



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E
ANTITUMORAL DE UM BENZIL-ISOTIOCIANATO ISOLADO
DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

FORTALEZA

2010

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E
ANTITUMORAL DE UM BENZIL-ISOTIOCIANATO ISOLADO
DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

**Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Leticia Veras Costa-
Lotufo.**

FORTALEZA

2010

R613e Rodrigues, Felipe Augusto Rocha

Estudo das propriedades citotóxica, genotóxica e antitumoral de um benzil-isotiocianato isolado de *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)/ Felipe Augusto Rocha Rodrigues. – Fortaleza, 2010.

138 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, Ceará.

1. Leucemia Mielomonocítica Crônica 2. Apoptose 3. Testes de toxicidade 4. Estresse Oxidativo I. Costa-Lotufo, Letícia Veras (orient.) II. Título.

CDD: 616.99419

FELIPE AUGUSTO ROCHA RODRIGUES

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E
ANTITUMORAL DE UM BENZIL-ISOTIOCIANATO ISOLADO
DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Dissertação aprovada em 27 de Agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo
Universidade Federal do Ceará
(Orientadora)

Profa. Dra. Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas

À Deus,

pelas bênçãos diárias.

Aos meus pais,

pele inspiração e total dedicação.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo** por tudo, tudo, tudo..., desde a oportunidade de me aceitar como estudante, confiança, credibilidade, dedicada orientação e muitos aprendizados.

Aqui os meus sinceros agradecimentos;

Ao **Dr. Manoel Odorico de Moraes** por proporcionar as melhores condições de trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) para que esse trabalho fosse realizado;

À **Dra. Raquel Carvalho Montenegro** por acreditar no meu trabalho e orientar-me sempre que preciso;

À **Dra. Cláudia Pessoa**, pelo apoio, incentivo e amizade;

À **Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves** pelo apoio nas análises das lâminas e pela amizade;

À **Dra. Paula Jimenez** por desde o começo de tudo ajudar-me a trilhar meus passos; sempre me salvando das horas de intenso desespero científico;

Ao **Dr. Geraldo Barbosa** por isolar e disponibilizar quantidades suficientes de amostra para realização desse trabalho;

À **Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes** por disponibilizar a estrutura da Unidade de Farmacologia Clínica para realização de etapas desse trabalho;

À **Silvana França** pela gigantesca paciência por me aturar e pela fundamental dedicação para realização desse trabalho. Enormes, grandiosos agradecimentos...

À **Adelania Roque** pelo apoio e pelos seus conselhos maravilhosos. Meu enorme abraço...

À **Sheyla Prado e Maria das Graças** pelo apoio e a alegria diária;

À **Rogéria** pela disponibilidade de material limpo e pela amizade diária;

Aos amigos do LOE: **Prof. Hidenburgo, Vanesca, Danilo, Diego Veras, Delano, Ana Jérsia, José Roberto, Hemerson, Adriana, Washington, Cecília, Kristiana, Michel, Gardênia, Patrícia, Miller, Elthon, Aline Martins, Arinice, Eveline, Rafael**, pela ajuda diária, companheirismo, aprendizado, apoio e discussões científico-metodológicas. E em especial à Bruno Cavalcanti e Igor (Boy doLOE), pela imensa ajuda na genotoxicidade;

Aos grandes amigos **Nelson Damasceno, Lucas Bezerra e José Lenicélio** pelos momentos felizes, tristes e mais ou menos. Aqui um forte abraço;

Aos irmãos por todos os momentos vividos até o momento. Pelo carinho, companheirismo e amizade. Em especial à Jaldemir Góis por sempre me incentivar e ter orgulho de mim; grande abraço meu brother!!!

À minha queridíssima avó **Maria Angelo da Rocha**, exemplo de ser humano e caráter. Como diria o escritor português Miguel Torga: A Maria Lionça. Por sempre acreditar e apostar em mim. TE AMO!!!

À minha tia **Clarisse Pinheiro**, “*in memoriam*”, por grandes ensinamento. Fique com Deus;

À todos os familiares que estiveram presentes pelo apoio, solidariedade e convivência;

Ao meu Pai **Antônio Augusto Rodrigues** pela total dedicação, amizade, companheirismo; e por ser minha grande inspiração;

À minha Mãe **Aldenira da Rocha Góis** pelo apoio total, amizade, humildade e companheirismo;

À **Silvia Luz** por me proporcionar grandes momentos felizes; e que momentos!!! Aqui meus grandes agradecimentos. Obrigado por tudo. Te Amo!!! Te Amo!!! Te Amo!!! Te Amo!!!.....

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Instituto Claude Bernard – InCb

*A alegria está na luta,
na tentativa,
no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.
(Mahatma Gandhi)*

RESUMO

PROPRIEDADES CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTITUMORAL DE UM BENZIL-ISOTIOCIANATO ISOLADO DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE).

Dissertação de Mestrado. Autor: Felipe Augusto Rocha Rodrigues. Orientadora: Dra. Letícia Veras Costa-Lotufu. Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

Moringa oleifera Lam. é uma planta tropical com grande importância por seus usos medicinais. Vários compostos já foram isolados de diferentes partes da planta, e dentre as atividades farmacológicas podemos destacar a antitumoral. Este trabalho determinou, inicialmente, a atividade citotóxica, por MTT, do composto 4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1), frente a linhagem leucêmica de HL-60 e células mononucleadas isoladas de sangue periférico (CMSP) após 24h de incubação. O composto mostrou-se ativo contra células tumorais de HL-60 e CMSP, onde apresentou uma ligeira seletividade para as células tumorais. Os estudos acerca do mecanismo de ação da atividade citotóxica foi aprofundado em células HL-60 após 24 horas de incubação com e sem pré-incubação com α -tocoferol (40 μ M) através dos seguintes ensaios: 1- Mensuração do estresse oxidativo através do TBARS; 2- Coloração por May-Grunwald-Giemsa; 3- Avaliação da integridade de membrana, viabilidade celular e concentração de células; 4- Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula; 5- Determinação da externalização da fosfatidilserina em células HL-60; 6- Determinação da ativação de caspases iniciadoras (-8 e -9) e efetoras (-3 e -7). O composto induziu estresse oxidativo, diminuiu o número de células e a viabilidade celular e induziu ativação de caspases iniciadoras (8 e 9) e efetoras (3 e 7). Na análise das células coradas por May-Grunwald-Giemsa, podemos observar características morfológicas sugestivas de morte celular por apoptose seguida de necrose secundária na maior concentração (1,4 μ g/mL). Quando pré-incubamos as células de HL-60 com α -tocoferol (40 μ M), todas as características, tanto bioquímicas quanto morfológicas, são suprimidas indicando um importante papel do estresse oxidativo na indução de morte celular promovida pelo composto MFLC-1. A genotoxicidade do MFLC-1 foi determinada em células HL-60 e CMSP após 24h de incubação, onde observamos a formação de ligações cruzadas (cross-links) no DNA, o que foi revertido pela exposição das células tratadas a proteinase K. Dessa forma, observamos um aumento do índice de dano ao DNA com o aumento da concentração, indicando a formação de cross-link do tipo DNA-proteína. Também observamos que o composto é mais genotóxico para as células tumorais que as normais. O efeito antitumoral (*in vivo*) do MFLC-1 foi analisado em camundongos transplantados com o tumor Sarcoma 180 e tratados nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia por via intraperitoneal. A inibição do crescimento tumoral foi de 55,11% e 71,58% nas doses testadas de 25 e 50mg/Kg, respectivamente. A análise histopatológica dos órgãos dos animais mostrou que MFLC-1 provoca efeitos tóxicos moderados, principalmente no fígado e no baço, mas esses podem ser considerados como reversíveis.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*. Benzilisotiocianato. Peroxidação lipídica. Apoptose. HL-60.

ABSTRACT

CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND ANTITUMOR PROPERTIES OF THE A BENZYL-ISOTHIOCYANATE ISOLATED FROM *Moringa oleifera* (MORINGACEAE).

Master's Dissertation. Author: Felipe Augusto Rocha Rodrigues. Advisor: Dra. Leticia Veras Costa-Lotufo. Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.

Moringa oleifera Lam. is a tropical plant of great importance for its medicinal uses. Several compounds have been isolated from various plant parts, and among all the pharmacological activities we can highlight the antitumor activity. This work determined initially, the cytotoxic activity of compound 4-(4'-O-acetyl- α -L-ramnopyranosiloxi) benzyl isothiocyanate (MFLC-1) against the leukemic HL-60 cell line and against peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after 24h incubation. The compound was shown to be active against both cell types, HL-60 and PBMC, with a slight selectivity for tumor cells. To better understand the cytotoxic mechanism of action of MFLC-1, HL-60 cells were used, after twenty-four hours incubation with and without pre-incubation with α -tocopherol (40 μ M), by the following tests: 1 - Measurement of oxidative stress by TBARS; 2 - Staining with May-Grunwald-Giemsa; 3 - Evaluation of membrane integrity, cell viability and cell concentration; 4 - Determination of nuclear DNA content, 5 - Determination of phosphatidylserine externalization; 6 - Determination of caspases (3, 7, 8 and 9) activation. The compound induced oxidative stress, decreased the number of cells and cell viability and induced the activation of initiator (8 and 9) and effector (3 and 7) caspases. In the analysis of cells stained with May-Grunwald-Giemsa, we observed morphological features suggestive of cell death by apoptosis followed by secondary necrosis at the highest concentration (1.4 μ g / mL). When cells are pre-incubated with α -tocopherol (40 μ M), both morphological as biochemical characteristics are suppressed, indicating an important role of oxidative stress in the induction of cell death by the compound MFLC-1. The genotoxicity of MFLC-1 was determined in HL-60 cells and PBMC after 24 h of incubation, where we observed the formation of cross-links in DNA, which was reversed by exposure of cells to proteinase K. Therefore, it's noticed an increase rate of DNA damage with higher concentrations, indicating the formation of a DNA-protein cross-link type. We also observed that the compound is more genotoxic to tumor cells than to normal cells. The antitumor effect (*in vivo*) of MFLC-1 was examined in mice transplanted with Sarcoma 180 tumor and treated at doses of 25 and 50 mg / kg / day intraperitoneally. The tumor growth inhibition was 55.11% and 71.58% respectively at both doses tested. The histopathology of the animals organs showed that MFLC-1 causes mild toxicity, mainly in the liver and spleen, but these can be considered as reversible.

Keywords: *Moringa oleifera*. Benzylisothiocyanate. Lipid peroxidation. Apoptosis. HL-60.

