanto, compreende uma sequência de eventos que controla os processos

de replicação do DNA e mitose (KUMAR, 2008; PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: uma fase de crescimento pré-sintético, G1 (*gap* ou lacuna 1), uma fase de síntese de DNA, S (*synthesis*), uma fase de crescimento pré-mitótico, G2 (*gap* ou lacuna 2) e uma fase mitótica, M (*mitosis*) (**Figura 7**). Durante a fase G1 e G2 a célula aumenta de tamanho e sintetiza proteínas, na fase S o DNA é duplicado e na fase M os cromossomos se alinham nas extremidades celulares e se dividem equitativamente para as células-filhas (KUMAR, 2008). Assim, o papel do ciclo é garantir que o material genético seja duplicado adequadamente e as células-filhas sejam geneticamente idênticas à célula-mãe (KUMAR, 2008; MOTA, 2010).



**Figura 7:** Ciclo celular e os pontos de checagem. O ciclo é composto por quatro fases, G1, S, G2 e M, e uma fase de repouso chamada G0. As células em G1 têm seu tamanho aumentado, em S sintetiza proteínas e réplicas do material genético, em G2 aumentam de tamanho novamente e em M divide-se em duas células-filhas. Ao final das fases G1 e G2 e na fase M as células são verificadas quanto à existência de danos no DNA.

As células que não se dividem podem continuar no ciclo permanecendo em G1 ou saírem do ciclo para uma fase de quiescência denominada G0. Nesta situação, para que a proliferação celular seja iniciada, os estímulos, como a

exposição aos fatores de crescimento, precisam promover a transição de G0/G1 permitindo a entrada da célula na primeira fase do ciclo (KUMAR, 2008).

Por apresentar função fundamental na regulação do crescimento das células, o ciclo celular possui múltiplos controles, tanto positivos quanto negativos, que permitem às células filhas possuírem genomas intactos. Defeitos nesta regulação são causas comuns da proliferação desordenada das células tumorais (KUMAR, 2008; FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009). Os principais controladores do ciclo das células eucarióticas são as proteínas quinases, as quais têm sido conservadas desde leveduras até mamíferos (PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008).

Essas proteínas formam os pontos de controle ou checagem da progressão cíclica conferindo um mecanismo de controle de qualidade intrínseco da integridade celular. Esses pontos evitam a replicação do DNA e a mitose de células danificadas, interrompendo o ciclo para possibilitar o reparo genético ou eliminando por apoptose as células com danos irreversíveis (KUMAR, 2008).

Em mamíferos, o primeiro ponto de controle localiza-se na fase G1, o qual uma vez ultrapassado, as células prosseguem para as fases S e G2. Outro ponto está no final de G2, onde ocorre o bloqueio do ciclo caso o DNA não tenha sido duplicado corretamente ou haja lesões genéticas. E um terceiro ponto na fase M que interrompe a mitose caso os cromossomos não tenham sido alinhados e/ou distribuídos corretamente (GUIMARÃES, PEREIRA & FILHO, 2009).

A regulação do ciclo celular é feita, sobretudo, por duas classes de proteínas: as quinases ciclina-dependentes (CDK – *Cyclin Dependent Kinases*) e as ciclinas e seus inibidores. As ciclinas ligam-se às CDKs e controlam a taxa de fosforilação das proteínas responsáveis pelos inúmeros fenômenos que ocorrem na divisão celular. As CDKs são ativadas de maneira fase-dependente e apresentam atividade apenas quando ligadas a uma ciclina específica. As ciclinas são produzidas e degradadas de forma cíclica nas diferentes etapas do ciclo e recebem nomes diferentes, como ciclina A, B, D e outras, de acordo com suas propriedades funcionais e os momentos em que atuam. Após a atuação do complexo ciclina/CDK, a ciclina é desintegrada pelo sistema ubiquitina-proteossomos e o complexo é inativado. Cada complexo ciclina/CDK regula determinada fase do ciclo (GUIMARÃES, PEREIRA & FILHO, 2009).

As células em estágio G0 mantêm um equilíbrio entre CDKs e ciclinas, onde a atividade dessas CDKs é inibida pela baixa concentração de ciclinas. Para sair

desse estágio, as células passam por um ponto de restrição e progridem no ciclo mesmo em condições ambientais desfavoráveis. E para passar para as demais fases do ciclo ocorre a formação de diferentes complexos ciclinas-CDKs que, quando necessário, bloqueiam as células em alguma das fases para que o DNA possa ser reparado ou as induzem à apoptose quando os danos são irreversíveis (GUIMARÃES, PEREIRA & FILHO, 2009).

Nas células tumorais ocorre uma superexpressão dos reguladores positivos (CDKs e ciclinas) concomitante a uma diminuição dos reguladores negativos (inibidores) o que motiva o descontrole do ciclo celular dessas células. Como também, na maioria dessas células, os pontos de checagem não funcionam devido mutações nos reguladores e nos oncogenes culminando no crescimento descontrolado (KUMAR, 2008; GUIMARÃES, PEREIRA & FILHO, 2009; MOTA, 2010).

Em todas as fases do ciclo celular as células podem ser identificadas pelo seu conteúdo de DNA ou pelo reconhecimento de moléculas expressas nos diferentes estágios do ciclo. As células em G1 têm os cromossomos em duplicatas (maternos e paternos), dessa maneira possui DNA igual a  $2n$  ( $n$  representa a quantidade do material genético no complexo haplóide). Após a fase de síntese, a quantidade de DNA passa a ser de  $4n$ , voltando para  $2n$  nas células-filhas. Experimentalmente, essas análises quantitativas podem ser realizadas por métodos histoquímicos, como a coloração por Felgen e leitura em citofotômetro ou por tratamento com substâncias fluorescentes específicas para DNA, como o brometo de etídio ou o iodeto de propídio e avaliação em citômetro de fluxo. Já para identificar as moléculas que são expressas em cada fase do ciclo, especialmente as diferentes ciclinas (complexadas as CDKs), as células são incubadas com anticorpos monoclonais e analisadas pela imunistoquímica, ou por citometria de fluxo se estes anticorpos estiverem conjugados com estruturas fluorescentes (GUIMARÃES, PEREIRA & FILHO, 2009).

Outro anticorpo monoclonal muito utilizado para verificar o índice de proliferação celular é o Ki67. Nas células trata-se de uma proteína nuclear intimamente associada com a proliferação celular. Encontra-se presente em qualquer fase do ciclo, exceto na fase G0, e por isso é tido como um dos marcadores de proliferação celular de maior acurácia, estando intrinsecamente relacionado com a sobrevida dos pacientes com câncer (RIBEIRO et al., 2000; FILHO, PEREIRA & GUIMARÃES, 2009; STREFEZZI et al., 2010).

Assim, foi proposto este trabalho com a finalidade de verificar o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico de *E. dysenterica* DC., além de investigar os prováveis mecanismos de morte celular.

### 1.5 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

Há milhares de anos uma imensa variedade de plantas medicinais é comumente utilizada para o tratamento de várias doenças (BHARAT & SHISHIR, 2006). E foi a partir dessa combinação de ervas na medicina popular que possibilitou a descoberta de inúmeras substâncias com propriedades farmacológicas através do isolamento e identificação de cada constituinte (FARNSWORTH et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2008; WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

Ainda hoje, o tratamento de muitas patologias é realizado com plantas medicinais. No entanto, é importante salientar que a principal idéia do uso clínico de fitoterápicos não é substituir os medicamentos sintéticos, mas sim aumentar as opções terapêuticas com medicamentos equivalentes, complementando o arsenal terapêutico e melhorando o tratamento e a cura de inúmeras doenças (OLIVEIRA et al., 2008; WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

Nos últimos 15 anos, a indústria farmacêutica diminuiu sua pesquisa com produtos naturais devido, principalmente, a ênfase advinda das vias sintéticas e o crescimento do número de patentes. Porém, com o desenvolvimento de novas tecnologias, o aprimoramento dos métodos de *screening* e a queda na aprovação de fármacos novos, a indústria farmacêutica tem retomado suas pesquisas com produtos naturais (ULRICH-MERZENICH, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Desde então, as últimas décadas foram marcadas pelo interesse extraordinário do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais (CALIXTO et al., 2000; KOEHN & CARTER, 2005; SACOMAN et al., 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo são obtidos de plantas (SACOMAN et al., 2008) e aproximadamente 49% dos fármacos desenvolvidos nas últimas três décadas foram obtidos a partir de produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005; BALUNAS & KINGHORN, 2005; AVARINDARAM & YANG, 2010). Dessa forma, o mercado farmacêutico envolvendo estes produtos é responsável por uma movimentação financeira considerável. Só os fitoterápicos giram cerca de 22 bilhões de dólares em todo mundo (AVARINDARAM & YANG, 2010).

De acordo com Rates (2001) e Kato (2001) o Brasil é o país com maior biodiversidade, detendo cerca de 20% do total de espécies do planeta, sendo muitas endêmicas. Este percentual representa uma estimativa de 60 mil espécies vegetais, das quais a maioria é desconhecida e talvez nunca venham a ser descobertas, tamanha a magnitude e complexidade da biodiversidade brasileira (YUNES et al., 2001; COSTA-LOTUFO, 2010). Exemplificando o exposto, estima-se que menos de 1% das espécies que habitam as florestas brasileiras foram identificadas (VIZZOTTO & FETTER, 2009) assim como a flora do bioma Cerrado ainda é muito pouco conhecida. Diante desta realidade, o Brasil diferencia-se majoritariamente por possuir biomas com imenso potencial para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, justificando, de forma animadora, a necessidade de identificar e testar, sistematicamente, novos compostos na busca de futuros fármacos.

Dentro do contexto da ampla utilização de plantas medicinais para o tratamento ou prevenção de doenças, o câncer é uma enfermidade que instiga a pesquisa por novos compostos com potencial antitumoral. Refere-se a uma doença relevante por ser a segunda causa de morte mundial (BALUNAS & KINGHORN, 2005; DESAI et al., 2008; COSTA-LOFUTO et al., 2010), devido sua complexidade de causas e desenvolvimentos (VIZZOTTO & FETTER, 2009).

No Brasil, o conhecimento etnofarmacológico e o planejamento racional de novos compostos têm sido as bases da pesquisa para o desenvolvimento de novos candidatos antineoplásicos com maior seletividade para células tumorais, diferentes alvos terapêuticos e distintos mecanismos de ação (NOGUEIRA, 2008).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que uma redução do risco de câncer está associada com o aumento do consumo de frutas e vegetais (PARK & PEZZUTO, 2002; NISHIMO et al., 2007; ARAVINDARAM & YANG, 2010). E além disso, experiências têm demonstrado que os produtos de origem vegetal ou derivados de fermentações microbianas oferecem as melhores chances para a descoberta de compostos com propriedades antitumorais (VIZZOTTO & FETTER, 2009).

Enquanto frutas e vegetais são recomendados para a prevenção do câncer e outras doenças, seus ingredientes ativos a nível molecular e seus mecanismos de ação são pouco compreendidos (BHARAT & SHISHIR, 2006). Extensivas pesquisas durante a última metade do século identificou vários mecanismos moleculares que podem potencialmente serem usados para a prevenção e o tratamento do câncer

(BHARAT & SHISHIR, 2006). Alguns desses mecanismos podem ser citados como a detoxificação e potente eliminação de carcinógenos, inibição de mitoses e indução de apoptose em vários estágios da progressão e promoção do câncer (JOHNSON, 2007; BALUNAS & KINGHORN, 2010).

Numerosos compostos capazes de interferir no percurso de células cancerígenas também já foram identificados como: limoneno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -cariofileno, curcumina, resveratrol, genisteína, cisteína, alicina, licopeno, capsaicina, diosgenina, 6-gingerol, ácido elágico, ácido ursolínico, silimarina, catequinas, eugenol, carbinol-3-indólico dentre outros (CROWELL et al., 1994 e 1996; BALUNAS & KINGHORN, 2005; BHARAT & SHISHIR, 2006; ARAVINDARAM & YANG, 2010). No entanto, as propriedades anticâncer de muitas destas substâncias ainda não foram avaliadas em humanos (DESAI et al., 2008).