LISTA DE FIGURAS

1	Marcos do Câncer	22
2	Comparação entre os números de mortes mundiais para enfermidades cardiovasculares e câncer no período de 2002-2030 para a população mundial abaixo dos 70 anos.	23
3	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira	24
4	Complementaridade da Química e Biologia. Química Medicinal é uma arte que combina a Química e a Biologia no descobrimento de novas drogas	25
5	<i>Taxus brevifolia</i> (a); estruturas químicas do paclitaxel (b) e docetaxel (c).....	31
6	<i>Catharanthus roseus</i> (a); estruturas químicas da Vimblastina (b), Vincristina (c), Vindesina (d) e Vinorelbina (e).....	33
7	<i>Camptotheca acuminata</i> (a); estruturas químicas da Camptotecina (b), Topotecan (c) e Irinotecan (d).....	35
8	<i>Podophyllum peltatum</i> (a); estruturas químicas da Podofilotoxina (b), Etoposídeo (c) e Tenoposídeo (d).....	37
9	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	39
10	Estruturas de compostos fitoquímicos isolados a partir de <i>M. oleifera</i>	41
11	Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Histopaque TM -1077.....	47
12	Estrutura Química do composto 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1).....	50
13	Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa.....	61
14	Efeito do composto MFLC-1 sobre a peroxidação lipídica em células leucêmicas HL-60, analisado pelo método colorimétrico do TBARS, após 24 horas de incubação.....	68
15	Análise morfológica de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24 horas de incubação, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica.....	70
16	Análise morfológica de células da linhagem HL-60 (leucemia), coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica, após pré-tratamento com α -	

	tocoferol (40 μ M) e pós-tratamento com o composto MFLC-1 por 24 horas de incubação.....	72
17	Efeito do composto MFLC-1 sobre a densidade de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação, na ausência (A) na presença de α -tocoferol 40 μ M (B).....	73
18	Efeito do composto MFLC-1 sobre a integridade de membrana de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação, na ausência (A) na presença de α -tocoferol 40 μ M (B).....	75
19	Efeito do composto MFLC-1 sobre a fragmentação de DNA e a distribuição do ciclo celular em células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação na ausência (A e C) e na presença de α -tocoferol 40 μ M (B e D), respectivamente.....	77
20	Efeito do composto MFLC-1 sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.....	79
21	Efeito do composto MFLC-1 sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas de HL-60 pré-tratadas com α -tocoferol (40 μ M), determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.....	80
22	Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação de caspase iniciadora 8 em células leucêmicas de HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.....	82
23	Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 (A) e 9 (B) em células leucêmicas de HL-60 pré-tratadas com α -tocoferol (40 μ M) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação. O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas e com α -tocoferol (40 μ M).....	83
24	Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação de caspases efetoras 3 e 7 em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação na ausência (A) e na presença de α -tocoferol 40 μ M (B), respectivamente.....	85

25	Efeito do composto MFLC-1 sobre a indução de dano no DNA em células leucêmicas de HL-60 (A) e CMSP (B) determinadas pelo ensaio do cometa, após 24 horas de incubação.....	86
26	Efeito do composto MFLC-1 sobre a indução de dano no DNA em células leucêmicas de HL-60 (A) e em CMSP (B) tratadas com proteinase K (1mg/mL) determinadas pelo ensaio do cometa, após 24 horas de incubação.....	87
27	Efeito da MFLC-1 nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (<i>Mus musculos</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.....	88
28	Fotomicrografia do tumor de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.	89
29	Fotomicrografia do fígado de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.	92
30	Fotomicrografia do rim de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.	93
31	Fotomicrografia do baço de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento.	94
32	Resumo esquemático dos efeitos celulares do composto MFLC-1.....	110
33	Efeito da MFLC-1 na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de incubação.....	131
34	Inibição da síntese de DNA pela MFLC-1, expresso em número de células, avaliada através da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação.	132
35	Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica..	133
36	Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência.....	134
37	Atividade da MFLC-1 nas concentrações de 0,35; 0,7 e 1,4 µg/mL, expresso em percentual (%), sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após de 24 h de incubação.....	135

LISTA DE TABELAS

1	Diferentes estágios de desenvolvimento de drogas baseadas em produtos naturais.....	27
2	Categorias terapêuticas de derivados de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento.....	28
3	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.....	46
4	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do composto MFLC-1 frente às linhagens tumorais humanas de HL-60 e CMSP na presença ou ausência de α -tocoferol (40 μ M)) pelo ensaio do MTT após 24 horas de exposição.....	67
5	Efeito da MFLC-1 nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia i.p., sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento.....	91
6	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da MFLC-1 isolado da flor de <i>Moringa oleifera</i> frente às linhagens tumorais humanas de leucemias (HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-435), carcinoma de cólon (HCT-8) e glioblastoma (SF-295); e células normais de linfócitos periféricos humanos (PBMC) – tempo de incubação de 72h.....	129

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
&	E
µl	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celcius
<	Menor que
®	Marca Registrada
a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de Variância)
BE/LA	Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
BrdU	Bromodeoxiuridina
CCD	Cromatografia em camada delgada
Céls.	Células
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fig.	Figura

g	Gramma
h	Hora
HTS	High Throughput Screening
IC	Intervalo de confiança
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Litro
m	Metro
m²	Metro quadrado
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
n^o	Número
nm	Nanômetro
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
pH	Potencial Hidrogênionico
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium

SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Tris Buffer Solution (Tampão Tris)
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
X	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Câncer.....	21
1.2	Produtos Naturais.....	25
1.2.1	Produtos Naturais anti-câncer originados de plantas.....	29
1.3	Planta estudada: <i>Moringa oleifera</i> Lamark.....	38
1.3.1	Propriedades farmacológicas da planta <i>Moringa oleifera</i>	40
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	Geral.....	43
2.2	Específicos.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Materiais.....	46
3.2	Modelos Biológicos.....	46
3.2.1	Linhagens celulares.....	46
3.2.1.1	Obtenção e cultivo das células tumorais.....	46
3.2.1.2	Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico.....	47
3.2.2	Animais.....	48
3.2.2.1	Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos.....	48
3.3	Procedimentos experimentais.....	49
3.3.1	Material vegetal, extração e isolamento da MLFC-1.....	49
3.3.2	Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas e CMSP - Teste do MTT.....	50
3.3.3	Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS)	52
3.3.4	Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-	

	Giemsa.....	53
3.3.5	Testes utilizando citometria de fluxo.....	54
3.3.5.1	Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular e concentração de células.....	54
3.3.5.2	Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.....	55
3.3.5.3	Determinação da externalização da fosfatidilserina em células HL-60....	56
3.3.5.4	Determinação da ativação de caspases iniciadoras (-8 e -9) e efetoras (-3 e -7) em células HL-60.....	57
3.3.6	Avaliação do potencial genotóxico em células tumorais humanas de HL-60 e Células mononucleadas de sangue periférico.....	58
3.3.6.1	Ensaio do Cometa.....	58
3.3.7	Avaliação da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	62
3.3.8	Observações Histopatológicas da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	63
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Estudo da Atividade Citotóxica.....	66
4.2	Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS).....	67
4.3	Coloração diferencial por May-Grunwald-Giemsa.....	68
4.4	Análises celulares utilizando citometria de fluxo.....	72
4.4.1	Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo.....	73
4.4.2	Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA por citometria de fluxo.....	75
4.4.3	Determinação da Externalização da fosfatidilserina.....	78
4.4.4	Efeitos da MFLC-1 sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9 em células HL-60.....	81
4.4.5	Efeitos da MFLC-1 sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em	

	células HL-60.....	84
4.5	Avaliação do potencial genotóxico em células tumorais humanas de HL-60 e Células mononucleadas de sangue periférico (CMSP).....	86
4.6	Avaliação da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180.....	87
4.7	Análise histopatológica dos órgãos.....	90
5	DISCUSSÃO.....	96
6	CONCLUSÃO.....	112
	REFERÊNCIAS.....	113
	Anexo A – Resultados prévios do composto MFLC-1.....	129
	Anexo B - Atividade Citotóxica e Hemolítica.....	129
	Anexo C - Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán.....	131
	Anexo D - Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU.....	132
	Anexo E - Análise morfológica.....	133
	Anexo F - Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina.....	134
	Anexo G - Avaliação de células viáveis por exclusão de Azul de Tripán.....	135
	Anexo H - Equipamentos e Soluções, Reagente e Fármacos.....	136
	Anexo I – Equipamentos.....	136
	Anexo J - Soluções, Reagente e Fármacos.....	136

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O Câncer tem afligido os seres humanos ao longo de sua história e, por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, é uma das doenças que mais causam temor na sociedade. Não é surpresa que desde os primórdios os médicos têm escrito sobre o câncer. Alguns dos primeiros registros de câncer foram encontrados em tumores ósseos fossilizados, em múmias do Egito Antigo e manuscritos antigos. A descrição mais antiga sobre o Câncer (embora esse termo não tenha sido utilizado) data de aproximadamente 1600 a.C no Egito e foi encontrada no papiro de Edwin Smith que descreve oito casos de úlceras e tumores de mama tratados com cauterização utilizando uma ferramenta chamada de “broca de fogo” (PAPAC, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

O Câncer é considerado um conjunto de doenças complexas caracterizadas pela instabilidade genética e capacidade de se replicar descontroladamente. Existem mais de cem tipos de câncer e subtipos de tumores que podem ser encontrados em órgãos específicos. Entre as alterações (mutações) presentes em tumores malignos podemos destacar: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, invasão de tecidos e metástase. Além disso, os tumores evoluíram de forma a garantir apoio nas células do estroma, a atrair novos vasos sanguíneos, e, finalmente, adquiriram estratégias para escapar da detecção imunológica (HANAHAN; WEINGER, 2000; HAHN; WEINBERG, 2002; KNOWLES; SELBY, 2005; BALDUCCI, 2007; KROEMER; POUYSSEGUR, 2008; LUO *et al.*, 2009). Luo *et al.* (2009) adicionam outras características fenotípicas para as células cancerígenas, que são: estresse metabólico, - proteotóxico, - mitótico, - oxidativo e - de dano ao DNA (**Figura 1**).

Muitas dessas características fenotípicas foram adquiridas por meio de alterações genéticas que envolveram mutações com ganho de função e/ou ampliação de oncogenes juntamente com a perda de função e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor (HAHN; WEINBERG, 2002; LUO *et al.*, 2009).

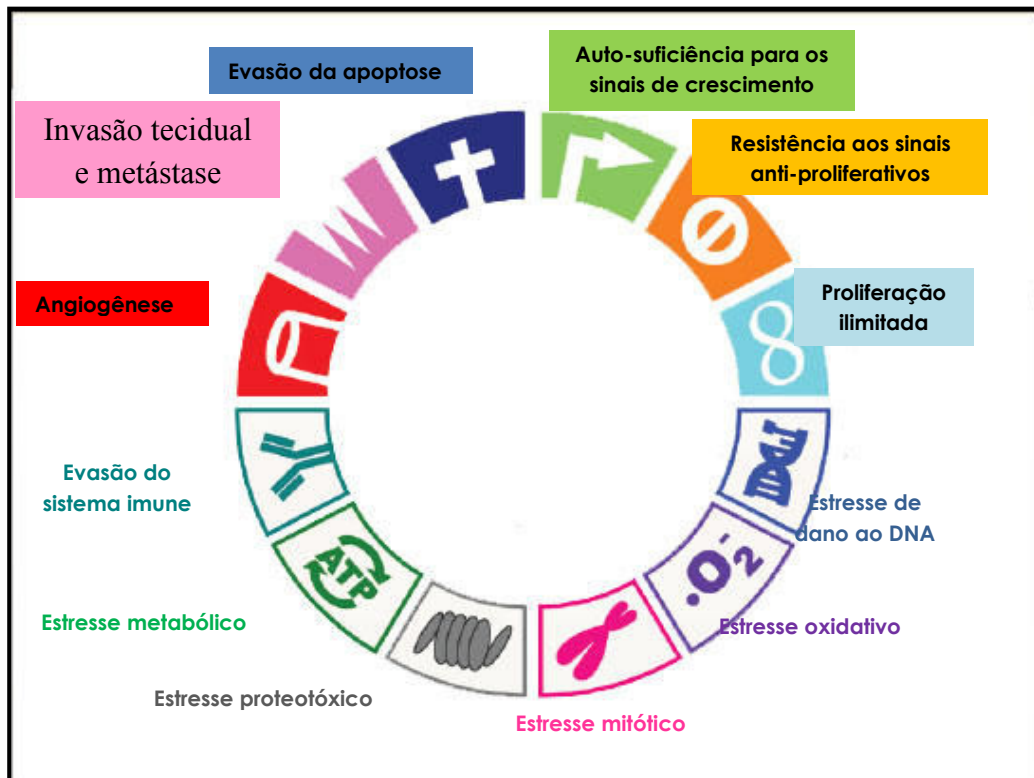


Figura 1: Marcos do Câncer

Fonte: Adaptado de Luo *et al.*, 2009.

Essas mutações são resultados, frequentemente, de erros ocorridos durante a replicação do DNA e podem ocorrer, também, por exposição a misturas químicas complexas encontradas no ambiente ou no nosso estilo de vida e nas dietas. Esse último processo é denominado de “carcinogênese química” e é dividida conceitualmente em quatro etapas: iniciação, promoção, conversão para a malignidade e progressão tumoral. As mudanças genéticas resultante da interação química-DNA é definida como iniciação. Com o passar do tempo, ocorrem mudanças genéticas adicionais, oncogenes tornam-se ativos e genes supressores de tumor juntamente com genes de reparo do DNA tornam-se inativos, levando a uma instabilidade genômica. Com a continuidade do processo, o cenário direciona-se para as transformações malignas (expressão de fenótipos malignos), progressão tumoral e metástase (WEINBERG, 2008; KUMMAR *et al.*, 2004; RIEGER, 2004; BERTRAM, 2001).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções; assim, por exemplo, a invasão neoplásica

dos pulmões gera alterações respiratórias; com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, leva à morte do paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/Organização Mundial da Saúde (OMS), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 8 milhões de óbitos. Para o ano de 2015 espera-se que ocorram cerca de 60,8 milhões de óbitos em todo o mundo, destes, 9,2 milhões (15,13%) serão de câncer; já para o ano de 2030, se espera que 11 milhões (17,5%) das causas de mortes mundiais sejam de câncer (FLEMING, 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008; BOYLE; LEVIN, 2008; INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2010).

A **Figura 2** faz uma comparação entre os números de mortes mundiais para enfermidades cardiovasculares e câncer no período de 2002-2030 para a população mundial **abaixo dos 70 anos**.

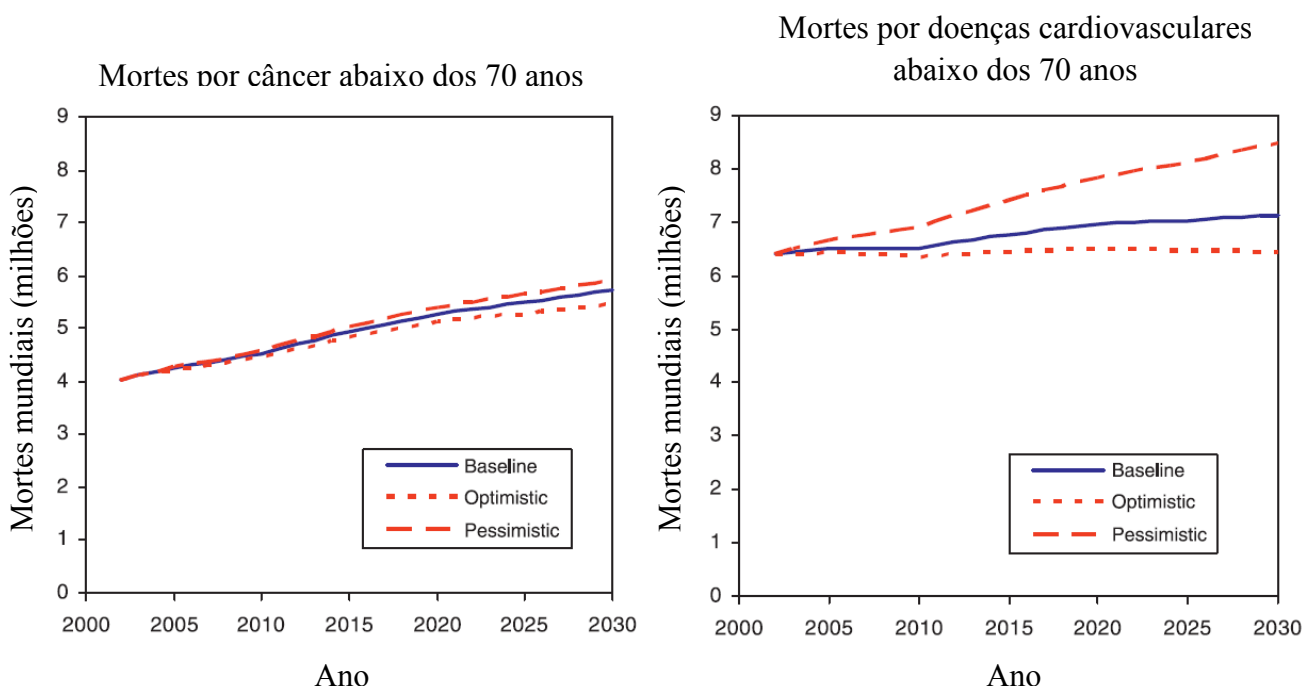


Figura 2: Comparação entre os números de mortes mundiais para enfermidades cardiovasculares e câncer no período de 2002-2030 para a população mundial **abaixo dos 70 anos**.

Fonte: Adaptado de Mathers e Loncar, 2006.

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2009) (**Figura 3**).

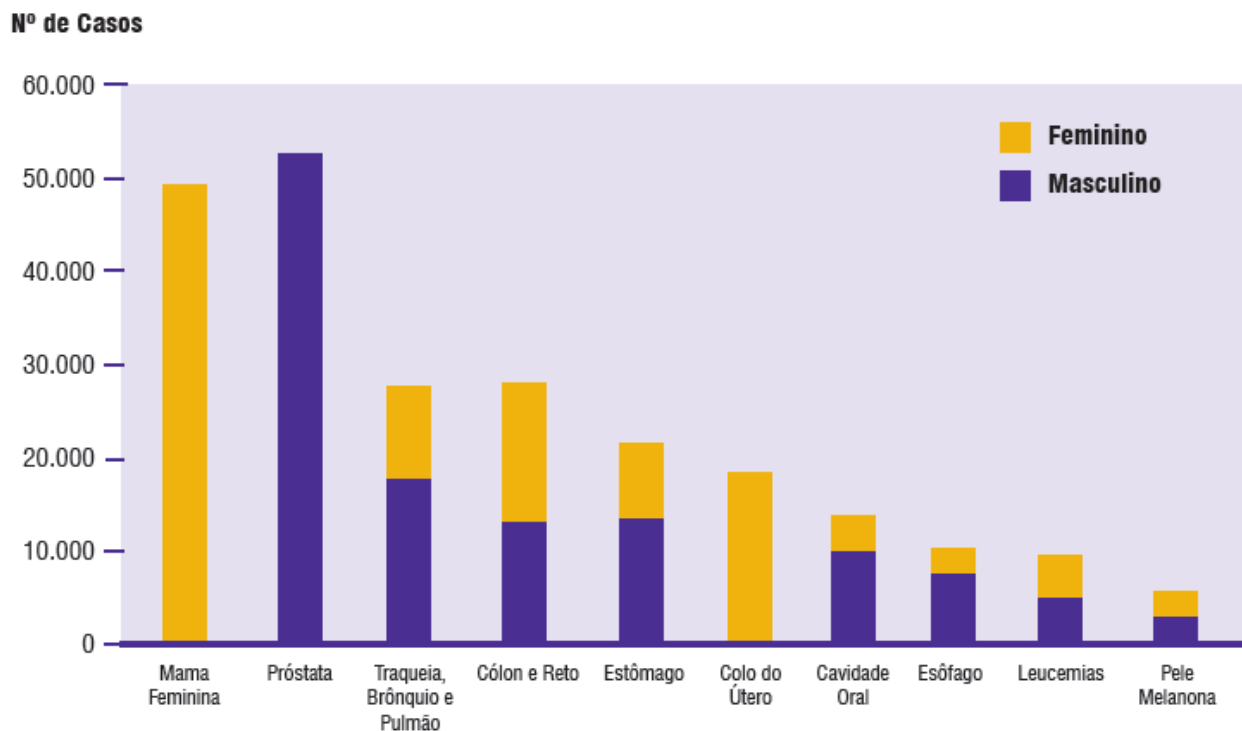


Figura 3: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira

Fonte: INCA, 2009.

Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na

vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do SUS (INCA, 2009).

1.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS Jr., 2006).

No século passado diversas classes de produtos naturais foram isoladas e caracterizadas. Estas descobertas, juntamente com a elucidação de mecanismos biológicos e bioquímicos de ação terapêutica, têm sido fundamentais para o trabalho da química orgânica e medicinal, sendo, portanto áreas complementares e co-dependentes, similar ao conceito chinês de Yin & Yang: um não está presente ou suficiente sem o outro (**Figura 4**) (LEE, 2010). Por exemplo, entre 1981 e 2002, 5% das 1.031 novas entidades químicas aprovadas pelo FDA (*“Food and Drug Administration”*) eram produtos naturais, e outros 23% eram moléculas derivadas de produtos naturais (CLARDY; WALSH, 2004).

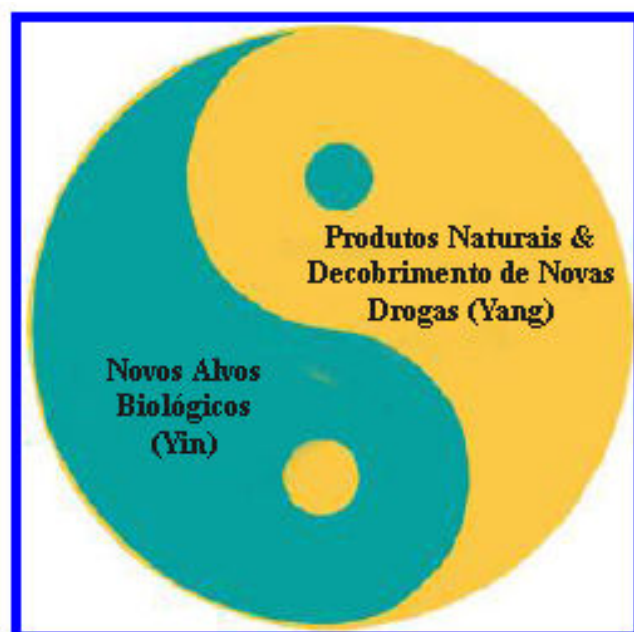


Figura 4: Complementaridade da Química e Biologia. Química Medicinal é uma arte que combina a Química e a Biologia no descobrimento de novas droga

Fonte: Adaptado de Lee, 2010.

Os produtos naturais são metabólitos secundários, produzido por plantas, bactérias, protozoários e animais em resposta a estímulos externos como: mudança nutricional, infecção, competição e predação. Muitos desses metabólitos já foram isolados e os compostos ativos biologicamente possuem grande potencial terapêutico (CHIN *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2006). Mais de 100 (cem) compostos derivados de produtos naturais estão atualmente em estudos clínicos e, pelo menos, 100 projetos semelhantes estão em estudos pré-clínicos (**tabela 1**). Os trabalhos relacionados com produtos naturais estão concentrados, predominantemente, nas áreas de anti-infecciosos e antitumorais; porém outras áreas terapêuticas também são exploradas (**tabela 2**) (HARVEY, 2008).

Os produtos naturais têm demonstrado ser uma fonte garantida e eficiente de novos agentes anti-neoplásicos. Assim, Newman e Cragg (2007) mostraram que 63% dos anti-neoplásicos introduzidas nos últimos 25 anos são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Uma análise feita por Butler (2008) lista que 79 agentes anti-câncer derivados de produtos naturais ou análogos de produtos naturais entraram em ensaio clínico nos anos de 2005-2007. Os produtos naturais não fornecem apenas novas drogas eficazes, mas também trazem um entendimento sobre novos mecanismos de ação no tratamento do câncer (KINGSTON, 2009).

Tabela 1: Diferentes estágios de desenvolvimento de drogas baseadas em produtos naturais.

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO	PLANTAS	BACTÉRIAS	FUNGOS	ANIMAIS	SEMI-SINTÉTICOS	TOTAL^a
Pré-clínico	46	12	7	7	27	99
Fase I	14	5	0	3	11	30
Fase II	41	4	0	10	12	66
Fase III	5	4	0	4	13	26
Pré-Registrado	2	0	0	0	2	4
Total	108	25	7	24	61	225

Fonte: Harvey, 2008.