Assim, para o desenvolvimento de um novo fármaco é necessária a passagem por várias etapas. Sucintamente, compostos com potencial atividade antineoplásica sofrem uma triagem através de modelos de *screening in vitro*, posteriormente são submetidos a estudos mais detalhados envolvendo o isolamento do princípio ativo, possíveis mecanismos de ação, produção em maiores quantidades, formulação do fármaco e determinação do seu perfil toxicológico em animais. Uma vez determinada a dose inicial para estudos em humanos, inicia-se a etapa chamada de fase I, em que o composto é estudado em pacientes com neoplasias avançadas resistentes aos tratamentos convencionais, visando aferir o perfil de toxicidade e doses a serem testadas em estudos subseqüentes. Em estudos de fase II, é determinado o espectro de atividade antitumoral do composto, e uma vez identificados os tipos de tumores nos quais se obteve boa atividade, inicia-se a fase III, em que o composto é avaliado em estudos comparativos randomizados que objetivam estimar possíveis vantagens do novo fármaco quanto à toxicidade e efeitos terapêuticos (VIZZOTTO & FETTER, 2009).

Atualmente, vários medicamentos disponíveis na prática oncológica tiveram origem na natureza. Em 1954 foi introduzido no tratamento do câncer o primeiro fármaco antineoplásico derivado de um produto natural, a Actinomicina D, extraído da espécie *Streptomyces*, para tratar um paciente com tumor de Wilms metastático. Desde então, foi despertado o interesse no meio científico por essa área da pesquisa e diversos outros fármacos antitumorais foram produzidos e lançados no mercado (COSTA-LOTUFO, 2010). Alguns exemplos podem ser citados como, a

Vimblastina, Vincristina e seus derivados vindesina e vinorelbina, alcalóides extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, que tem como seus alvos moleculares a tubulina (microtúbulos), bloqueando a mitose, e indicação terapêutica para leucemias, câncer de testículo e doença de Hodking. A Podofilotoxina, o etoposídeo e Teniposídeo, derivado da planta *Podophyllum peltatum*, inibidor da topoisomerase II e utilizados ativamente contra câncer de pulmão, leucemia linfocítica aguda e tumores do epitélio germinativo. O paclitaxel e docetaxel, derivados da espécie *Taxus brevifolia*, tendo a tubulina como alvo molecular, utilizado potencialmente em carcinomas de ovário e mama. Camptotencina, topotecano e irinotecano, derivados da planta *Camptotheca accuminata*, inibidor da topoisomerase I, indicado terapeuticamente para câncer de cólon. A enzima L-asparaginase, isolada de culturas de *Escherichia coli* ou *Erwinia cartovora*, ativa contra leucemias em crianças, dentre vários outros exemplos. Enfaticamente, apenas o Paclitaxel e a Camptotencina foram responsáveis por cerca de 1/3 do mercado global anticâncer em 2002, gerando bilhões de dólares (BALUNAS & KINGHORN, 2005). Porém, muitos destes fármacos são genotóxicos e podem ocasionar mutações no DNA refletindo em tumores secundários (SACOMAN, 2007).

Assim, o mecanismo anticâncer almejado hoje é o que induz a apoptose apenas às células doentes, malignas (SACOMAN, 2007). Neste sentido, muitos trabalhos têm relatado a capacidade de muitos extratos de plantas e/ou seus componentes bioativos em induzir apoptose em células tumorais (LEE et al., 2002; MORALES et al., 2005; SACOMAN, 2007; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Neste contexto, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos em colaboração com as Universidades de Chicago, Ohio e Illinois, fazem um *screening* de candidatos a protótipos de fármacos antineoplásicos a partir de plantas desde 2003. Estão sendo analisadas 5.886 plantas de 288 famílias, 1.358 gêneros e 2.582 espécies. E das plantas já estudadas foram isolados diversos bioativos com potencial atividade para diversas linhagens celulares de tumores humanos, destacando, principalmente, os compostos terpenóides (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Em 2007, com o avanço da pesquisa de produtos naturais, mais três medicamentos anticâncer derivados da natureza foram aprovados: o Ixempra<sup>®</sup> (ixabepilona), derivado da epotilona, com ação nos microtúbulos; o Yondelis<sup>®</sup> (trabectedina), primeiro medicamento antineoplásico de origem marinha, alquilante

de DNA; e o Torisel<sup>®</sup> (temsirolimus), inibidor de proteína quinase (COSTA-LOFUTO et al., 2010). A inserção destes fármacos no mercado antineoplásico reafirma a importância da pesquisa com fontes naturais e comprova, na prática, a volta da natureza no cenário científico oncológico.

Diante de tantos exemplos, pode-se dizer que, de fato, a natureza armazena na sua biodiversidade uma série de substâncias que ainda poderão ser identificadas com alto potencial anticâncer. E neste contexto, o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Universidade Federal de Goiás (LFTC – UFG) têm investigado diferentes plantas com potencial antitumoral, dentre elas a *Eugenia dysenterica* DC. (Mytaceae), em contribuição com a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento das doenças neoplásicas.

#### 1.6 FAMÍLIA MYRTACEAE NO CONTEXTO DO CÂNCER

A família Myrtaceae é amplamente distribuída, ocorrendo preferencialmente, nas zonas tropicais e subtropicais, e é considerada uma das mais importantes famílias da flora brasileira devido à larga ocorrência de espécies comestíveis e/ou usadas na medicina tradicional (CRUZ & KAPLAN, 2004; PEPATO, 2005; VALLILO, BUSTILLOS & AGUIAR, 2006). Possui cerca de 140 gêneros, os quais reúnem mais de 3000 espécies desde arbustos a árvores de grande porte (AURICCHIO & BACCHI, 2003; VALLILO, BUSTILLOS & AGUIAR, 2006), sendo um dos grupos predominantes do componente arbóreo da Mata Atlântica (LOMBARDI & GONÇALVES, 2000; CRUZ & KAPLAN, 2004). É bem representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas, embora seja presente em todo mundo (ALBERTON, 2001; AURICCHIO & BACCHI, 2003).

Caracteriza-se por possuir folhas simples, opostas, providas de glândulas aromáticas. As flores são regulares, hermafroditas, solitárias ou agregadas em florescência e os frutos geralmente apresentam-se sob a forma de baga ou cápsula (AURICCHIO & BACCHI, 2003).

Esta família é subdividida em outras duas subfamílias: Leptospermoideae que engloba os gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum* e *Malaleuca*, e Myrtoideae que inclui os gêneros *Myrtus*, *Psidium*, *Pimenta*, *Pseudocaryophyllus*, *Syzygium* e *Eugenia*. Porém, aproximadamente um terço das espécies pertencentes à família Myrtaceae são do gênero *Eugenia* (ROMAGNOLO & SOUZA, 2006) e distribui-se em áreas que vai do México à Argentina (AURICCHIO & BACCHI, 2003).

O uso medicinal de muitas espécies da família Myrtaceae tem sido comprovado, como a atividade antimicrobiana, atividade antiviral, hipoglicemiante, antioxidante e anticancerígena (APEL et al., 1998; SILVA et al., 2000; GRAHAM et al., 2000; GOUN et al., 2002). No entanto, elas são comumente utilizadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas, devido suas propriedades adstringentes (CRUZ & KAPLAN, 2004).

Em relação a sua constituição química, podem ser citados para esta família taninos, flavonóides, óleos essenciais, ácidos como elágico e ursólico, e em algumas espécies, saponinas (GOTTLIEB, 1972; LUNARDI, 2001; WATANABE, 2004). Sendo muitos destes constituintes detentores de um amplo espectro de atividade antineoplásica (PORTER, SIMMONDS & NICLUGHADA, 1999; SILVA et al., 2000).

Inserido neste contexto, algumas espécies da família Myrtaceae vêm se destacando na pesquisa por possuírem componentes fitoquímicos com potencial atividade antitumoral, a exemplo o limoneno,  $\beta$ -cariofileno, eugenol, ácido gálico e ácido elágico (YANG, LEE & YEN, 2000; YOO et al., 2005).

GRAHAM e colaboradores (2000) expuseram uma relação de novas espécies usadas na medicina popular a partir de uma consulta ao banco de dados "NAPRALERT". Nesta relação encontra-se a espécie *Leptospermum scoparium* Forst. e Forst onde suas partes aéreas são comumente utilizadas pela população australiana contra diversos tipos de câncer.

Estudos etnofarmacológicos de plantas medicinais comumente utilizadas pela população russa no tratamento de leucemias também enfatiza outra espécie, a *Eucalyptus vilinialis* Labill, e diante desta observação, GOUN e colaboradores (2002) comprovaram o grande potencial antileucêmico desta planta em linhagem de células leucêmicas de camundongos (L1210).

Devido às facilidades oferecidas aos estudos de investigação antitumoral trazidas pelos modelos celulares de câncer, pesquisadores tendem a preferirem as linhagens tumorais comerciáveis ao invés de construírem suas próprias culturas. Estudos realizados com tais modelos garantem maior reprodutibilidade dos resultados possibilitando comparações com estudos realizados em todo mundo (KUMAR, 2008).

A espécie *Eugenia jambos* L. que apresenta propriedades antipiréticas e antiinflamatórias, é exemplo de espécie que vem se destacado por exercer forte efeito citotóxico em células leucêmicas humanas por ação de dois taninos

hidrolizáveis, a 1-O-galoil-castalgina e a casuarinina. Ambos inibiram significativamente células leucêmicas promielocíticas humanas (linhagem HL-60) e demonstraram baixa citotoxicidade para linfócitos e células hepáticas humanas normais (LI et al., 2009).

Outra espécie com destaque é a *Eugenia caryophyllata* que demonstrou atividade antioxidante e apoptótica em células leucêmicas humanas da linhagem HL-60 devido à presença do fitoconstituente eugenol isolado do óleo essencial das folhas (YOO et al., 2005).

Nos estudos de LUNARDI et al., (2001) também observou-se que a espécie *Eugenia moraviana* possui atividade antitumoral atribuída, principalmente, aos ácidos platânico e betulínico presentes nas folhas e sementes da espécie (LUNARDI, 2001).

A espécie *Myrcia amazônica* DC. conhecida comumente como pedra-ume-caá, tem suas folhas usadas na medicina popular como importante hipoglicemiante e também possui ação comprovada como antileucêmico (CRUZ & KAPLAN, 2004).

Ainda a espécie *Campomanesia adamantium* devido à presença do monoterpeno D-limoneno, possui potente atividade quimioterápica em câncer de mama, pâncreas e próstata (CROWELL et al., 1994; VALLILO, BUSTILLOS & AGUIAR, 2006).

*Feijoa sellowiana*, popularmente chamada de goiaba serrana, igualmente a outras espécies da família Myrtaeae, possui propriedades antitumorais (BONTEMPO et al., 2007; WESTON et al., 2010). No estudo realizado por Bontempo e colaboradores (2007), motivados pela observação da baixa incidência de câncer nos países tropicais e subtropicais onde os frutos da espécie são consumidos diariamente, investigaram esta propriedade em diferentes modelos celulares (câncer cervical, de mama, de próstata e leucemia) e assim confirmaram o potencial antitumoral da espécie. Acredita-se que esta atividade advém da presença de flavonas nos frutos.

A espécie *Psidium cattleianum*, conhecida como araçazeiro, também possui ação anticancerígena uma vez que inibe a proliferação celular do câncer de estômago humano induzindo a apoptose (MOON et al., 2011).

Assim, como bem exemplificado, a família Myrtaceae compreende um arsenal de espécies promissoras para o desenvolvimento de protótipos eficazes ao tratamento do câncer. E motivados por isso, investigamos as possíveis propriedades

antitumorais de mais uma espécie desta família facilmente encontrada no cerrado goiano, a espécie *Eugenia dysenterica* DC.

### 1.7 *Eugenia dysenterica* DC.

Refere-se a uma árvore frutífera do cerrado de até 10m de altura, de tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada (**Figura 8**), com frutos de formato globoso, bagáceo, amarelo claro e levemente ácido, conhecida popularmente como cagaita (RIBEIRO, PROENSA & ALMEIDA, 1986; NAVES et al., 1992). Suas folhas são comumente usadas como antidiarréico (PALHARES, 2003), para diabetes e icterícia (SILVA, 1999), o fruto como laxativo e a entrecasca como antiinflamatório (PALHARES, 2003; COELHO et al., 2005). No entanto, no estudo realizado por Costa e colaboradores (2000), verificou-se também, a atividade antifúngica do óleo essencial extraído das folhas, apresentando ação contra isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* provenientes de pacientes HIV positivos.