^a Isto não inclui a reformulação dos produtos existentes (66 desses produtos foram incluídos na lista).

Tabela 2: Categorias terapêuticas de derivados de produtos naturais em diferentes estágios de desenvolvimento.

ÁREA TERAPÊUTICA	PRÉ-CLÍNICO	FASE I	FASE II	FASE III	PRÉ-REGISTRADOS	TOTAL^a
Câncer	34	15	26	9	2	86
Anti-infecciosos	25	4	7	2	2	40
Neuro-farmacológicos	6	3	9	4	0	22
Cardiovascular/intestinal	9	0	5	6	0	20
Inflamação	6	2	9	1	0	18
Metabólitos	7	3	6	1	0	17
Dermatológicos	7	1	2	0	0	10
Hormônios	3	0	2	1	0	6
Imunossupressores	2	2	0	2		6
Total	99	30	66	26	4	225

Fonte: Harvey, 2008.

1.2.1 Produtos Naturais Anti-Câncer Originados de Plantas

A procura por produtos naturais com propriedades anti-câncer remonta, pelo menos, ao papiro de Ebers em 1550 a.C. Porém, o período em que se intensificaram os estudos nessa área é muito mais recente, a começar por Hartwell e colaboradores por volta dos anos 1960s (SRIVASTAVA, 2005).

Um programa de triagem para agentes antitumorais a partir de plantas foi iniciado em 1960 sob a supervisão de Dr. Jonathan L. Hartwell do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em parceria com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Nesse programa, mais de 600 espécies de plantas foram coletadas nos estados de Califórnia, Washington e Oregon, incluindo casca, galhos, folhas e frutos de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (**figura 5a**) (Taxaceae) no estado Washington (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL; WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Atualmente, mais de 60% dos agentes anti-câncer usados na clínica são derivados de fontes naturais como: plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005). Entre os compostos derivados de plantas mais relevantes que têm sido úteis no tratamento do câncer temos: paclitaxel (TAXOL[®]) e docetaxel; alcalóides da vinca, a vimblastina e vincristina; os derivados da camptotecina, topotecan e irinotecan, e os derivados da podofilotoxina, etoposídeo e tenoposídeo (CRAGG; NEWMAN, 2005).

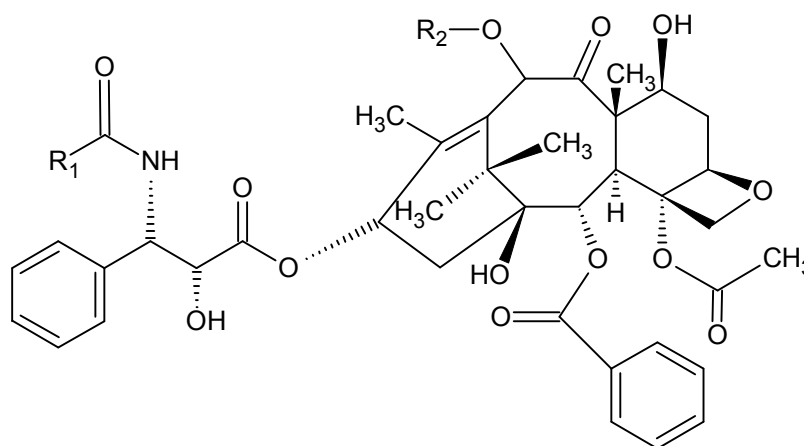
O paclitaxel é um diterpenóide polioxigenado (**figura 5b**) da família dos taxanos, encontrado inicialmente na casca da planta nativa do Pacífico *Taxus brevifolia* Nutt. Foi isolado em Junho de 1966 e apresentou atividade antitumoral contra tumor de Walker e atividade citotóxica contra as linhagens de leucemia L1210 e L1534 (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL; WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; REDDY *et al.* 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).


Desde, então, mais de 300 taxóides já foram isolados e caracterizados em plantas do gênero *Taxus*. O Taxol[®] foi uma droga desenvolvida pelo NCI e em 1992 a indústria farmacêutica Bristol-Myers Squibb[®] recebeu, através do FDA (U.S. Food and Drug Administration), a aprovação para comercializá-lo para o tratamento de Câncer de ovário, metástase em mama, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi em uma dose de 135mg/m². A grande desvantagem do taxol é a sua baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade em água.

Docetaxel (Taxotere[®]) (**figura 5c**) é um derivado semi-sintético do taxol com uma atividade anticâncer mais potente e com melhor solubilidade em água; o uso dessa droga está associado com vários efeitos colaterais como: supressão de medula óssea, reações de hipersensibilidade, vômitos, alopecia, etc (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O paclitaxel atua como um agente estabilizante de microtúbulos; enquanto que outras drogas anti-câncer atuam desestabilizando estas proteínas. Normalmente, o monômero tubulina é polimerizado à microtubulina que por sua vez é despolimerizada à tubulina, processo este que ocorre em equilíbrio. O paclitaxel liga-se à tubulina não permitindo o processo de despolimerização. Isso faz com que os feixes de microtúbulos sejam anormais e não ocorra formação do fuso mitótico. Células cancerosas, frequentemente, apresentam mau funcionamento do ponto de checagem do fuso e, ao tentar se dividir dentro de uma circunstância instável ou desfavorável, são levadas à morte (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL; WANI, 1996; SANTOS, 1998; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; REDDY *et al.* 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

(a)



Paclitaxel (b) - R₁ =  ; R₂ = COCH₃

Docetaxel (c) - R₁ = OC(CH₃); R₂ = H

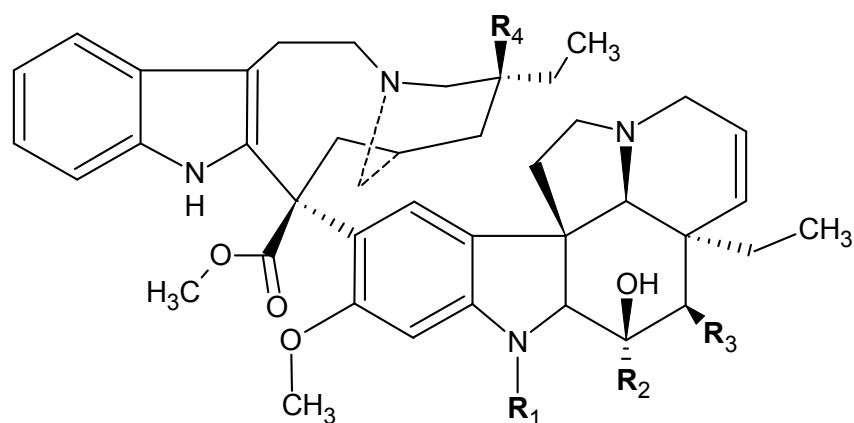
Figura 5: *Taxus brevifolia* (a); estruturas químicas do paclitaxel (b) e docetaxel (c).

Os alcalóides da vinca, Vimblastina e Vincristina (**figura 6b e 6c**), isolados da planta *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae) (**figura 6a**), foram utilizados por muitas culturas para o tratamento de diabetes. Em prospecção da planta como fonte potencial de hipoglicemiantes orais, notou-se que os extratos causavam leucopenia e depressão de medula óssea em ratos; e posteriormente, verificou-se sua atividade contra leucemia linfocítica em camundongos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Apesar de a planta ser originalmente endêmica de Madagascar, as amostras utilizadas na descoberta da Vimblastina e Vincristina foram coletadas na Jamaica e Filipinas. Mais recentemente, alguns análogos dessas substâncias foram semi-sintetizados, Vindesina e Vinorelbina (**figura 6d e 6e**). Esses agentes são usados em combinação com outros quimioterápicos para uma variedade de cânceres, incluindo leucemias, linfomas, câncer avançado de testículo, câncer de mama e pulmão e Sarcoma de Kaposi (FAHY *et al.*, 1997; CRAGG; NEWMAN, 2005; KRZAKOWSKI *et al.*, 2007).

Os alcalóides da vinca ligam-se à tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos e conseqüente formação do fuso mitótico, resultando na parada do ciclo celular durante a mitose (LING *et al.*, 1996; MANN, 2002; DONNICI *et al.*, 2005).

(a)



Vimblastina (b) – $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$; $R_4 = \text{OH}$

Vincristina (c) – $R_1 = \text{COH}$; $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$; $R_4 = \text{OH}$

Vindesina (d) – $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CONH}_3$; $R_3 = \text{OH}$; $R_4 = \text{OH}$

Vinorelbina (e) – $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$; $R_3 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$; $R_4 = \text{H}$

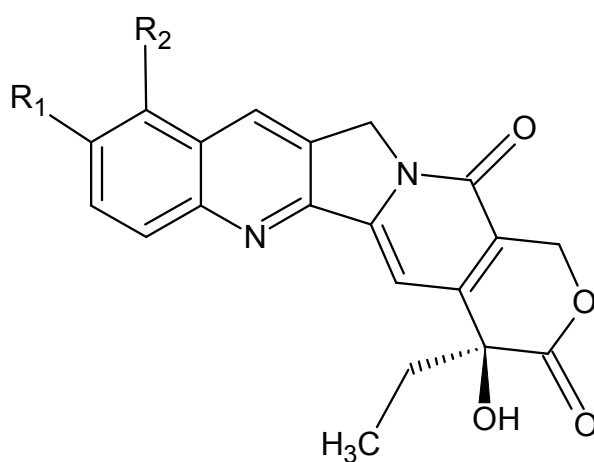
Figura 6: *Catharanthus roseus* (a); estruturas químicas da Vimblastina (b), Vincristina (c), Vindesina (d) e Vinorelbina (e).

No início dos anos 1960s, a descoberta da Camptotecina (**figura 7b**) pelos pesquisadores Wall & Wani como um fármaco antineoplásico e de modo de ação única, inibindo a topoisomerase I, acrescentou uma nova dimensão no campo da quimioterapia (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). A camptotecina é um alcalóide do grupo dos quinolinoalcalóides e foi isolada primeiramente da árvore nativa da China *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae) (**figura 7a**), conhecida também como “árvore da alegria” e “árvore do amor”. Essa substância pode ser encontrada em diferentes partes da planta, como, raízes, galhos e folhas (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL; WANI, 1996; ROCHA *et al.*, 2001; ZHANG, 1998; MANN, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

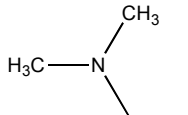
Estudos preliminares “*in vitro*” revelaram atividade antitumoral em células leucêmicas de camundongo o que logo tornou o alcalóide um possível agente antitumoral. A molécula da Camptotecina tornou-se tão importante que, entre os anos de 1966-2004, mais de 3.000 trabalhos científicos sobre ela foram publicados. Atualmente, os primeiros análogos da Camptotecina, Topotecan (Hycantin[®]) (**figura 7c**) e Irinotecan (Camptosar[®]) (**figura 7d**), são comercializados pelas indústrias farmacêuticas Glaxo-SmithKline[®] e Pfizer[®], respectivamente, para o tratamento de câncer de ovário e cólon retal (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O principal alvo da Camptotecina na célula é a enzima topoisomerase I, enzima responsável pelo relaxamento do DNA durante a replicação. A camptotecina liga-se a esse complexo DNA-topoisomerase, deixando-o estável, e impedindo que as duas fitas do DNA se separem e possam então ser replicadas e transcritas (PAZDUR *et al.*, 1993; WALL; WANI, 1996; ROCHA *et al.*, 2001; ZHANG, 1998; MANN, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

(a)



Camptotecina (b) – $R_1 = H$; $R_2 = H$

Topotecan (c) – $R_1 = H$; $R_2 =$ 

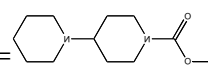
Irinotecan (d) – $R_1 =$ ; $R_2 = CH_2CH$

Figura 7: *Camptotheca acuminata* (a); estruturas químicas da Camptotecina (b), Topotecan (c) e Irinotecan (d).

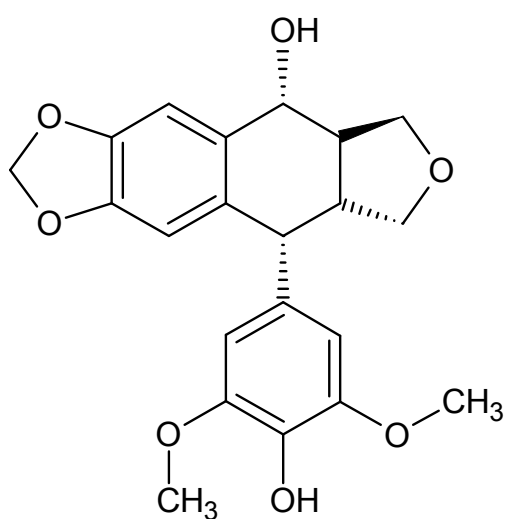
A Podofilotoxina (**figura 8b**) é uma lignina bioativa que foi isolada primeiramente por Podwysstozki em 1880, a partir da planta norte americana *Podophyllum peltatum* Linnaeus (Berberiadaceae) (**figura 8a**) vulgarmente conhecida como “maçã americana”. Posteriormente, ela foi isolada de várias outras espécies como *P. emodi* Wall e *P. pleianthum*. Essas plantas foram muito utilizadas por americanos e asiáticos no tratamento de câncer de pele e verrugas (ROCHA *et al.*, 2001; MANN, 2002; CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Podofilotoxina possui atividade citotóxica em várias linhagens de células cancerígenas e é eficaz no tratamento de vários tumores como: tumores de Wims, vários tumores genitais, tumores de pulmão e linfomas. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da polimerização dos microtúbulos, causando parada do ciclo celular em metáfase, e bloqueio de atividade da topoisomerase II. As tentativas de uso em neoplasias humanas não tiveram êxito devido ao fato da mesma apresentar vários efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, danos aos tecidos normais, etc. (CRAGG; NEWMAN, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Extensas modificações na estrutura foram realizadas para obter agentes antitumorais mais potentes e menos tóxicos, o que resultou em dois compostos semi-sintéticos: etoposídeo (**figura 8c**) e tenoposídeo (**figura 8d**). Esses, por sua vez, são amplamente utilizados no tratamento de linfomas, leucemia aguda, câncer testicular, pulmonar, ovário, bexiga, cérebro, etc. (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

Essas modificações na estrutura da Podofilotoxina mudaram o mecanismo de ação dos dois semi-sintéticos, que passaram a apresentar somente atividade inibitória sobre a topoisomerase II (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

(a)



Podofilotoxina (b)

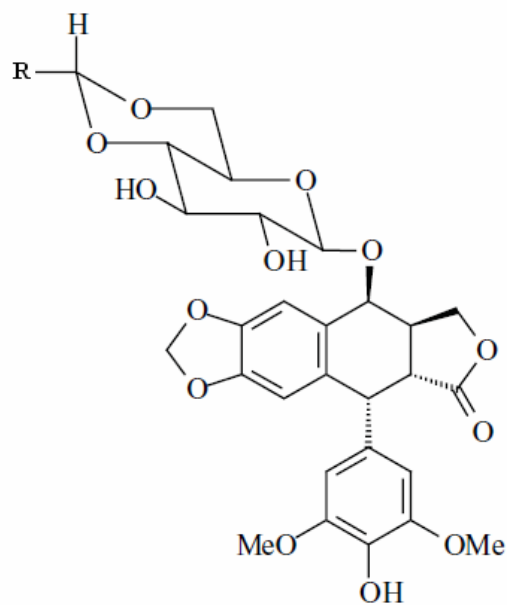

Etoposídeo (c) – R = CH₃Tenoposídeo (d) – R = 

Figura 8: *Podophyllum peltatum* (a); estruturas químicas da Podofilotoxina (b), Etoposídeo (c) e Tenoposídeo (d).

1.3 Planta estudada: *Moringa oleifera* Lamarck

Moringa oleifera Lam. (sinônimo *Moringa pterygosperma* Gaertner) (**figura 9**) é uma árvore nativa do nordeste indiano, presente nas regiões do Himalaya, Índia, Paquistão, Bangladesh e Afeganistão, pertencente à família das Moringaceae, sendo muito utilizada pelos antigos Egípcios, Gregos e Romanos. A árvore popularmente conhecida como “resedá”, “árvore de rábano”, “árvore baqueta”, “lírio-branco”, “Quina de diabo” e muitos outros, cresce rapidamente mesmo em solos pobres, possui sementes com dispersão anemocórica, produz frutos secos em forma triangular, possui folhas caducas bi-tri-composta ou pinada, em esquema triangular de 20-30cm de comprimento. As flores são brancas, perfumadas e são oblíquas monoassimétricas e papilonoídeas (a pétala mediana é adaxial) contendo cinco estames. O fruto mede cerca 15-45cm de comprimento e é chamado de “*drumsticks*” e possui 3 válvulas para liberar as sementes. A casca da semente é marrom semi-permeável e tem três asas brancas que correm para cima e para baixo. Todas as partes da *M. oleifera* são comestíveis, mas as raízes, que são utilizadas como condimento, contém o alcalóide espiroquina, que causa potente paralização nos nervos (FAHEY, 2005; HSU *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008).

M oleifera é hoje largamente cultivada e tornou-se naturalizada em muitas localidades nos trópicos (FAHEY, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008); é uma árvore com madeiras coníferas perenes de baixa qualidade, mas que durante séculos foi defendida para usos industriais e medicinais. Ela já é um importante cultivo na Índia, na Etiópia, nas Filipinas e no Sudão, e está sendo cultivada no Oeste, Leste e Sul da África, Caribe, Flórida e nas ilhas do Pacífico. Entre os muitos usos da *M. oleifera* destacamos: produção de forragem, biogás (a partir de folhas), madeira, tintura azul, fertilizantes, adubos, goma, mel, açúcar e suco; construção de cercas e utilização na purificação de água (FAHEY, 2005).

No Brasil, a *Moringa oleifera* é conhecida no Estado do Maranhão desde 1950. Atualmente, a cultura da moringa vem sendo difundida em todo o semi-árido nordestino, devido a sua utilização no tratamento de água (GALLÃO *et al.*, 2006).



Figura 9: *Moringa oleifera* Lamarck.

Fonte: <http://www.helpfulhealthtips.com/moringa-oleifera-information-uses-and-benefits/>.

1.3.1 Propriedades farmacológicas da planta *Moringa oleifera*

Extratos de todas as partes da *M. oleifera* apresentam propriedades farmacológicas reconhecidas por uso popular e corroboradas pela comunidade científica (ANWAR *et al.*, 2007).

A partir de extrato etanólico de folhas, têm sido obtidos compostos com atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2008), hormônios promotores do crescimento (MAKKAR; BECKER, 1996), compostos com atividade hipocolesterolêmica (GHASI *et al.*, 2000) e atividade contra a infecção com vírus herpes simples tipo 1 (LIPIPUN *et al.*, 2003). Também possuem atividade antioxidante (IQBAL; BHANGER, 2006; LAKO *et al.*, 2007) e são ricas em polifenóis, quercetina, campferol e caroteno (LAKO *et al.*, 2007). Tahiliani e Kar (1999) estudaram que o extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* em baixa concentração pode ser usado para regulação do hipertireoidismo.

Extratos aquosos e etanólicos de raízes de *M. oleifera* são dotados de atividade anti-urolitíaca (KARADI *et al.*, 2006). As vagens possuem atividade anti-hiperlipidêmica (MEHTA *et al.*, 2003) e semelhantes às folhas, possuem atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1998). A casca do tronco apresentou atividade hipoglicêmica (KAR *et al.*, 2003).

Sementes foram examinadas e apresentaram atividade hipotensiva (FAIZI *et al.*, 1998), antimicrobiana (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005), antitumoral (GUEVARA *et al.*, 1999), atividade anti-fúngica “*in vivo*” contra dermatófitos (CHUANG *et al.*, 2007) e antioxidante (SANTOS *et al.*, 2005). Raízes foram capazes de deprimir sistema nervoso central, causar analgesia e potencializar o efeito analgésico da morfina. Segundo descreve Anwar *et al.* (2007) dentre os usos medicinais da flor podemos destacar: estimulante, afrodisíaca, abortiva, antiinflamatória, antitumoral, etc.

Costa-Lotufô *et al.* (2005) descreveram atividade citotóxica contra linhagens tumorais humanas e murinas para o extrato etanólico das raízes de *M. oleifera*. Além disso, segundo descrito por Anwar *et al.* (2007) as folhas são uma fonte potencial para atividade antitumoral. Destas foram isolados os seguintes compostos: O-etil-4-(α -L-ramnosiloxi)benzil carbamato (**figura 10a**), 4(α -L-ramnosiloxi)benzil isotiocianato (**figura 10b**), niazimicina (**figura 10c**) e 3-O-(6'-O - oleoil- β -D-glucopranosl)- β -sitosterol (**figura 10d**), e testadas as suas potencialidades para inibir o desenvolvimento tumoral. A partir dos resultados, os autores propuseram que a niazimicina é um potente agente quimiopreventivo na carcinogênese química.

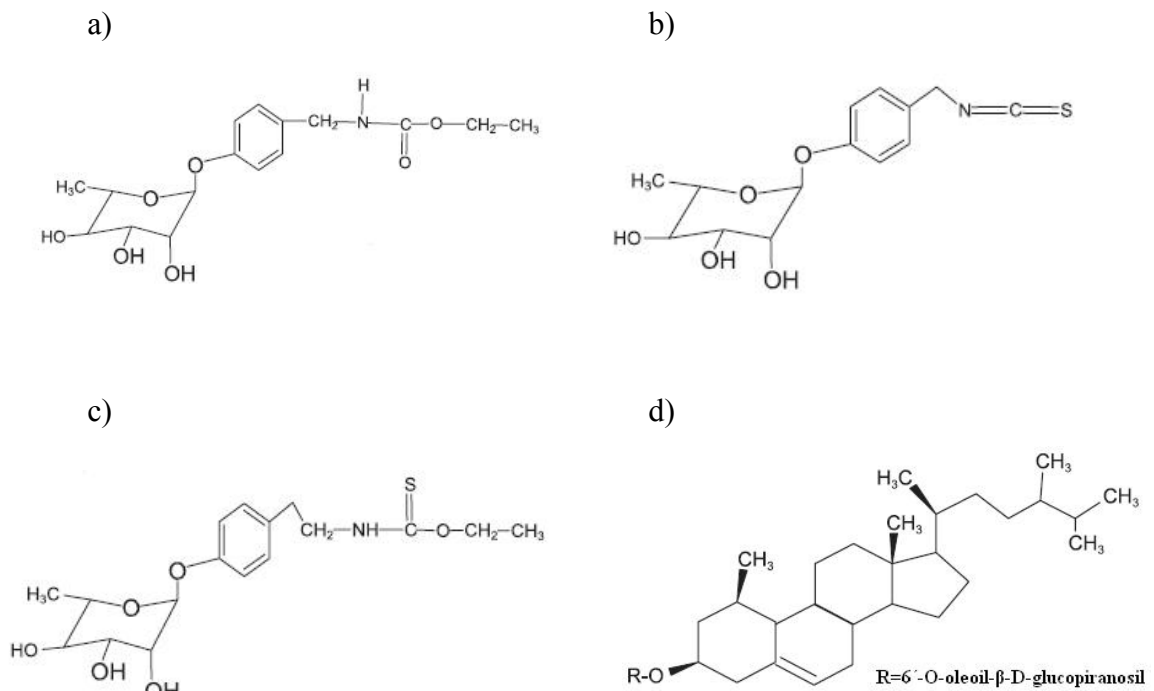


Figura 10: Estruturas de compostos fitoquímicos isolados a partir de *M. oleifera*

Fonte: Anwar *et al.* (2007)

Uma análise dos compostos isolados de *M. oleifera* indica que esta espécie é rica em compostos contendo açúcares, principalmente ramnose, chamados glucosinolatos e isotiocianatos. Em estudo fitoquímico recente realizado na Universidade Federal do Ceará, foi isolado um heterosídeo monoacetilado, o 4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1) (**Figura 12 – Material e Métodos**), descrito em Anwar *et al.* (2007) e com várias semelhanças estruturais com os compostos descritos no mesmo trabalho.