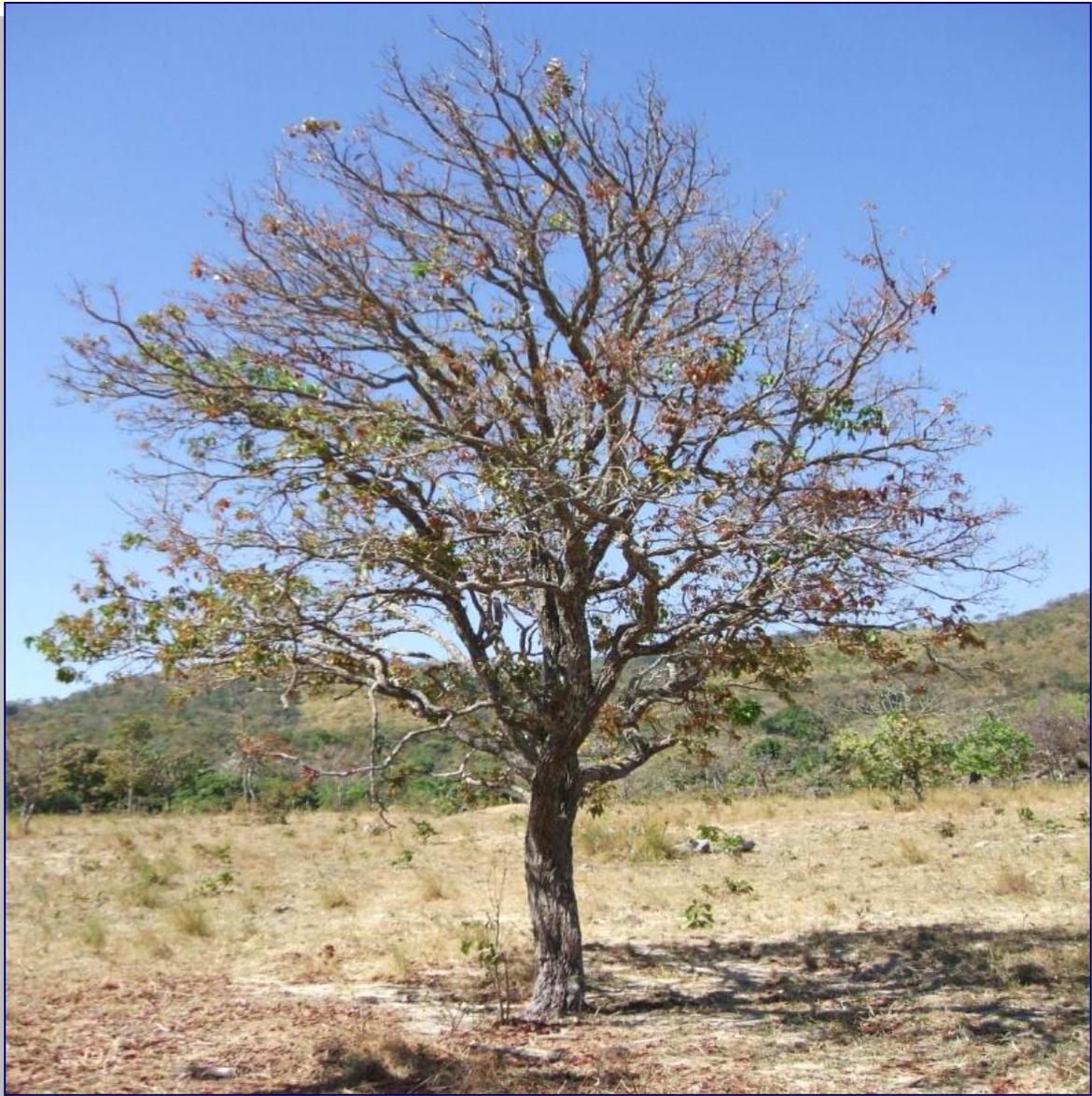
Em estudo realizado por Costa et al., (2000) verificou-se que o óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* DC. é composto por uma mistura de mais de 50 substâncias, dos quais 42 foram identificadas através de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas. 60% dos componentes são sesquiterpenóides e 28% são monoterpenóides, dos quais o óxido de  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno são os sesquiterpenos majoritários assim como os monoterpenos  $\alpha$ -tujeno e sabineno. A composição supra descrita assemelha-se a encontrada no óleo essencial de outras espécies do mesmo gênero e que possuem atividade antitumoral.

Já no estudo de Ferri e colaboradores (2008) notou-se que os óleos dos frutos de *Eugenia dysenterica* DC. colhidos durante três estágios de amadurecimento e analisados em cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas, apresentaram como grupo de componentes voláteis mais abundantes os hidrocarbonetos de monoterpenos. Limoneno, E- $\beta$ -ocimeno e  $\beta$ -pineno foram os componentes mais encontrados nos estágios imaturos e semi-maduros, enquanto  $\gamma$ -muroleno,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno foram os componentes majoritários em frutos maduros.

No estudo realizado por COUTO e co-autores (2009) foi observado, com a prospecção fitoquímica do pó das folhas, a presença predominante dos compostos

fenólicos: taninos e flavonóides. Estes achados ratificam o potencial terapêutico da espécie como antidiarréico e chamam a atenção em razão das propriedades antioxidantes e antitumorais destes componentes.

Diante do encontrado com a prospecção fitoquímica, as substâncias encontradas nos frutos e no óleo essencial das folhas e fundamentado na observação do efeito antioxidante e apoptótico de espécies da mesma família, além de poucas pesquisas de nível farmacológico, *Eugenia dysenterica* DC. é uma espécie que despertou o nosso interesse na busca por novos candidatos a fármacos com promissor potencial antitumoral.



**Figura 8:** Árvore de *Eugenia dysenterica* DC. no município de Nova América-GO – COUTO, R. O., agosto de 2008.

## 2. OBJETIVOS

### 2.2 OBJETIVO GERAL

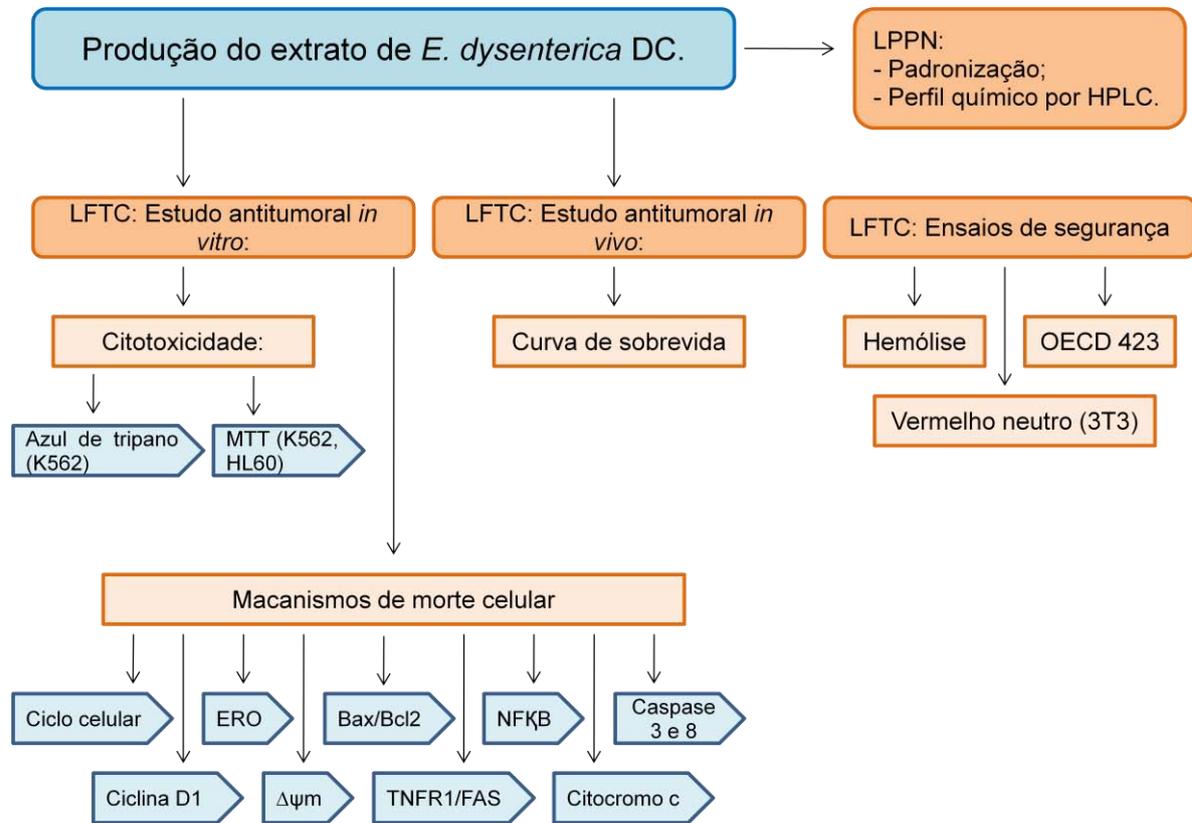
Com o objetivo de avançar no conhecimento a cerca das propriedades biológicas da espécie *E. dysenterica* DC., foi investigado o potencial indutor de morte, *in vitro* e *in vivo*, do extrato hidroalcoólico padronizado das folhas de *E. dysenterica* DC., além do seu perfil de segurança.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico do extrato padronizado hidroalcoólico das folhas de *E. dysenterica* DC. sobre a linhagem leucêmica K562 e HL60;
- Analisar a morfologia celular das células tratadas com o extrato;
- Investigar o potencial indutor de apoptose do extrato em células leucêmicas K562 e HL60;
- Pesquisar os mecanismos de indução da morte celular, se existir;
- Avaliar a capacidade do extrato em aumentar a sobrevida de animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE).
- Avaliar o perfil de segurança do extrato frente às células basais 3T3 (fibroblastos de camundongos) e eritrócitos;
- Avaliar a toxicidade oral aguda do extrato.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FLUXOGRAMA



#### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO PADRONIZADO DE *Eugenia dysenterica* DC.

Uma amostra do extrato hidroalcoólico padronizado das folhas de *E. dysenterica* DC. foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Realino de Paula pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

Para obtenção do extrato, uma amostra de folhas foi coletada durante o período de pré-antese de um espécime adulto, localizados na zona rural do município de Nova América-Go. A árvore foi marcada com placa de identificação e as coordenadas geográficas definidas através de GPS manual (W 49° 59' 00,5"/S 15° 00' 29,5" / 674m). Uma exsicata foi preparada e depositada no Herbário da UFG sobre registro UFG-41319. No LPPN-FF/UFG, a amostra foi dessecada à

temperatura ambiente, cominuída em moinho de facas e acondicionada ao abrigo de luz e umidade (COUTO et al., 2009).

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação usando como solvente etanol a 70% (m/m) (Vetec, RJ, Brasil) a partir de 1000 g de pó. Este processo foi realizado em três etapas (LIST & SCHMIDT, 1989): 1) pré-intumescimento por 2 h com uma proporção droga:solvente de 3:1; 2) maceração intermediária por 24 h; 3) percolação ( $0,2 \pm 0,05 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Foram usadas soluções de gelatina a 2,5% e cloreto férrico a 3% para a monitoração do esgotamento dos constituintes químicos da droga vegetal. Este material foi acondicionado em frascos âmbar fechados sob refrigeração (-2 a +8 °C) para caracterização e posterior secagem por liofilização.

O extrato liofilizado das folhas da *E. dysenterica* DC. foi padronizado pelo doseamento dos seus marcadores químicos principais. As determinações dos teores de polifenóis e taninos totais seguiram a metodologia proposta por Hagerman & Butler (MOLE & WATERMAN, 1987a e b), com adaptações. Os flavonóides totais foram determinados usando o método colorimétrico do  $\text{AlCl}_3$  (KUMAZAWA, HAMASAKA & NAKAYAMA, 2004).

Todos os reagentes, soluções e solventes foram de grau analítico e com laudo de qualidade do fabricante.

### **3.2.1 Preparo das soluções estoque e uso do extrato padronizado de *Eugenia dysenterica* DC. para os testes *in vitro***

A solução estoque do extrato foi preparada a 250 mg/mL utilizando como solventes DMSO (Synth, SP, Brasil) e água ultrapurificada na proporção 1:1. A solução foi homogeneizada em agitador de tubos (Quimis, SP, Brasil) e, em seguida, deixada em banho ultra-som (Unique, SP, Brasil) por 40 minutos. Após a homogeneização, a solução foi filtrada em membrana 0,22  $\mu\text{m}$  (TPP, Suíça) e estocada em tubo estéril a -20° C até o momento dos testes.

A solução-uso do extrato foi preparada apenas no momento dos testes, diluída em meio RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A maior concentração testada foi de 2.5 mg/mL à 0,5% de DMSO até a concentração de 0,019 mg/mL. Estas soluções foram obtidas a partir de diluições seriadas 1:1.