MFLC-1, segundo Anwar *et al.* (2007) inibe significativamente a progressão tumoral causado pelo vírus Epstein-Barr, sugerindo que o grupo isotiocianato é um fator crítico estrutural para a atividade.

Um recente estudo de citotoxicidade desse composto (MFLC-1) foi realizado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental e apresentado em minha monografia de conclusão de curso. Os resultados, presentes no anexo B, mostraram que esse composto possui potente atividade citotóxica. Com valores de IC_{50} menores que $4\mu\text{g/ml}$, o MFLC-1 apresentou elevado efeito antiproliferativo levando as células tratadas à morte celular. Esses resultados ressaltaram o potencial anticâncer desse composto.

Diante disso, este trabalho versa sobre o estudo dos possíveis mecanismos de ação do composto MFLC-1 utilizando ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o potencial anticâncer e seus possíveis mecanismos de ação do composto 4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1) isolado das flores de *Moringa oleifera* L. em modelos experimentais biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica do composto 4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1) em célula tumoral de HL-60 e em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano (ensaio do MTT);

- Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade do composto através de:

- Técnica de análise morfológica utilizando a linhagem de leucemia HL-60;
- Mensuração do estresse oxidativo através ensaio do TBARS utilizando a linhagem de leucemia HL-60;
- Técnicas de citometria de fluxo utilizando como modelos experimentais a linhagens de leucemia HL-60.

- Avaliar o potencial genotóxico do composto através do ensaio do cometa utilizando como modelos experimentais as linhagens de leucemia HL-60 e células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano;

- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do composto em camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com o tumor Sarcoma 180;

- Analisar as características histopatológicas dos órgãos (rim, fígado e baço) de

camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantedos com o tumor Sarcoma 180, tratados por 7 dias com o composto.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A especificação dos equipamentos e das soluções utilizadas neste trabalho estão detalhadas no **Anexo H** – Equipamentos e Soluções, Reagente e Fármacos.

3.2 Modelos biológicos

3.2.1 Linhagens celulares

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na **tabela 3**.

Tabela 3:- Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
CMSP	Linfócitos e Monócitos	Humana

3.2.1.1 Obtenção e cultivo das células tumorais

A linhagem tumoral foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm², volume de 250 mL) em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas.

3.2.1.2 Obtenção e cultivo das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta de sangue foi realizada em frascos heparinizados (*vacuntainer*) por profissionais capacitados da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará.

As células foram isoladas através de um gradiente de densidade por meio da utilização do HistopaqueTM-1077. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de HistopaqueTM-1077 e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do HistopaqueTM-1077, em três camadas visíveis (**figura 11**). Uma superior (soro), uma intermediária (células e HistopaqueTM-1077) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária foi cuidadosamente removida e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em 2mL de PBS. As células foram utilizadas imediatamente após o processo de isolamento, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e fitohemaglutinina (2 a 4%).

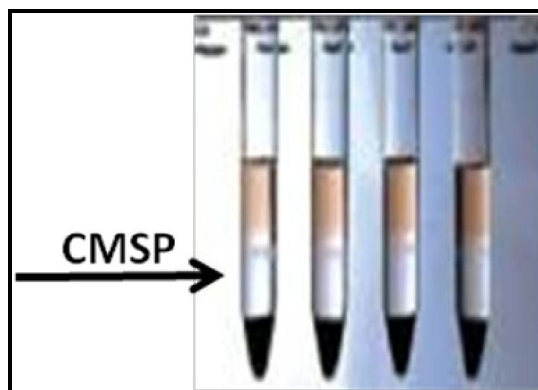


Figura 11: Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo HistopaqueTM-1077.

3.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* albino (*Mus musculus*) oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Estes foram alojados dentro de gaiolas de polipropileno e grades metálicas apropriadas em pequenos grupos do mesmo sexo (não excedendo 10 animais por gaiola). A temperatura do local foi de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A iluminação foi artificial, com uma alternância de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os animais tiveram livre acesso à alimentação (ração específica) e água.

Foram utilizados animais machos adultos, jovens, saudáveis e que não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais. O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. No início do estudo, a variação de massa dos animais foi à mínima possível, não excedendo $\pm 20\%$ da massa média de cada grupo.

Os animais foram identificados de forma inequívoca, e foram aclimatados às condições do biotério durante pelo menos cinco dias. A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará.

3.2.2.1 Manutenção do tumor sarcoma 180 em camundongos

O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal. O procedimento é realizado a cada 10 dias.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Material vegetal, extração e isolamento da MFLC-1

O procedimento de isolamento da substância MFLC-1 foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob supervisão do Prof. Dr. Geraldo Barbosa.

115,5 g de flores frescas de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, foram coletados no município de Itapipoca – Ceará no dia 20/08/2007 e submetidos a duas extrações a frio, em intervalos de 24 h, com 250 mL de clorofórmio e em seguida com etanol. Após filtração, evaporação dos solventes sob pressão reduzida em rotaevaporador e eliminação dos solventes residuais em banho-maria foram obtidos 792 mg de um extrato clorofórmico, na forma de um sólido amarelado, denominado MFL-C e 770 mg de um extrato etanólico, na forma de um material pastoso escuro, denominado MFL-E.

730 mg do extrato MFL-C, depois de adsorvidos em 500 mg de gel de sílica para cromatografia “flash” (0,040-0,063 mm; 230-400 mesh, da MERCK), foram cromatografados sob pressão sobre 15 g da mesma sílica em coluna \square 1,5 cm. Foram coletadas 35 frações de 5 mL eluídas com hexano/acetato de etila (90:10); 20 frações de 5 mL eluídas com clorofórmio; 29 frações de 5 mL eluídas com acetato de etila e 4 frações de 10 mL eluídas com metanol.

Análise por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) permitiu a reunião das frações semelhantes e a identificação na fração 77 (53 mg) de um sólido esbranquiçado quase homogêneo em CCD.

A fração MFL-C (77), 53 mg, foi adsorvida em 50 mg de gel de sílica e cromatografada sobre 5 g da mesma sílica em coluna aberta \square 1,3 cm. Foram coletadas 33 frações de 5 mL eluídas com diclorometano/acetato de etila (80:20) e 1 fração de 20 mL eluída com acetato de etila.

Análise por CCD permitiu a reunião das frações semelhantes e a identificação na fração 20-33 (18 mg) de um sólido branco, homogêneo em CCD, que passou a ser denominado de MFLC-1 e que foi caracterizado quimicamente por análise dos dados de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) uni e bidimensionais. Após análise dos espectros a substância MFLC-1 foi identificada como **4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1) (figura 12).**

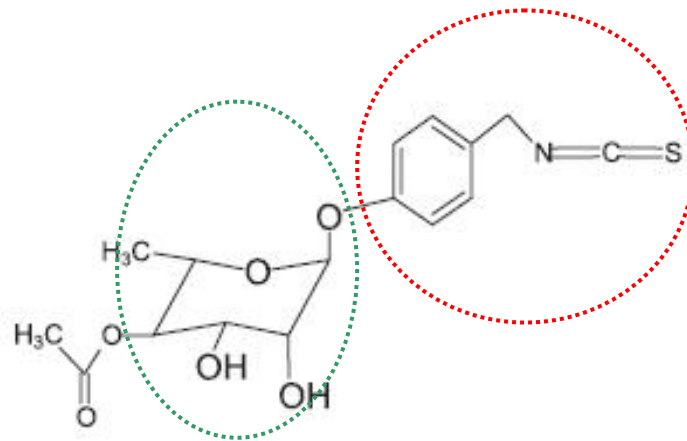


Figura 12: Estrutura Química do composto 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1).

Podemos observar que esta molécula possui uma porção glicosilada, o qual representa resíduos do carboidrato ramnose (**figura 12, destaque em verde**), e um grupo benzil-isotiocianato (**figura 12, destaque em vermelho**).

3.3.2 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas e CMSP - Teste do MTT

Princípio do teste

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos testes em células tumorais humanas e CMSP foi realizada pelo Teste do MTT após 24 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2008) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

Procedimento experimental

O composto foi testado em um nas linhagens celulares descritas na **Tabela 4** para a determinação de suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para células de HL-60, e $0,4 \times 10^6$ células/mL, para CMSP. Para as células tumorais de HL-60, o composto MFLC-1 é adicionado logo após o plaqueamento; já para CMSP o composto é adicionado somente após 24 h de incubação. O composto (0,039 a 5 $\mu\text{g/mL}$) dissolvido em DMSO foi adicionados a cada poço, utilizando o HTS (*high-throughput screening*), e as placas incubadas por 24 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO (0,4%).

Para os testes com MFLC-1 e α -tocoferol, as células tumorais de HL-60 e CMSP foram pré-tratadas com α -tocoferol (40 μM) por 1 hora e somente após esse período o composto teste foi adicionado. O α -tocoferol participa de um sistema de defesa celular contra danos oxidativos, não só eliminando os radicais livres de oxigênio presentes na membrana, mas também interceptando os radicais peroxila que são importantes na propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica. GERMAIN *et al.*, 1998 descreve o α -tocoferol como um inibidor de peroxidação lipídica, e que o pré-tratamento com α -tocoferol aumenta a viabilidade celular em células tumorais tratadas com doxorrubicina.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa foi re-incubada por 3 horas, em estufa a 37 °C e a 5% CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al.*, 1983).

Análise dos dados

O composto foi testado em diluição seriada, em triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração capaz

de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.3.3 Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS)

Princípio do Teste

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) (DRAPER *et al.*, 1990). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA (malonil di-aldeído) em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um pigmento róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste pigmento num comprimento de onda de 535 nm, pH 1,0, é $1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 1mL de Triton X 100. Então, 250 μL do homogenato foi adicionado a tubos de vidro, e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400 μL de ácido perclórico 35% para precipitar proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 min e 600 μL do sobrenadante foi adicionado à 200 μL de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm.

Análise dos Dados

A análise estatística foi feita utilizando o programa Graph Pad prism 5.0 Para comparação entre as médias foi feita uma análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,01$. Os valores foram expressos como Média \pm EPM.

3.3.4 Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

Princípio do Teste

A coloração utilizada nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo do padrão de morte celular (apoptose/necrose).

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. Para os teste com o composto e α -tocoferol, as células tumorais de HL-60 foram pré-tratadas com α -tocoferol (40 μM) por 1 hora e somente após esse período o composto teste (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado e incubado por 24h. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,1%.

Após a incubação, as células foram examinadas ao microscópio de inversão. Para observar a morfologia, 50 μL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração por May-Grunwald, por 10 segundos, seguida pelo Giemsa por mais 10 segundos.

Análise dos Dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

3.3.5 Testes utilizando citometria de fluxo

3.3.5.1 Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular e concentração de células

Princípio do teste

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que, apenas na necrose, a membrana plasmática está precocemente alterada. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP), que é hidrofílico, de penetrar apenas em células cuja membrana esteja rompida. Após a ligação ao DNA, o IP emite alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite, portanto, baixa fluorescência.

Neste experimento, também é possível avaliar aspectos morfológicos como volume e granulosidade, que foram também utilizados como parâmetros na determinação da viabilidade celular (MACKLIS; MADISON, 1990). O teste baseia-se no desvio frontal e lateral da luz incidida sobre as células. O desvio frontal determina o volume celular e o lateral mede a granulosidade.

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. Para os teste com o composto e α -tocoferol, as células tumorais de HL-60 foram pré-tratadas com α -tocoferol (40 μM) por 1 hora e somente após esse período o composto teste (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado e incubado por 24h. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Uma alíquota de 50 μL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de IP (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS). Após 5 minutos na ausência de luz a 37 $^{\circ}\text{C}$, as células (cinco mil eventos) foram analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett ($p < 0,05$).

3.3.5.2 Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula.

Princípio do teste

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do corante IP em ligar-se ao DNA celular e emitir fluorescência vermelha em intensidade proporcional ao seu conteúdo. Assim, as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M) podem ser determinadas a partir do seu conteúdo de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub- G_1), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

Procedimento experimental

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. Para os teste com o composto e α -tocoferol, as células tumorais de HL-60 foram pré-tratadas com α -tocoferol (40 μM) por 1 hora e somente após esse período o composto teste (0,35, 0,7 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado e incubado por 24h. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Uma alíquota de 50 μL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de lise contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodeto de

propídeo em PBS). Após 30 minutos na ausência de luz e a 37 °C, o material (cinco mil eventos) foi analisado por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett ($p < 0,05$).

3.3.5.3 Determinação da externalização da fosfatidilserina em células HL-60

Princípio do teste

Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípido de membrana interna, é externalizado para a superfície da membrana celular, servindo como marcação para que a célula seja fagocitada por macrófagos (VERMES *et al.*, 1995). A anexina V é uma proteína cálcio-dependente que possui uma alta afinidade por PS e, portanto, pode se ligar ao PS externalizado na célula em apoptose (KRYSKO *et al.*, 2008).

A dupla coloração com ficoeritrina (PE) e 7-AAD, corante que penetra nas membranas celulares desintegradas e se liga ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha, permite a distinção das células em estágios mais tardios da apoptose ou em necrose, quando as membranas celulares estão rompidas. A estratégia da coloração dupla permite a identificação de 4 populações distintas: células sem marcação são consideradas normais (ou viáveis); células com coloração verde são tidas como em apoptose inicial; células vermelhas são necróticas; e células reconhecidas pelos dois corantes são entendidas como em apoptose tardia, pois, nos estágios finais, as membranas das células apoptóticas perdem a integridade.

Procedimento experimental

A detecção da externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) (Guava Nexin kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA) e IP (indicador de células necróticas).

As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com o

composto MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL) durante 24 horas.

Um segundo experimento foi conduzido com o propósito de avaliar o efeito do composto em células pré-incubadas com α -tocoferol (40 μ M) durante 1 hora e depois expostas ao composto MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL) durante 24 horas.

Após o período de incubação, uma alíquota de 50 μ L da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, lavadas com PBS e ressuspensas em uma solução contendo anexina V-FITC e IP na ausência de luz e a 37 °C e, após 20 minutos, analisadas por citometria de fluxo. A doxorrubicina (0,3 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett ($p < 0,05$).

3.3.5.4 Determinação da ativação de caspases iniciadoras (-8 e -9) e efetoras (-3 e -7) em células HL-60

Princípio do teste

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas, podendo ser divididas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas, as quais podem ser incluídas nos grupos de caspases iniciadoras (como no caso da apoptose as caspases-8 e -9) e efetoras (como no caso da apoptose as caspases-3 e -7). As caspases iniciadoras possuem a função de, quando ativadas, promover a clivagem das caspases efetoras -3 e -7; e estas, uma vez ativas, possuem um papel central no mecanismo de apoptose. As efetoras são as responsáveis pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a quantificação de caspases ativadas permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002).

Procedimento experimental

A detecção das caspases iniciadoras -8 e -9, e efetoras, -3 e -7 ativadas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit Guava Caspases 3/7 FAM (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA). As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com o composto MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL) durante 24 horas.

Um segundo experimento foi conduzido com o propósito de avaliar o efeito do composto em células pré-incubadas com α -tocoferol (40 μ M) durante 1 hora e depois expostas ao composto MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL) durante 24 horas.

Após os tratamentos, as células foram incubadas por 1 hora na ausência de luz e a 37 °C com FLICATM (fluorocromo inibidor de caspases que se liga covalentemente as caspases-3 e -7 ativadas). Posteriormente, 80 μ L do tampão de lavagem (fabricante) foram adicionados aos tubos e, então, centrifugados (2000 rpm/5 min). Em seguida, as células foram ressuspensas em uma solução composta de IP e tampão de lavagem e analisadas por citometria de fluxo. A doxorubicina (0,3 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

O percentual de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias foi mensurado através da utilização do corante 7-AAD e um inibidor fluorescente de caspases (FLICATM) o qual identifica as caspases ativadas. O reagente FLICA se liga covalentemente às caspases ativadas ficando retidas nas células, enquanto que as moléculas de FLICATM não ligadas são difundidas para fora das células. Células com a coloração negativa para FLICATM e 7-AAD (FLICATM (-) e 7-AAD (-)) são consideradas viáveis, células FLICATM (+) e 7-AAD (-) são apoptóticas iniciais, células FLICATM (+) e 7-AAD (+) são apoptóticas tardias e FLICATM (-) e 7-AAD (+) são células necróticas.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Dunnett ($p < 0,05$).

3.3.6 Avaliação do potencial genotóxico em células tumorais humanas de HL-60 e Células mononucleadas de sangue periférico

3.3.6.1 Ensaio do Cometa

Princípio do teste

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, por Olive (1989), o teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* (SCGE) permite detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Sendo muito utilizado em estudo de genética toxicológica, a fim de um biomonitoramento ambiental ou no monitoramento populacional em humanos. Entretanto, este teste é utilizado como um indicativo e não como um teste mutagênico. Este pode ser utilizado tanto em células de animais quanto vegetais *in vitro* e *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2003).

Procedimento experimental

a) Tratamento

Para avaliar a indução de quebras de fita simples e quebras de fita dupla na molécula de DNA, o ensaio foi realizado em condições alcalinas (KLAUDE *et al.*, 1996; TICE *et al.*, 2000; LIAO *et al.*, 2009). Nesse experimento, as células (HL-60 e CMSP) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com MFLC-1 (0,35, 0,7 e 1,4 µg/mL) durante 24 horas. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,5%.

Para verificar a possibilidade do tratamento com MFLC-1 em induzir a formação de ligações cruzadas (covalentes) entre DNA e proteínas nucleares (cross-links DNA-proteína), as células (HL-60 e CMSP) foram incubadas com proteinase K, que tem a capacidade de quebrar essas ligações cruzadas desfazendo os cross-links DNA-proteína, de acordo como descrito por Wozniak e Blasiak (2002). Resumidamente, as lâminas com as células tratadas com MFLC-1 após serem lisadas foram lavadas em uma solução (10 mM Tris, 1 mM EDTA)

por 3 vezes. Alíquotas (100 μ L) de solução de proteinase K (10 mM Tris, 1 mM EDTA) a 1 mg/mL foram adicionadas sobre as lâminas e incubadas por 2 horas a 37°C em uma câmara úmida. Após esse procedimento, as lâminas foram submetidas à eletroforese.

b) Preparo das laminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação. As células tratadas foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

c) Lise Celular

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroil sarcosina, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 hora.

d) Neutralização e Eletroforese

Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Posterior a esta etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com uma solução alcalina a 4°C (1mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH, pH > 13,0). As lâminas repousaram por 20 minutos para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcali-lábeis em quebra de fitas simples e duplas. A eletroforese (25 V; 300 mA) foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos. Todos esses passos foram realizados na ausência de luz. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

e) Coloração e contagem

Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores

previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 13**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%).

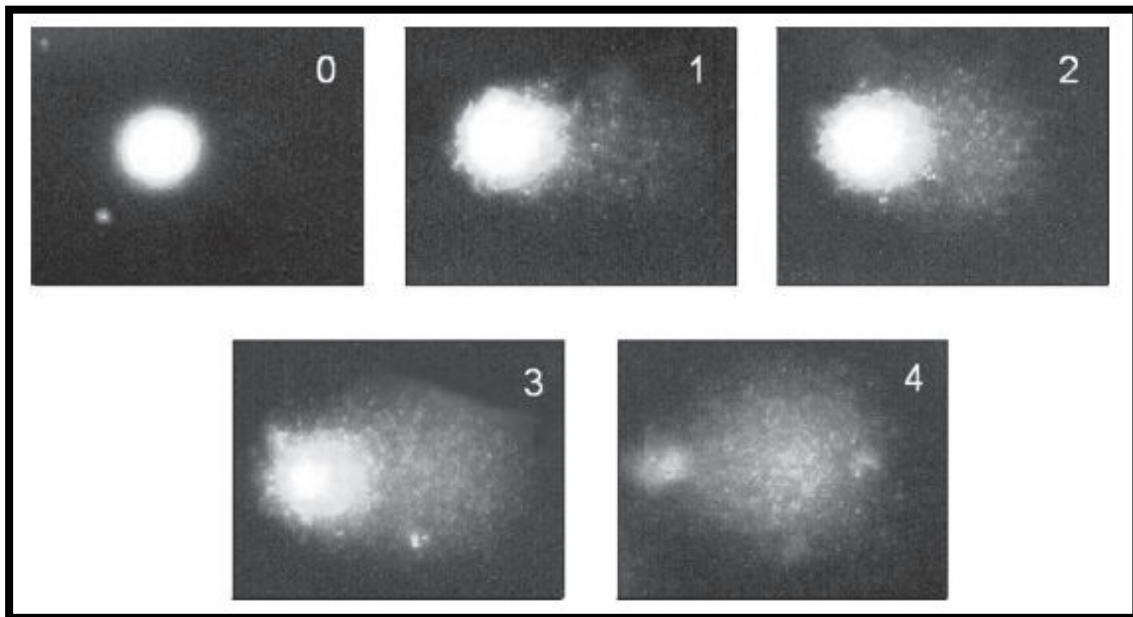


Figura 13: Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa

Fonte: Collins, 2004.

Análise dos dados

Foi calculado o índice (ID) de dano no DNA, o qual foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i ,$$

onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

3.3.7 Avaliação da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180

Princípio do teste

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores e ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os animais não tratados. Schabel et al. (1977) demonstraram que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 h após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral. O tumor utilizado foi o Sarcoma 180, o qual foi descoberto em 1914 no 'Crocker Laboratory (Columbia University, New York)', sendo originalmente um tumor sólido, surgido espontaneamente na região axilar de camundongos. Inicialmente o tumor foi classificado como um carcinoma mamário, mas por volta de 1919, após a realização de vários transplantes subcutâneos, o tumor assumiu a forma de sarcoma, e desde então mantém-se inalterado.

Procedimento Experimental

Para a avaliação do efeito antitumoral da MFLC-1 foram utilizados camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN - UFC). Esses animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 10 para cada grupo) com pesos variando entre 22 e 25 g ($p > 0,05$).

O modelo tumoral - tumor sólido do tipo Sarcoma 180 - foi utilizado com 10 dias de implantação na região axilar direita. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizado assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal e preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos. Após 24 h de inoculação, o tratamento foi iniciado e realizado durante 7 dias consecutivos, utilizando como controle negativo, o veículo de

diluição (DMSO 4 %) e como controle positivo, o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/kg/dia). A MFLC-1 foi testada nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, todas administradas por via intraperitoneal (i.p.).