## **3.3 LINHAGENS CELULARES**

### **3.3.1 Linhagem K562**

A linhagem K562 é constituída por células em suspensão de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) resistente, obtida do “America Type Culture Collection”, ATCC, Rockville, Maryland, USA. Estas células foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab™) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e a uma temperatura constante de 37<sup>0</sup>C.

A incubação *in vitro* destas células em presença das diferentes concentrações do extrato de *E. dysenterica* DC. (2,5 mg/mL a 0,019 mg/mL) foi realizada utilizando 2 métodos específicos de investigação de viabilidade celular: exclusão do corante azul de tripano e redução do tetrazólio (MTT), decritos no item 3.3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **3.3.2 Linhagem HL-60**

A linhagem HL-60 são células em suspensão de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), obtida do ATCC, Maryland, USA. Estas células foram mantidas em cultura com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab™) e 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e a uma temperatura constante de 37<sup>0</sup>C.

A incubação *in vitro* destas células em presença das diferentes concentrações do extrato de *E. dysenterica* DC. (2,5 mg/mL a 0,019 mg/mL) foi realizada utilizando apenas o método MTT para investigação da viabilidade celular.

### **3.3.3 Linhagem 3T3**

A linhagem 3T3 é constituída por células aderentes de fibroblastos de camundongos, cedida pela Professora Dr<sup>a</sup> Mari Cleide Sogayar, do departamento de bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Estas células foram mantidas em cultura com meio DMEM-1640 (Sigma™, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab™), 1% de glutamina, eritromicina e estreptomicina (Sigma) em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e a uma temperatura constante de 37<sup>0</sup>C.

A incubação *in vitro* destas células em presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcolóico das folhas de *E. dyseterica* (0,3 mg/mL a 0,002 mg/mL) foi

realizada utilizando a metodologia de incorporação do vermelho neutro para investigação da citotoxicidade do extrato frente células basais e estimar a possível DL50 para realização do teste de toxicidade oral aguda (OECD 423).

### 3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Eugenia dysenterica* DC. SOBRE AS LINHAGENS HL60 E K562 PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPANO E PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO TETRAZÓLIO (MTT)

Os estudos *in vitro* são de extrema importância para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para estimar seus efeitos em humanos (VALADARES, 2006). Dessa forma, com o intuito de avaliar o potencial citotóxico do extrato de *E. dysenterica* DC. em células leucêmicas foi empregado dois ensaios com princípios diferentes: o método de exclusão do corante azul de tripano e o método de redução do tetrazólio (MTT).

A fim de determinar a integridade da membrana celular foi utilizado o método azul de tripano que avalia a integridade da membrana através da permissão ou não do corante pela membrana plasmática. As células viáveis permanecem translúcidas, pois excluem o corante, e as células não viáveis, que apresentam danos na membrana celular, incorporam o corante e coram de azul (NOGUEIRA, 2008b).

E para avaliar a atividade enzimática mitocondrial foi realizado o ensaio de redução do MTT que tem como princípio a 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 succinato-desidrogenase, formando cristais azuis insolúveis. Este produto, acumulado dentro da célula, é solubilizado através da adição de um solvente apropriado, como o DMSO. A intensidade da coloração é utilizada para medir a integridade mitocondrial, e, conseqüentemente, a viabilidade celular (MOSMAN, 1983; NOGUEIRA, 2008b).

#### 3.4.1 Preparo da suspensão celular

O volume de 20 mL contido na garrafa de cultivo celular foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Descartados o sobrenadante, o botão celular foi ressuspenso com 1 ml de meio RPMI. Desse volume foi retirada uma alíquota de 20

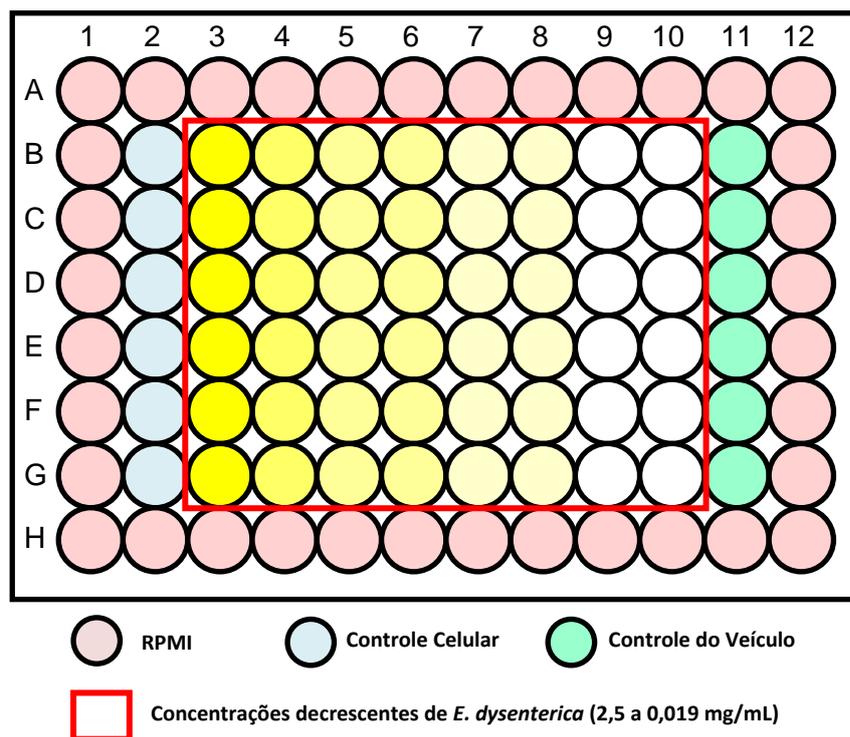
$\mu\text{L}$  e colocados em 180  $\mu\text{L}$  de azul de tripano, e após homogeneização 20  $\mu\text{L}$  foram retirados e colocados em câmara de Newbauer para o cálculo da viabilidade:

$$\text{Número de células contadas} \times 10 \text{ (diluição)} \times 10^4 \text{ (diluição da câmara)}$$

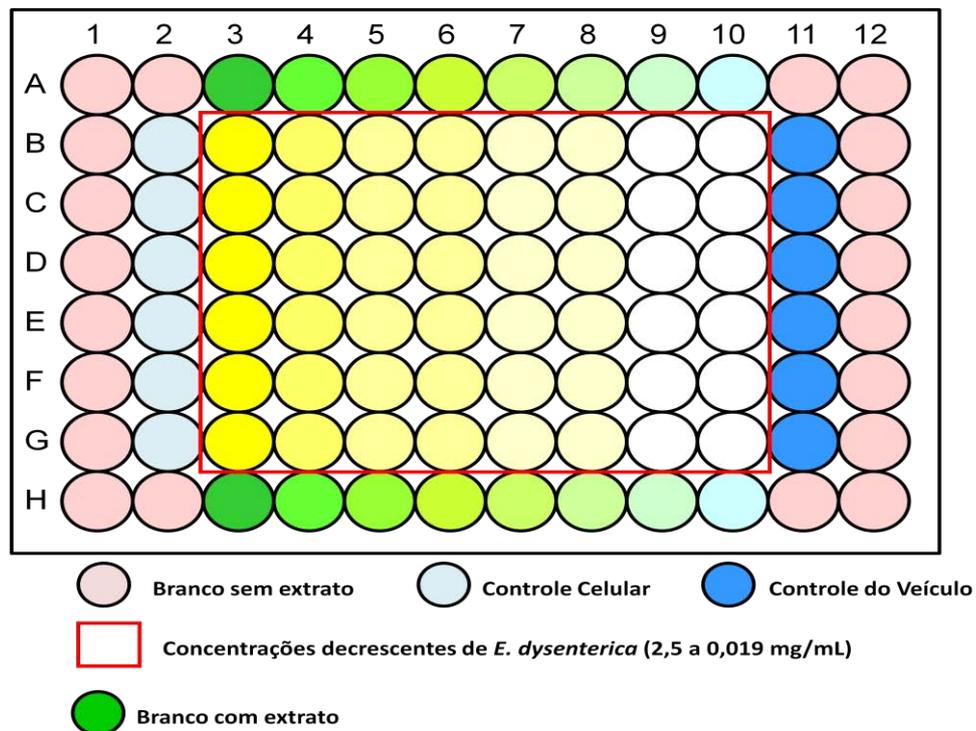
A viabilidade para realização do teste foi sempre superior a 90%. E a concentração celular utilizada no plaqueamento foi de  $1 \times 10^6$  células/mL.

### 3.4.2 Plaqueamento

A suspensão celular ( $1 \times 10^6$  células/mL) foi distribuída em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), 90  $\mu\text{L}$  por poço, em seguida 10  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações de *E. dysenterica* DC. (2,5 a 0,019 mg/mL) foi adicionado ao seus poços correspondentes e a placa foi incubada em estufa a 37° com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24, 48 e 72 horas (**Figuras 9 e 10**).



**Figura 9:** Representação do teste de citotoxicidade – Método de exclusão do azul de tripano em células K-562. Nos poços extremos da placa foi colocado 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI para garantir a umidade. Nos poços B2 ao G2 10  $\mu\text{L}$  de meio RPMI e 90  $\mu\text{L}$  de suspensão celular a  $1 \times 10^6$  células/mL. Nos poços B11 ao G11 10  $\mu\text{L}$  de DMSO a 5% e 90  $\mu\text{L}$  de meio RPMI. E nos poços centrais 10  $\mu\text{L}$  do extrato de *E. dysenterica* nas diferentes concentrações e 90  $\mu\text{L}$  de suspensão celular a  $1 \times 10^6$  células/mL. O teste foi feito em sextuplicata.



**Figura 10:** Representação esquemática do teste de citotoxicidade – Método de redução do MTT em células K-562. Nos poços da coluna 1 e 12 e nos poços A2, H2, A11 e H11 da placa foi colocado 100  $\mu$ L de meio RPMI para garantir a umidade. Nos poços B2 ao G2 10  $\mu$ L de meio RPMI e 90  $\mu$ L de suspensão celular a  $1 \times 10^6$  células /mL. Nos poços B11 ao G11 10  $\mu$ L de DMSO a 5% e 90  $\mu$ L de meio RPMI. Nos poços centrais é colocado 10  $\mu$ L do extrato de *E. dysenterica* DC. nas diferentes concentrações e 90  $\mu$ L de suspensão celular a  $1 \times 10^6$  células /mL. E nos poços A3 ao A11 e H3 ao H11 foi colocado 10  $\mu$ L do extrato correspondente a concentração testada na respectiva coluna e 90  $\mu$ L de meio RPMI. O teste foi feito em sextuplicata.

Após o período de incubação, quando realizado o método de exclusão do corante azul de tripano, uma alíquota de 20  $\mu$ L da suspensão de células foi retirada de cada poço e diluída em 180  $\mu$ L de azul de tripano a 0,2%. As células foram observadas conforme as suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram o corante, possuíam um aspecto translúcido e as células mortas apresentavam coloração azulada. O percentual de inibição celular, na presença do extrato em estudo, foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{Viabilidade} = \frac{\text{média do n}^{\circ} \text{ céls. viáveis dos poços tratados de cada [ ]}}{\text{média do número de células do controle}} \times 100$$

E pelo método de redução do MTT, após o período de incubação, cada poço recebeu 10 µL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 5 mg/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 descartado cuidadosamente. Adicionou-se, então, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, RJ, Brasil) em cada poço, para solubilização dos cristais de formazan, a placa foi homogeneizada e a concentração de formazan solubilizado foi quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor 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 do extrato foi calculada da seguinte forma:

$$\%Viabilidade = \frac{\text{Média da absorbância de cada [ ] do extrato - brancos}}{\text{Média da absorbância do controle - brancos}} \times 100$$

As amostras foram analisadas em sextuplicatas em três experimentos independentes, sendo os resultados obtidos submetidos à análise estatística e representados em gráfico.

### 3.5 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De modo geral há uma retração da célula, estrangulamento do citoplasma, fragmentação do DNA e condensação da cromatina, formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs*) e empacotamento do conteúdo celular em vesículas (corpos apoptóticos). Essas alterações de autodestruição celular, *in vivo*, fazem com que a célula seja fagocitada por células especializadas como os macrófagos (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008). No entanto, *in vitro*, a célula apoptótica acaba extravasando seu conteúdo, como na necrose, devido à ausência das células fagocíticas (PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008).

A investigação da apoptose pela análise da morfologia celular foi realizada por microscopia óptica e de fluorescência, através da coloração descrita por Rosenfeld (1947) e pelo corante Hoechst 33342 (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

### 3.5.1 Morfologia celular com corante Rosenfeld

Esta técnica compreende uma mistura de corantes pancrômicos, Giemsa e May-Grunwald, capazes de colorir em tons rosados os componentes de núcleo, por este ser mais ácido, e em tons azulados os componentes do citoplasma (mais básico).

#### 3.5.1.1 Preparo da solução de Rosenfeld

A solução de Rosenfeld foi obtida a partir da mistura de 0,97 g do corante Giemsa (Merck, Brasil) e 0,53 g do corante May-Grunwald (Merck, Brasil) em 1 mL de metanol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Antes de usar, a solução foi filtrada.

#### 3.5.1.2 Preparo das lâminas

Inicialmente as lâminas foram confeccionadas por citospin. Para isto as células K-562 na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL foram incubadas sem e com 75  $\mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Em seguida as células foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O botão celular foi ressuspensionado em PBS e 250  $\mu\text{L}$  das suspensões celulares (com e sem tratamento) foram colocadas nas lâminas e submetidas à centrifugação a 800 rpm por 10 minutos.

#### 3.5.1.3 Coloração das lâminas

Após o *citospin* as células foram expostas a 200  $\mu\text{L}$  do corante Rosenfeld durante 3 minutos, em seguida foi acrescentado o mesmo volume de água destilada por 15 minutos e, então, as lâminas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso do corante.

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.

#### 3.5.1.4 Índice de células com fragmentação na cromatina

Para a determinação do índice de células com fragmentação na cromatina, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (DM 2000, Leica microsystems, USA) e as imagens foram fotografadas usando a objetiva de 100x e *zoom* de 5x (Canon powershot S80). Para cada amostra, foram analisados 6 campos microscópicos consecutivos e a análise quantitativa foi realizada considerando a porcentagem de células com características morfológicas de apoptose em relação ao total.

### 3.5.2 Avaliação da morfologia celular com corante Hoechst 33342

O corante Hoechst 33342 (2-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5,1-trihidrocloridrato de benzimidazol) devido a sua habilidade.

#### 3.5.2.1 Preparo 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.

#### 3.5.2.2 Coloração das lâminas

Após o *citospin*, as células foram expostas a uma solução fixadora de ácido acético e metanol (1:3) por 10 minutos, expostas a 100 µL do corante durante 10 minutos no escuro e lavadas com água deionizada. Em seguida a lamínula foi fixada com glicerina 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.

### 3.6 EFEITOS DE *E. dysenterica* DC. SOBRE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

A célula é capaz de monitorar os ambientes intra e extracelular durante as fases G1, G2 e M do ciclo celular. Esta capacidade permite à célula assegurar as condições ideais para prosseguir a divisão celular. Ao final das fases, G1 e G2, e na fase M ocorrem os *checkpoints* (pontos de checagem), onde, se o ambiente não for favorável ao desenvolvimento da célula, esta atrasa seu processo em uma das fases podendo entrar em apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA,

2007, PELLEGRINI, PINTO & CASTILHO, 2008). Portanto, é de extremo interesse que uma substância com potencial antitumoral provoque danos à célula, impossibilitando-a de progredir no ciclo celular.

Assim, a fim de analisar se o extrato de *E. dysenterica* DC. seria capaz de alterar algum ponto do ciclo celular, as células K-562 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram tratadas sem e com 75  $\mu\text{g/mL}$  (CI50 de 72 horas) de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Após incubação as células foram transferidas para tubo de citometria, lavadas com 1 mL de PBS gelado e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente o botão celular foi fixado com 1 mL de etanol a 70% e incubado a  $-20^\circ\text{C}$  overnight. Em seguida as células foram lavadas com PBS gelado, e as células marcadas foram expostas à 200  $\mu\text{g/mL}$  de RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 50  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubadas a  $4^\circ\text{C}$  no escuro por 2 horas. E ao restante dos tubos foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Após o período de incubação as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, NJ, USA) e os resultados apresentados em gráficos tipo histograma indicando o número de células versus o conteúdo de DNA indicado pela intensidade de fluorescência. Foram selecionados 10.000 eventos de células homogêneas (gate).

### 3.6.1 Análise da expressão de ciclina D1

Ciclina D1 é uma proteína que atua no ciclo celular acelerando a fase G1 para entrar na fase S. É considerada um oncogene uma vez que seu aumento desregula o ciclo celular e contribui para o aparecimento do câncer (MAAHS et al., 2007).

Para análise da expressão de ciclina D1 as células K-562 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas sem e com 75  $\mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI mais 10% de soro fetal bovino e em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Após incubação as células foram lavadas com PBS-BSA gelado duas vezes, 1500 rpm por 10 minutos. Logo após as células foram expostas a 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de fixação e permeabilização (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego) por 20 minutos e lavadas com PBS acrescido de 0,5% de tween 20 (PBS-T20). Em seguida foram expostas a 5  $\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal específico ciclina D1-PE durante 20 minutos no escuro. Após este período, as células foram lavadas com PBS-T20, 1500 rpm por 10 minutos e o botão celular

ressuspenso em 300 µL de PBS-BSA. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, NJ, USA).

### 3.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INDUTOR DE APOPTOSE DE *E. dysenterica* E OS MECANISMOS DE INDUÇÃO DE APOPTOSE

Sabe-se que a ação antineoplásica dos agentes quimioterápicos está intimamente relacionada à apoptose. Porém evidências têm mostrado que a ação antitumoral de muitas drogas tem seu mecanismo de ação principal sobre o limiar desse processo de morte, fato este que justifica a importância de se estudar o processo apoptótico e tudo que possa estar relacionado a ele (MOTA, 2010).

A avaliação do potencial indutor de apoptose de *E. dysenterica* DC. foi realizada por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, USA) através da avaliação do estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular, da avaliação do potencial de membrana mitocondrial pela coloração com rodamina 123 (Rh-123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), do monitoramento da expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico utilizando anticorpos monoclonais como bax, bcl2, TNF-R1, NFκβ, e citocromo c, e através da avaliação da externalização da fosfatidilserina por marcação com anexina V-FITC (Kit TACS Annexin V-FITC apoptosis detection, R&D Systems, UNITED Kingdom)

Além disso, foi analisada, por espectrofotometria a capacidade da *E. dysenterica* DC. em ativar a cascata das caspases. Para isso, foi avaliada a caspase iniciadora 8 e a caspase efetora 3.

#### **3.7.2 Avaliação de estresse oxidativo pelo aumento da geração de ERO intracelular**

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio. Apresentam alto poder reacional devido à presença de elétrons desemparelhados na camada de valência. Essas espécies são conhecidas como mensageiros secundários intracelulares quando em baixas concentrações, porém desempenham importante papel na sinalização celular apoptótica quando em altas concentrações. Elas são liberadas no citoplasma principalmente devido à ruptura de mitocôndria, mas também podem influenciar a função mitocondrial por agir no

potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) dessas organelas e assim promover a ativação de caspases executoras (ANAZETTI & MELO, 2007; LUO, LI & CHEN, 2009).

O corante fluorescente acetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) foi utilizado para mensurar os níveis de ERO induzidos pela *E. dysenterica* DC.. O DCFH-DA é um composto que é diacetilado por esterases a diclorodihidrofluoresceína (DCFH). O DCFH, por sua vez, na presença de ROS, é oxidado a diclorofluoresceína (DCF) emitindo alta fluorescência.

Para a realização deste ensaio, as células K562 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas sem e com 75  $\mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI mais 10% de soro fetal bovino e em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , durante 3, 6, 12 e 24 horas. Após as incubações as células foram lavadas com PBS a  $37^\circ\text{C}$ , 1500 rpm por 10 minutos e expostas ao DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 10  $\mu\text{M}$  (400  $\mu\text{L}$ ) por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro. Em seguida a intensidade de fluorescência foi mensurada em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, USA). Os resultados foram representados em gráficos indicando o número de células versus a intensidade de fluorescência produzida pelo corante. Foram selecionados 10.000 eventos em gate.

### 3.7.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

A mitocôndria é considerada a principal mediadora do processo apoptótico. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial, liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes e conseqüente perda do potencial de membrana mitocondrial. A perda do  $\Delta\psi_m$  leva a uma diminuição da produção de energia pela célula, enquanto o citocromo c, ao sair da mitocôndria, interage com o domínio CARD da proteína Apaf-1, formando um complexo que catalisa a ativação de caspases, culminando com a morte celular (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; SMAILI et al., 2009).

Alterações do potencial de membrana mitocondrial foram analisadas pelo monitoramento das células após coloração com rodamina 123 (Rh 123). Este fluorocromo catiônico é atraído pelo elevado potencial elétrico negativo da membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações que comprometam a integridade mitocondrial podem ser detectadas através da redução da fluorescência nestas organelas (PEREIRA, 2009).

Para este ensaio, as células K562 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram tratadas sem e com  $75 \mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 3, 6, 12 e 24 horas. Em seguida as células foram lavadas com PBS a  $37^\circ\text{C}$ , 1500 RPM por 10 minutos e expostas a  $1 \mu\text{g/mL}$  de rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro. Logo as amostras foram lavadas como anteriormente e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram representados em gráficos indicando o número de células versus a intensidade de fluorescência produzida pela incorporação do corante. Foram selecionados 10.000 eventos em gate.

#### **3.7.4 Estruturas envolvidas no processo apoptótico: bax, bcl2, TNF-R1, FAS, NFK $\beta$ e citocromo c**

As proteínas intracelulares foram identificadas por anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. As células K562 na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas sem e com  $75 \mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC. em meio RPMI mais 10% de soro fetal bovino e em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Após incubação as células foram lavadas com PBS-BSA gelado duas vezes, 1500 rpm por 10 minutos. Para averiguar a expressão dos receptores de membrana TNF-R1 e FAS as células foram expostas a  $10 \mu\text{L}$  dos anticorpo TNF-R1 e FAS (Santa Cruz, Biotechnology) por 20 minutos. Em seguida essas células foram lavadas com PBS-BSA, 1500 rpm por 10 minutos. Para averiguar a expressão das proteínas citoplasmáticas bax (Santa Cruz, Biotechnology), bcl-2 (Santa Cruz, Biotechnology), NFK $\beta$  (Santa Cruz, Biotechnology), e citocromo c (Santa Cruz, Biotechnology) as células foram expostas a  $250 \mu\text{L}$  de uma solução de fixação e permeabilização (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego) por 20 minutos e lavadas com PBS acrescido de 0,5% de tween 20 (Vetec, RJ, Brasil) (PBS-T20). Em seguida foram expostas aos anticorpos monoclonais específicos para cada proteína supracitada durante 20 minutos no escuro. Após esta incubação, as células foram lavadas com PBS-T20, 1500 rpm por 10 minutos e o botão celular ressuspenso em  $300 \mu\text{L}$  de PBS-BSA. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo a partir da seleção em gate de 10.000 eventos.

### 3.7.4 Detecção da externalização da fosfatidilserina através da marcação com anexina V- FITC

A anexina V é uma proteína de 37KD com capacidade de se ligar com facilidade aos fosfolipídeos de carga negativa da superfície celular na presença de íons cálcio. A simetria destes fosfolipídeos é rompida no início do processo apoptótico levando à exposição da fosfatidilserina pela membrana plasmática. Dessa forma, a marcação com anexina V permite identificar as alterações que ocorrem na membrana plasmática durante o início desse processo de morte. Esta marcação conjuntamente com o corante vital iodeto de propídeo (PI) permite, também, a diferenciação entre células em apoptose inicial, tardia, células necróticas e células viáveis (LANDI & MARQUES JÚNIOR, 2003; R&D Systems, 2008).

Para este ensaio, as células K-562 foram incubadas a  $1 \times 10^6$  células/mL com 75  $\mu\text{g/mL}$  de *E. dysenterica* DC.. Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas a 1500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em PBS gelado, e lavadas novamente com tampão diluído (1:10) do kit. Cada tubo para citometria de fluxo, previamente identificado, recebeu 100  $\mu\text{L}$  de reagente de incubação (Kit TACS Annexin V-FITC apoptosis detection, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) contendo 10  $\mu\text{L}$  de tampão, 10  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo, 1  $\mu\text{L}$  de anexina V-FITC e água ultrapura (Millipore corporation, NY, USA), durante 15 minutos no escuro. Em seguida, foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de tampão diluído 1:10 em água ultrapura e realizada a leitura em citômetro de fluxo. Os resultados foram representados em gráficos dot plots a partir da seleção em gate de 10.000 eventos.

### 3.7.5 Atividade das caspases 3 e 8

As *caspases* (de *cysteine asparagil specific proteases*) são enzimas que possuem cisteína no sítio ativo e que clivam proteínas em sítios com resíduos de ácido aspártico. Devido a ação direta ou indireta desse grupo de proteases acontece as mudanças morfológicas celulares características do processo de apoptose. As caspases envolvidas no processo apoptótico podem ser de dois tipos: caspases iniciadoras (como as caspases 2, 8, 9, 10 e 12) que clivam pró-formas inativas de caspases efetoras e caspases efetoras (como as caspases 3, 6 e 7) que por sua vez clivam outros substratos protéicos da célula resultando em apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; PEREIRA, 2009).

Para avaliação da atividade das caspases foi utilizado o kit colorimétrico de proteases (Caspase 3 ou 8 Assay kit, colorimetric, Sigma), de acordo com as instruções do fabricante, após a incubação das células com *E. dysenterica* DC. por 24h. O ensaio é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilina (*p*NA) após a quebra das substâncias X-*p*NA, onde o X são seqüências de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas. Após 3 horas de incubação com o substrato de cada caspase pesquisada (caspase 3 e 8), foi feita a leitura em aparelho de espectrofotometria a 405 nm.

### 3.8 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

#### 3.8.1 Animais

Para o ensaio da atividade antitumoral *in vivo*, assim como para a manutenção das células tumorais de Ehrlich, foram utilizados camundongos Swiss machos com idade de 8 a 10 semanas, os quais foram fornecidos pelo Biotério da Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). Durante a fase experimental, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água à vontade.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética animal desta Universidade obtendo o protocolo CEPMHA/HC/UFG no.: 137/2009.

#### 3.8.2 Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O tumor ascítico de Ehrlich, originalmente descrito por Ehrlich e Apollant em 1905 como um adenocarcinoma de mama, teve origem espontânea em camundongos. Este modelo experimental auxilia a compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como permite avaliar a atividade e o mecanismo de ação de compostos com perspectivas a novos agentes quimioterápicos (MOTA, 2010; BROMBERG et al., 2010). É amplamente utilizado uma vez que apresenta inespecificidade diante das diferentes linhagens murinas, não regredi espontaneamente, é facilmente transplantável no tecido cutâneo ou no peritônio e apresenta um comportamento agressivo mesmo quando implantado em concentrações pequenas (NOGUEIRA, 2008).

A linhagem tumoral de Ehrlich foi originalmente cedida pelo Prof. Dr. Szulim Zyngier, do Departamento de Farmacologia (ICB-USP). Ela é mantida nas

dependências do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular - UFG através de passagens sucessivas, intraperitoneais, entre animais. As células tumorais crescem na cavidade peritoneal dos camundongos, facilitando sua manutenção através de passagens consecutivas.

Para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, camundongos Swiss machos e saudáveis foram inoculados intraperitonealmente com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais, contendo  $6 \times 10^6$  células/mL, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores. Para obtenção das células, após dez dias de evolução do tumor, o animal doador foi anestesiado subcutaneamente com 10mg/Kg de Xilazina (Syntec, Cotia-SP, Brasil) e 100 mg/Kg de Cetamina (Agener, Embu-Guaçu-SP, Brasil), e após constatação da ausência de reflexo de pata, foram eutanasiados por deslocamento cervical e o líquido ascítico colhido com seringa estéril.

Após a retirada do fluido viscoso e de aspecto leitoso do peritônio dos camundongos doadores, o número e a viabilidade das células tumorais foram determinados através da exclusão do corante azul de tripano em câmara de Neubauer sob microscopia óptica:

$$\text{Viabilidade} = \text{número de células} \times \text{diluições} \times \text{profundidade da câmara} (10^4)$$

### 3.8.3 Realização da curva de sobrevida

O líquido ascítico formado na cavidade abdominal dos camundongos é a fonte nutricional direta para as células do tumor, portanto um aumento rápido desse líquido favorece o crescimento tumoral uma vez que garante as exigências nutricionais para satisfazer as células do tumor (BOMBERG et al., 2010).

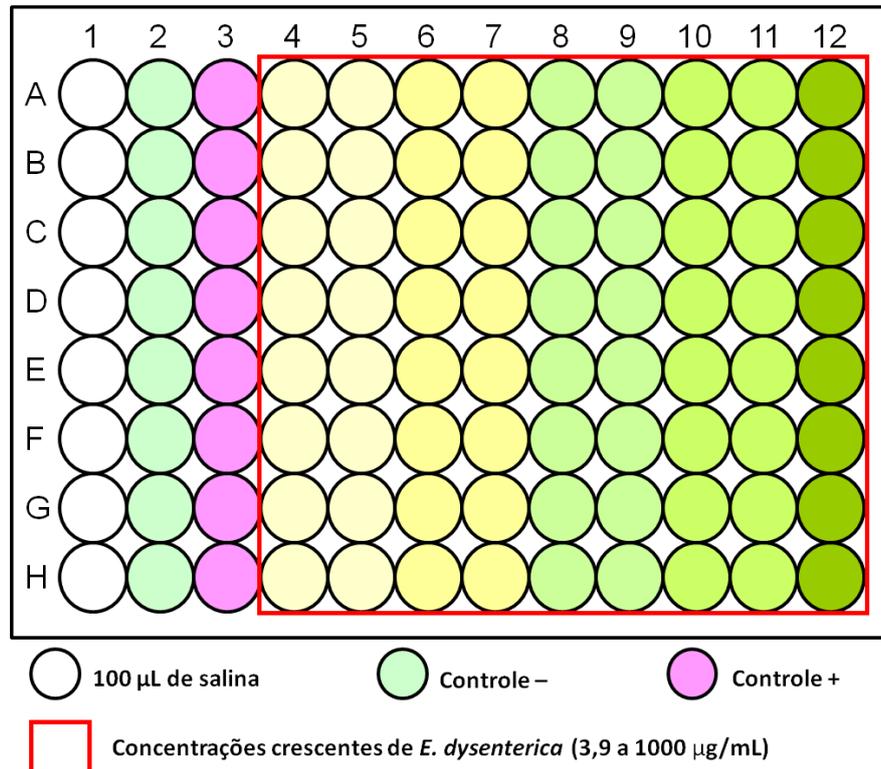
Dessa forma, o estudo dos efeitos do tratamento com o extrato padronizado hidroalcolólico das folhas da *E. dysenterica* DC. foi realizado através da avaliação da sobrevida dos animais com o tumor após o tratamento com diferentes doses: 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg. Os animais foram divididos em 4 grupos contendo 6 animais: um grupo controle (animais portadores do TAE e sem tratamento com o extrato) e três grupos tratados com as diferentes doses do extrato. No dia zero o tumor foi inoculado intraperitonealmente e após 24 h o tratamento oral (gavage) foi iniciado perdurando 10 dias. O extrato foi preparado em água e DMSO na proporção 9:1.

Iniciado o tratamento, os animais foram observados diariamente até completar 30 dias de teste e as mortes de cada animal dos diferentes grupos foram registradas.

### 3.9 ENSAIOS DE SEGURANÇA

#### 4.9.1 Avaliação do potencial hemolítico

A membrana do eritrócito é uma estrutura dinâmica que pode sofrer mudanças significativas na sua interação com fármacos (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Por isso, a fim de avaliar um possível efeito colateral do extrato hidroalcolólico da *E. dysenterica* DC. sobre células sanguíneas sadias, foi avaliada a atividade hemolítica. Este ensaio consiste na avaliação do potencial de uma substância em causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Para esta avaliação o sangue de carneiro suplementado com 0,7% de citrato (EBE-farma, Biológica e Agropecuária LTDA) foi diluído em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM, pH 7,4) originando uma solução de eritrócitos (SE) a 2%. O experimento foi realizado em placa com 96 poços (**Figura 11**) de acordo com a metodologia proposta por Costa-Lotufo e colaboradores (2002). Após incubação com diferentes concentrações do extrato da *E. dysenterica* DC. (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 µg/mL) por 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), a placa foi centrifugada (1500 rpm por 10 minutos) e realizada a leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 540 nm.



**Figura 11:** Representação esquemática do teste de hemólise. Nos poços da coluna 1 foi colocado 100 µL de salina. Nos poços da coluna 2, 90 µL de salina e 10 µL de DMSO 1% (controle -). Nos poços da coluna 3, 60 µL de salina e 40 µL de Triton X-100 0,5% (controle +). Nos poços do quadrante vermelho foi colocado 100 µL do extrato de *E. dysenterica* nas concentrações crescentes (3,9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL). Em seguida 100 µL da SE 2% foi adicionada em todos os poços.

### 3.9.2 Ensaio de incorporação do vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) em linhagem basal 3T3

O corante vermelho neutro é comumente utilizado como indicador de citotoxicidade por acumular nos lisossomos de células viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Este corante vital, ligeiramente catiônico, penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos, inclusive fosfatos hidrofóbicos, na matriz lisossomal (MELO, 2000).

Todavia, partindo da presunção de que os sistemas celulares respondem de forma equivalente quanto à toxicidade independente do critério adotado para medição da viabilidade, o teste de incorporação do vermelho neutro também é empregado como uma respeitável ferramenta para redução do número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica (VIEIRA et al., 2010). Esta avaliação da citotoxicidade basal é importante e útil na toxicologia *in vitro* porque, como já

sabido, as funções celulares basais implicam nas funções celulares órgão-específicas (VALADARES, 2006).

Dessa maneira, por se tratar de uma metodologia amplamente difundida no meio científico, com ótima reprodutibilidade, de fácil execução e de baixo custo relativo, o ensaio vermelho neutro pode ser empregado para auxiliar a escolha da dose na avaliação da toxicidade oral aguda segundo a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001. Para este objetivo o valor da CI50 (concentração que inibe 50% das células tratadas quando comparado às células controle não-tratadas) é utilizado para estimar a DL50 (dose letal mediana) de acordo com a **Equação 1** validada pelo Comitê de Coordenação Interagenciais para Validação de Métodos Alternativos (*Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods*; ICCVAM) (ICCVAM, 2006).

$$\log (DL50) = 0,372 \times \log (IC50) + 2,024$$

**Equação 1:** Equação para estimar DL50 (mg/Kg) de misturas a partir do CI50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrado no teste vermelho neutro.

#### 3.9.1.1 Preparo da suspensão celular

O volume de 20 mL contido na garrafa de cultivo celular, após serem desaderidas por ação de tripsina a 0,025 %, foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Descartados o sobrenadante, o botão celular foi ressuspensão com 1 ml de meio DMEM. Desse volume foi retirada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  e colocados em 180  $\mu\text{L}$  de azul de tripano, após homogeneização 20  $\mu\text{L}$  foram retirados e colocados em câmara de Neubauer para o cálculo da viabilidade:

$$\text{Número de células contadas} \times 10 \text{ (diluição)} \times 10^4 \text{ (diluição da câmara)}$$

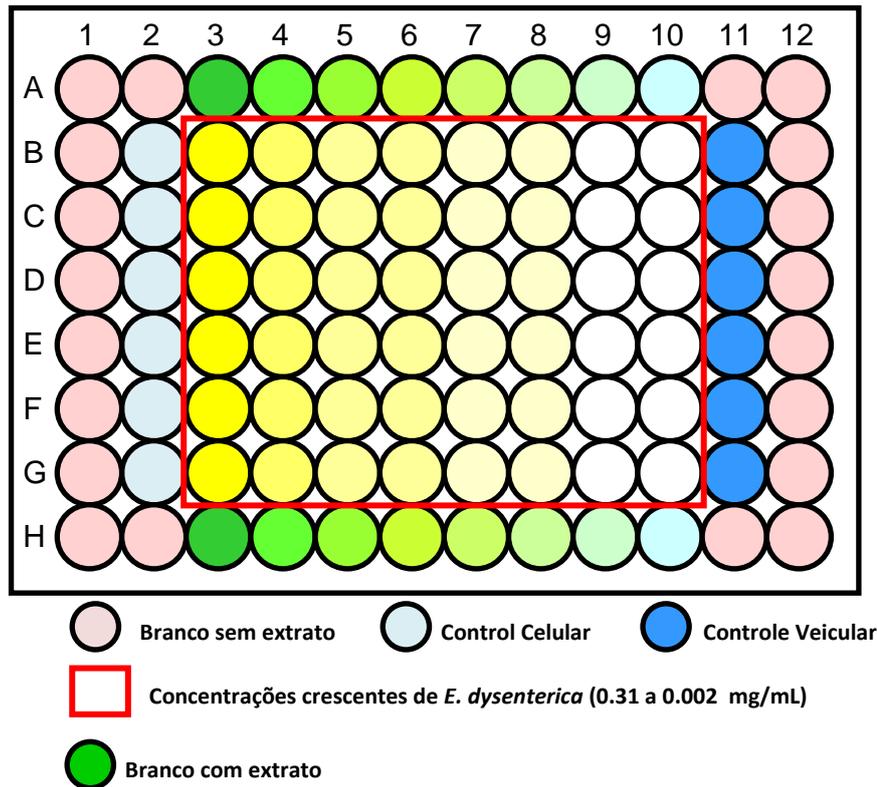
A viabilidade para realização do teste foi sempre superior a 90%. E a concentração celular utilizada no plaqueamento foi de  $3 \times 10^4$  células/mL.

#### 3.9.1.2 Plaqueamento

Como representado na **Figura 12**, a suspensão celular ( $3 \times 10^4$  células/mL) foi distribuída em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), 50  $\mu\text{L}$  por poço, e incubadas a 37 °C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Em seguida, as células

foram expostas a 50  $\mu$ L de diferentes concentrações do extrato hidroalcolico da *E. dysenterica* DC. (0.31, 0.15, 0.078, 0.039, 0.019, 0.009, 0.0048, 0,0024 mg/mL) e incubadas novamente sob as mesmas condições. Em seguida, o conteúdo líquido da placa foi desprezado, as células aderidas nos poços foram expostas a 250  $\mu$ L de uma solução contendo 5% de soro fetal bovino (Cultilab<sup>TM</sup>), 1% do corante vermelho neutro a 0.3% (Sigma) e meio DMEM - 1640 (Sigma<sup>TM</sup>, St. Louis, MO) por 3 horas a 37° C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Logo após, a solução contendo o vermelho neutro foi removida dos poços, as células foram lavadas com 250  $\mu$ L de PBS a 37° C e foi adicionado 100  $\mu$ L de uma solução reveladora contendo 1% de ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 50 % de etanol P.A (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 49% de água deionizada por 20 minutos. Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica em aparelho de ELISA (Start fax 2100, Awareness Technology, Dusseldorf, Germany) a 540 nm.

As amostras foram analisadas em sextuplicatas em três experimentos independentes, sendo os resultados obtidos submetidos à análise estatística e representados em gráfico.



**Figura 12:** Representação esquemática do teste de citotoxicidade – Método de captura do corante vermelho neutro em células 3T3. 1ª ETAPA: Nos poços da coluna 1 e 12 e nos poços A2, H2, A11 e H11 da placa foi colocado 100 µL de meio DMEM para garantir a umidade e nos demais poços foi colocado a suspensão celular a  $3 \times 10^4$  células/mL. 2ª ETAPA: Nos poços B2 ao G2 50 µL de meio DMEM, nos poços B11 ao G11 50 µL de DMSO a 0,12%, nos poços centrais 50 µL do extrato hidroalcoólico de *E. dysenterica* DC. nas diferentes concentrações, nos poços A3 ao A11 e H3 ao H11 50 µL do extrato correspondente a concentração testada na respectiva coluna e completar o volume de todos estes poços citados com 50 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. O teste foi feito em sextuplicata.

#### 4.9.3 Avaliação da Toxicidade Oral Aguda do extrato padronizado hidroalcoólico das folhas de *E. dysenterica* CD.

A toxicidade oral aguda foi realizada de acordo com o preconizado no guia OECD 423 “Toxicidade Oral Aguda de Classe”, 2001. O guia determina as doses a serem utilizadas (5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg ou 2000 mg/Kg) e o número de três animais do mesmo sexo por dose. Trata-se de um guia que consente com o conceito dos 3R’s (reduction, refinement and replacement – reduzir, refinar e substituir) adotado pela sociedade e comunidade científica com intuito de atenuar a quantidade e o sofrimento dos animais usados na pesquisa, além

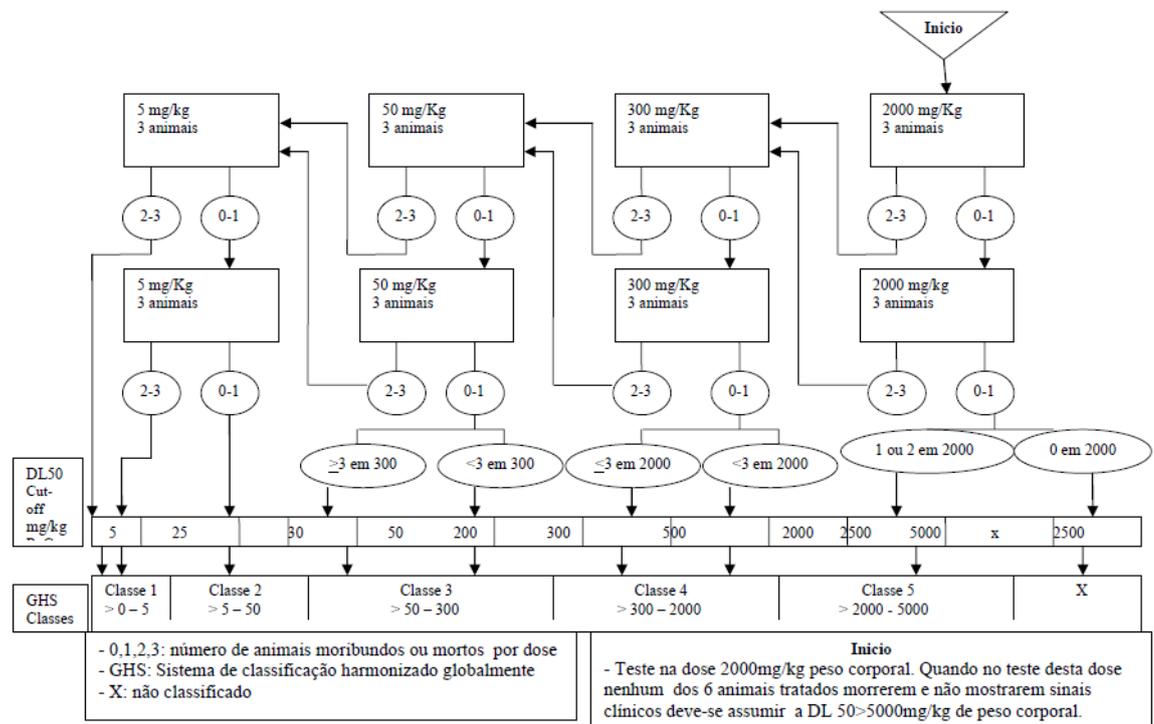
de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (Globally Harmonised System - GHS) (SACHETTI et al., 2009).

O método de classificação da toxicidade aguda estabelecido neste guia baseia-se na avaliação biométrica (medida das características físicas ou comportamentais dos seres vivos) dos animais submetidos à dose(s) fixa(s) da substância em estudo. Esta avaliação permite uma categorização verídica e reproduzível da toxicidade. Dependendo do estado moribundo ou morte dos animais submetidos às diferentes doses, a toxicidade é classificada em 5 categorias: classe 5 (havendo morte de 0 a 1 animal,  $2000 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL50} \leq 5000 \text{ mg/Kg}$ ), classe 4 (morte de 0 a 1 animal,  $300 \leq \text{DL50} < 2000 \text{ mg/Kg}$ ), classe 3 (morte de 0 a 1 animal,  $50 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL50} < 300 \text{ mg/Kg}$ ), classe 2 (morte de 0 a 1 animal,  $5 \text{ mg/Kg} \leq \text{DL50} < 50 \text{ mg/Kg}$ ) e classe 1 quando ocorre de 2 a 3 mortes dos animais tratados com a dose de 5 mg/Kg caracterizando uma amostra altamente tóxica (**Figura 13**).

Para o nosso estudo a dose inicial selecionada do extrato de *E. dysenterica* DC. foi de 2000 mg/Kg definida a partir de dados obtidos *in vitro* no teste de incorporação do vermelho neutro com células basais 3T3. O extrato foi preparado em óleo vegetal comestível (óleo de girassol) e administrado oralmente (gavage) o volume de 0,2 mL em camundongos Swiss fêmeas. Esta dose foi testada duas vezes e assim estimada a categoria toxicologia do extrato segundo as especificações do guia. Os animais ficaram restritos à ração por 2 horas antes da administração da dose. O peso corporal dos animais foi verificado um dia anterior a administração do extrato e no último dia (décimo quarto dia) do teste.

Durante o período experimental os animais foram observados continuamente por 12 horas e em seguida observados diariamente para verificação de qualquer alteração no comportamento geral ou nas atividades fisiológicas. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático o qual verifica os efeitos produzidos pela substância sobre o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo do animal. A saber: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de calda, contorção, posição trem posterior, reflexo de endireitamento, força para

agarrar, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, straub, anestesia, lacrimação, ptosis palpebral, piloereção, cianose e morte.



**Figura 13:** Procedimento para classificação d toxicidade oral aguda iniciando com a dose de 2000 mg/Kg. Fonte: OECD 423, 2001.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad prism (versão 5.0 para Windows XP, Graph Pad Software, San Diego, California). A avaliação da citotoxicidade foi realizada a partir de três experimentos independentes e em sextuplicata. Os resultados foram transformados em porcentagem em relação ao controle e o IC50 foi obtido por análise de regressão não-linear. A curva de sobrevivida foi analisada através da curva de Kaplan Meier. Todos os outros ensaios foram analisados por teste *t* de Student. As médias foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Os dados foram apresentados graficamente em médias  $\pm$  desvio-padrão.

#### **4. RESULTADOS**

Os resultados estão representados no artigo (Anexo I).

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo evidenciaram que o extrato hidroalcólico das folhas de *E. dysenterica* DC. apresentou efeitos citotóxicos *in vitro*, sobre as linhagens leucêmicas HL60 e K562, atividade antitumoral *in vivo* e perfil de segurança. Diante dos dados obtidos podemos concluir:

- O extrato padronizado hidroalcólico das folhas de *E. dysenterica* DC. possui efeito citotóxico sobre as células leucêmicas HL60 e K562;
- As células K562 tratadas com o extrato apresentaram alterações morfológicas características de apoptose;
- O extrato hidroalcólico foi capaz de induzir células HL60 e K562 à morte por apoptose;
- O tratamento com extrato padronizado hidroalcólico das folhas de *E. dysenterica* DC. promoveu retenção das células K562 nas fases G2/M do ciclo celular;
- *E. dysenterica* DC. reduziu a expressão de NFκB nas células K562;
- Provocou aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e alterou o potencial de membrana mitocondrial das células K562;
- Diminuiu a expressão de Bcl2 e aumentou a expressão de Bax em células HL60;
- Promoveu a liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol de células HL60;
- Provocou externalização da fosfatidilserina na membrana celular de K562 e ativação das caspases 3 e 8;
- O tratamento com extrato hidroalcólico de *E. dysenterica* DC. (125, 250 e 500mg/kg), por 10 dias, via oral, aumentou a taxa de sobrevivência de camundongos Swiss portadores de TAE;
- O extrato padronizado hidroalcólico das folhas de *E. dysenterica* DC. apresentou citotoxicidade concentração-dependente às células basais 3T3. Porém, é relevante, observar, que a concentração inibitória de 50% das células 3T3 foi cerca de 7 e 2 vezes menor que para as células HL60 e K562, respectivamente;

- O extrato não provocou hemólise em nenhuma das concentrações testadas (1000, 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 µg/mL);
- E foi bem tolerada, apresentando perfil de toxicidade oral aguda classe 5 segundo o guia OECD 423 (2001).

Esses resultados demonstraram, pela primeira vez, que o extrato hidroalcolico da espécie *E. dysenterica* DC. pode ser considerado um potente indutor de apoptose, com nenhuma toxicidade oral aguda, abrindo perspectivas na pesquisa de novos agentes para o tratamento de câncer hematológico e carcinomas.

## REFERÊNCIAS

ABRALE Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, disponível em: < <http://www.abrale.org.br/> >. Acesso em 20 de jan. 2011.

ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S.; FRANCO, S.L.; LIMA, M.A.P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.1, p.37-50, 2001.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: Uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; HENRIQUES, A.T. Investigação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de espécies da família Myrtaceae. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 15, Águas de Lindóia, 1998. **Anais**. Águas de Lindóia, p.51, 1998.

ASTER, J. C. Os sistemas hematopoiético e linfóide. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 12, p. 461-523.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.52, n.1, p.55-61, 2003.

AVARINDARAM, K.; YANG, N.S. Anti-Inflamatory plants natural products for câncer therapy. **Planta Médica**, v.76, p.1103-1117, 2010.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.

BHARAT, B.A.; SHISHIR, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemistry Pharmacology**, v. 71, n.10, p.1397-1421, 2006.

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. **Toxicol**, v. 51, p. 1321-1330, 2008.

BONTEMPO, P., MITA, L., MICELI, M., DOTO, A., NEBBIOSO, A., DE BELLIS, F., CONTE, M., MINICHELLO, A., MANZO, F., CARAFA, V., BASILE, A., RIGANO, D., SORBO, S., COBIANCHI, R., SCHIAVONE, E. M., FERRARA, F., DE SIMONE, M., VIETRI, M.T., CIOFFI, M., SICA, V., BRESCIANI, F., LERA, A.R., ALTUCCI, L., MOLINARI, A.M. *Feijoa sellowiana* derived natural Flavone exert anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.1902-1914, 2007.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J.L.; REGATIERI, C.V.; PALLDINO, M.V.; DURÁN, N.; NADER, H.B.; HAUN, M.; JUSTO, G.Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v.186, p.43-52, 2010

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, n.6, p.401-18, 2000.

COELHO, F.B.R.; DAL BELO, C.A.; LOLIS, S.F.; SANTOS, M.G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.52-55, 2005.

CONDUTAS DO INCA. Leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.49, n.1, p.5-8, 2003.

COUTO, R.O.; VALGAS, A.B.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc (Myrtaceae). **Revista eletrônica de Farmácia**, v.6, n.3, p.59-69, 2009.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**, v.40, p.1231-1234, 2002.

COSTA-LOFUTO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A contribuição dos produtos

naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

COSTA, T.R.; FERNANDES, O.F.L.; SANTOS, S.C.; OLIVERA, C.N.A.; LIÃO, L.N.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SALES, B.H.N.; SILVA, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.111-117, 2000.

CROWELL, P.L.; ELSON, C.E.; BAILEY, H.H.; ELEGBEDE, A.; HAAG, J.D.; GOULD, M.N. Antitumorogenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v.401, p.131-136, 1996

CROWELL, P.L.; ELSON, C.E.; BAILEY, H.H.; ELEGBEDE, A.; HAAG, J.D.; GOULD, M.N. Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.35, n.1, p.31-37, 1994.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v.11, n.1, p.47-52, 2004.

DESAI, A.G.; QAZI, G.N.; GANJU, R.K.; EL-TAMER, M.; BEDI, Y.S.; TANEJA, S.C.; BHAT, H.K. Medicinal plants and cancer chemoprevention. **Current Drug Metabolism**, v.9, n.7, p.581-591, 2008.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-81, 1985.

FERRI, P.H.; DUARTE, A.R.; COSTA, A.R.T.; SANTOS, S.C.; PAULA, J.R.; NAVES, R.V. Changes in volatile constituents during fruit ripening of wild *Eugenia dysenterica* D.C. **Journal of Essential Oil Research**, v.20, p.30-32, 2008.

FILHO, G.B.; PEREIRA, F.E.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celulares. In.: **Bogliolo Patologia Geral**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 8, p.226-281.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, n.2, p.171-177, 2006.

GOTLIEB, O.R.; LEÃO-DA-SILVA, M.; MAIA, J.G.; SOARES, M. Chemistry of Brazilian Myrtaceae. III. Eucaliptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, v.11, n.3, p.1185, 1972.

GOUN, E., PETRICHENKO, V.M., SOLODNIKOV, S.U., SUHIBINA, T.V., MARTIN, KLINE, A., CUNNINGHAM, G., NGUYEN, C., MILES, H. anticancer and antithrombin activity of Russian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.337-342, 2002.

GRAHAN, J.G., QUINN, M.L., FABRICANT, D.S., FARNSWORTH, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.347-377, 2000.

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

ICCVAM. Test Method evaluation report (TMER): In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests. **NIH publication**, n.07-4519, 2006. Research triangle park, NC: National institute for environmental health sciences. Available: <http://iccvam.niehs.nih.gov/S> (accessed 11 outubro 2010).

JOHNSON, I.T. Phytochemicals and cancer. **Proceeding of the Nutrition Society**, v.66, n.2, p.207-215, 2007.

KATO, M.J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v.57, n. 5, p.621-3, 2001.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Brazilian Journal of Cancer**, p. 239-57, 1972.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-FEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v.16, p.3-11, 2009.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. Doenças ambientais e nutricionais. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 8, p. 305-348.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. Lesão celular, morte celular e adaptações. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 1, p. 1-32.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. Reparo tecidual: Regeneração, cicatrização e fibrose. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 3, p. 63-85.

LANDI, E.P.; MARQUES JÚNIOR, J.F.C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.1, p.39-46, 2003.

LEE, W. R.; SHEN, S. C.; LIN, H. Y.; HOU, W. C.; YANG, L. L.; CHEN, Y. C. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca<sup>2+</sup> dependent endonuclease. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 225-236, 2002.

LI, L.; ADAMS, L.S.; CHEN, S.; KILLIAN, C.; AHMED, A.; SEERAM, N.P. *Eugenia jambolana* Lam. Berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but non-tumorigenic breast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.826-831, 2009.

LIST, P.H.; SCHIMIDT, Processing. 4ª edição In.: **Phytopharmaceutical Technology**, Florida: CRC Press, 1989. Cap. 4, p. 122-129.

LOMBARDI, J.A.; GONÇALVES, M. Composição florística de remanescentes de Mata Atlântica do Sudeste de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.3, p.255-282, 2000.

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, C.C.; SHUQUEL, E.A.B.; VIDOTTI, G.J. Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.2, p.180-183, 2001.

LUO, H.; LI, J.; CHEN, L. Jolkinolide B induced mitochondria-dependent apoptosis in human leukemia K562 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, artigo in press, JPP-D-09-00029, 2009.

MAAHS, G.S.; MACHADO, D.C.; LECKEL-NETO, E.A.; MICHAELSEN, V.S. Expressão de ciclina D1 e presença de metástase cervical de carcinoma epidermóide de boca. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.73, n.1, p.93-100, 2007.

MALONE, M. H. and ROBICHAUD, R. C.: **A hippocratic screen for pure or drug materials**. *Lloydia*, v.25, p.320-332, 1962.

MALONE, M. H. – Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Edited by H. Wagner and P. Wolf Springer – Verlag, p.24-53, 1977.

MARKHAM, K.R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In.: **Techniques of Flavonoid Identification**. 1ª edição. London: Academic Press Inc, 1982. Cap.3, p.36-39.

MELO, P.S. Derivados da desidrocrotonina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade. 2000. 116 p. Tese de Doutorado em Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p.137-147, 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p.148-156, 1987b.

MOON, J.Y., MOSADDIK, A., KIM, A., CHO, M., CHOI, H.K., KIM, Y.S., CHO, S.K. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry**, v.125, p.369-375, 2011.

MORALES, A.; PÉREZ, P.; MENDOZAB, R.; COMPAGNONEC, R.; SUAREZ, A. I.; ARVELOB, F.; RAMÍREZ, J. L.; GALINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16b-17a-dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cancer Letters**, v. 218, p. 109–116, 2005.

MOTA, M.F. Investigação da mielotoxicidade e do potencial indutor de morte celular de *Synadenium umbellatum* Pax. em células do tumor ascítico de Ehrlich. 2010. 86 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás.

NAVES, R. V.; BORGES, J.D.; ROCHA, M.R.; CHAVES, L.J. Emergência de plântulas de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) em viveiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, n.2, p.37-40, 1992.

NISHIMO, H.; SATOMI, Y.; TOKUDA, H.; MASUDA, M. Câncer control by phytochemicals. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.33, p.3394-3399, 2007.

NOGUEIRA, I. A. L. Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* pax in vitro e in vivo 2008b.141 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás.

OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. E de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 485- 491, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 423. Acute Oral Toxicity-acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* D.C. (Myrtaceae Jussieu). **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.29-36, 2003.

PAHK, E.J.; PEZZUTO, J.M. Botanicals in câncer chemoprevention. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.21, n.3-4, p.234-255, 2002.

PARK, J. H.; LEE, S.; KIM, J. H.; PARK, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 1, p.113-137, 2008.

PELLEGRINI, M. P.; PINTO, R. C. V.; CASTILHO, L. R. Mecanismos de crescimento e morte de células animais cultivadas *in vitro*. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F.

P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologias do cultivo de células animais**, cap.7, p.138-169, 2008.

PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Antioxidant present in fruit and leaves of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). **Journal Ethnopharmacologic**, v.96, n.1-2, p.43-48, 2005.

PEREIRA, F.E.L. Lesões celulares e do Interstício. Cicatrização. Regeneração. In.: **Bogliolo Patologia Geral**. 4<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 4, p. 82-139.

PORTER, E.A.; SIMMONS, M.S.J.; NICLUHADHA, E. Taxionomic implications of polyhydroxy alkaloids in the Myrtaceae. In: Joint meeting of: American society for pharmacognosy, association française pour l' enseignement et la recherché en pharmacognosie, gesellschaft fue arzneipflanzenforschung, phytochemical society os Europe, Amsterdam, 1999. **Anais**. Amsterdam, 1999.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p.603-13, 2001.

R&D Systems LTDA. **Kit TACS Annexin V-FITC apoptosis detection**, catalog #TA4638/TA5532, 2008.

RIBEIRO, J.F.; PROENÇA, C.E.B.; ALMEIDA, S.P. Potencial frutífero de algumas espécies frutíferas nativas do cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, **Anais**, v.2, n.8, p.491-500, 1986.

RIBEIRO, J.R.U.; ALVES, V.A.; SOUZA, P.M.S.B.; RIBEIRO, A.V.S.; RAWET, V.; NONOGAKI, S.; RODRIGUES, J.G.; HABR-GAMA, A. Correlação das proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma do reto distal - **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.20, n.4, p.248-256, 2000.

ROMAGNOLO, M.B.; SOUZA, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso de Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.3, p.529-548, 2006.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-335, 1947.

SACHETTI, C.G., FASCINELI, M.L., SAMPAIO, J.A., LAMEIRA, O.A., CALDAS, E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba

(*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.437-941, 2009.

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.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Potomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, p. 411-415, 2008.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.95-103, 1999.

SILVA, M.G.; OHARA, M.T.; KATO, E.T.M.; MAIA, J.G.F.; ANDRADE, E.H. de; HOSHIDA, A.M. Estudo farmacognóstico de *Myrciaria glomerata* In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 16, Recife, 2000. **Anais**. Recife, p.172, 2000.

SMAILI, S.; HIRATA, H.; URESHINO, R.; MONTEFORTE, P. T.; MORALES, A. P.; MULER, M. L.; TERASHIMA, J.; OSEKI, K.; ROSENSTOCK, T. R.; LOPES, G. S.; BINCOLETTI, C. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 467-475, 2009.

STREFEZZI, R.F.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.7, p.559-565, 2010.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia. In.: **Robbins Patologia Básica**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 6, p. 187-243.

SZABADKAI G.; RIZZUTO, R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? **FEBS Letters**, v.567, p.111-115, 2004.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VALLILO, M.I.; BUSTILLOS, O.V.; AGUIAR, O.T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cmbessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v.18, n.1, p.15-22, 2006.

VIEIRA, M.S.; OLIVEIRA, V.; LIMA, E.M.; KATO, M.J.; VALADARES, M.C. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, in press antig, doi: 10.1016/j.etp.2010.03.012, 2010.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M.R. Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate à doenças. **Embrapa**, 2009.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, n.2-3, p.97-210, 2009.

WESTON, R.J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p.923-926, 2010.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v.157, p.65-75, 2000.

YOO, C.B.; HAN, K.T.; CHO, K.S.; HA, J.; PARK, H.J.; NAM, J.H.; KIL, U.H.; LEE, K.T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v.225, p.41-52, 2005.

YUNES, R. A .; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J.A. Flavonóides. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5. ed. Porto Alegre: RS. Editora da UFSC, 2005.

## ANEXO 1 - Comprovante de submissão de artigo



**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** asmaa.abdelrahim@h  
para marizecv, alexpsfar, polybenfica, bibettanin, oliveiradocouto, jrealino, mim ▾

3 mai ☆



inglês ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) ×

Dear Dr. Valadares,

The Research Article titled "Investigation of in vitro and in vivo antitumoral activity of Eugenia dysenterica DC. (Mytaceae)," by Wanessa Andrade, Alexandre Santos, Polyana Benfica, Fabiana Bettanin, Rene Couto, Jose Paula and Marize C. Valadares has been received and assigned the number 502818.

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's Manuscript Tracking System.

Thank you for submitting your work to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.



Best regards,

Asmaa Abdelrahim  
Editorial Office  
Hindawi Publishing Corporation  
<http://www.hindawi.com>