Todos os grupos foram mantidos sob as mesmas condições e sob regime de ingestão “*ad libitum*” de ração comercial (Purina, São Paulo) e água clorada durante todo o período do experimento.

No final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo seus órgãos (rins, baço, fígado) e tumores dissecados para avaliação do peso relativo e da atividade antitumoral, respectivamente.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos dados

Os resultados (peso relativo dos órgãos e peso dos tumores) foram expressos como média ± E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3.8 Observações histopatológicas da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180

Princípio do teste

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

Procedimento Experimental

Imediatamente após a dissecação, os órgãos e os tumores foram armazenados em formol 10 % para posterior análise macroscópica em relação à cor, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Em seguida, os tecidos foram processados, embebidos em parafina e secções de 3-5 μm de espessura foram preparadas em lâminas. Depois de fixadas em formol 10 %, desparafinizadas em xilol por 15 min e desidratadas em álcool em crescentes concentrações, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com H/E e examinadas em microscópio óptico (x400).

Análise dos Dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

Resultados

Esta dissertação foi desenvolvida com base em resultados prévios presentes em minha monografia de conclusão de curso (Bacharelado – Ciências Biológicas) aprovada em 2008. Esses resultados prévios estão disponíveis no **Anexo A**.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo da Atividade Citotóxica

O estudo da atividade citotóxica do composto MFLC-1 foi realizado em células tumorais humanas de HL-60 (Leucemia Promielocítica). Adicionalmente, a atividade citotóxica foi avaliada em células mononucleadas de sangue periférico humano (CMSP).

Esse estudo foi analisado pelo método calorimétrico do MTT. Após 24 horas de exposição, como apresentado na **tabela 4**, o composto MFLC-1 apresentou elevado potencial citotóxico, com valor de CI_{50} de $1,39\mu\text{g/mL}$ ($1,01 - 1,68\mu\text{g/mL}$) para a linhagem tumoral de HL-60.

Já para CMSP, o valor da CI_{50} é de $3,62\mu\text{g/mL}$ ($2,98 - 3,89\mu\text{g/mL}$). Assim, o composto MFLC-1 apresenta uma ligeira seletividade de cerca de 3 vezes em relação à linhagem de HL-60.

O co-tratamento com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$) diminui os efeitos citotóxicos do MFLC-1 (aumento dos valores de CI_{50}), o que ressalta a importância dos radicais livres para a citotoxicidade do composto.

Tabela 4: Atividade citotóxica *in vitro* do composto MFLC-1 frente às linhagens tumorais humanas de HL-60 e CMSP na presença ou ausência de α -tocoferol (40 μ M) pelo ensaio do MTT após 24 horas de exposição.

Composto	Linhagens Celulares - CI_{50} μ g/mL (95%)*			
	HL-60	HL-60 + α -tocoferol	CMSP	CMSP + α -tocoferol
MFLC-1	1,39 (1,01 – 1,68)	3,98 (2,71 – 5,85)	3,62 (2,98 – 3,89)	> 5
Doxorrubicina	0,07 (0,06 – 0,08)	nd*	0,8 (0,72 – 0,88)	nd*

*Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

*nd – não determinado.

4.2 Determinação da peroxidação lipídica pela medição de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS)

A determinação dos níveis de peroxidação lipídica foi realizada através do método colorimétrico TBARS.

A **figura 13** mostra que a exposição das células de HL-60 à MFLC-1 aumentou significativamente e dose-dependente a peroxidação lipídica pelo aumento de TBARS. A absorbância do TBARS para o controle foi de 0,123 (0,088 - 0,156), para a concentração de 0,35 μ g/mL, 0,10 (0,08 – 0,12), 0,7 μ g/mL, 0,18 (0,16 – 0,21) e para 1,4 μ g/mL 0,43 (0,36 – 0,52). A doxorrubicina (0,3 μ g/mL), que foi utilizada como controle positivo nos experimentos de citotoxicidade, foi utilizada nesse experimento e obteve uma absorbância de TBARS de 0,17 (0,14 – 0,20).

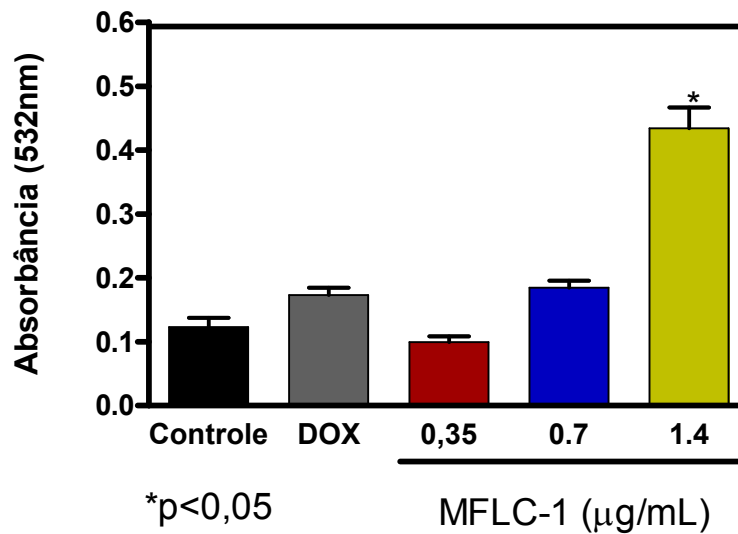


Figura 14: Efeito do composto MFLC-1 sobre a peroxidação lipídica em células leucêmicas HL-60, analisado pelo método colorimétrico do TBARS, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,35µg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.3 Coloração diferencial por May-Grunwald-Giemsa

A análise morfológica das células da linhagem leucêmica promielocítica humana HL-60 tratadas com crescentes concentrações e não tratadas pode ser visualizada na **Figura 15**.

A análise por microscopia de luz óptica das células de HL-60, coradas com May-Grunwald-Giemsa, revelou diversas mudanças morfológicas ocorridas com o tratamento com o composto teste. Após 24 horas de tratamento, o grupo controle (não tratadas) (**figura 15A**) exibiu uma morfologia típica de células viáveis, com membrana íntegra, citoplasma homogêneo, células pleomórficas, presença de figuras mitóticas e nítida visualização tanto da membrana citoplasmática quanto nuclear.

Células de HL-60 tratadas com o composto MFLC-1 nas concentrações de 0,35 e 0,7µg/mL (**figura 15C e D, respectivamente**) apresentaram morfologia consistente com o processo de apoptose, incluindo formações de “blebbings” na membrana plasmática, redução do volume celular e presença de vacúolos citoplasmáticos.

Na maior concentração testada (1,4 μ g/mL) (**figura 15E**), ocorreu diminuição no número de células, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, picnose e o aparecimento de características típicas de necrose, como eosinofilia e perda de integridade de membrana. A doxorubicina (0,3 μ g/mL) (**figura 15B**), utilizada como controle positivo, induziu redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear em células de HL-60, todas as características condizentes com apoptose, além de eosinofilia, perda de integridade de membrana e restos nucleares hipercromáticos consistentes com necrose.

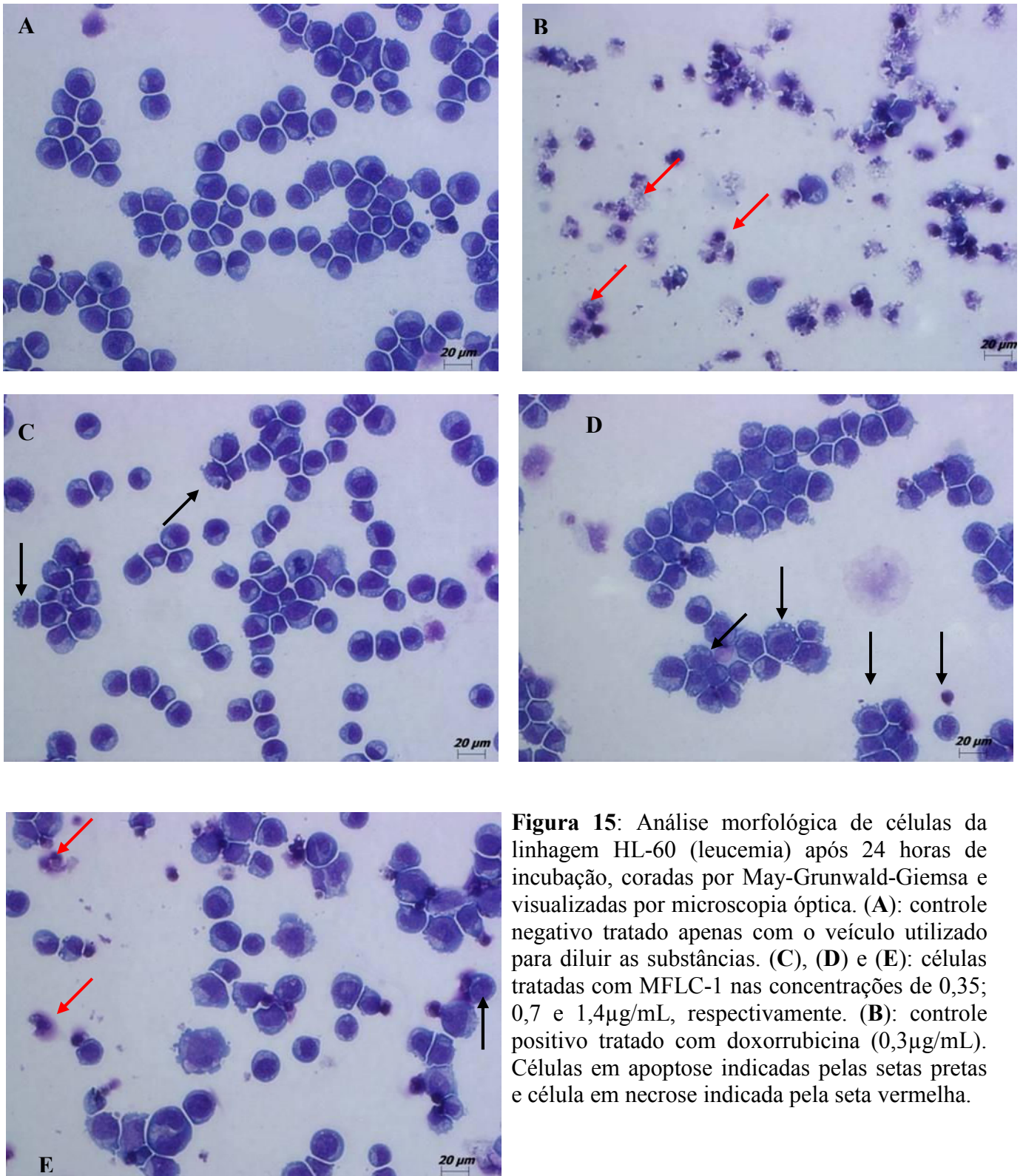


Figura 15: Análise morfológica de células da linhagem HL-60 (leucemia) após 24 horas de incubação, coradas por May-Grünwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. (A): controle negativo tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. (C), (D) e (E): células tratadas com MFLC-1 nas concentrações de 0,35; 0,7 e 1,4 μ g/mL, respectivamente. (B): controle positivo tratado com doxorrubicina (0,3 μ g/mL). Células em apoptose indicadas pelas setas pretas e célula em necrose indicada pela seta vermelha.

A fim de legitimar o papel dos radicais livres na indução do processo apoptótico pelo composto MFLC-1, as células HL-60 foram pré-tratadas com α -tocoferol (40 μ M) e pós-tratadas com o composto nas concentrações de 0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL por 24 horas. A **figura 16** mostra que, na presença de α -tocoferol, as células HL-60 do grupo tratado estão iguais às do grupo controle negativo, ou seja, as células estão íntegras, com membrana íntegra, citoplasma homogêneo, células pleomórficas, presença de figuras mitóticas e nítida visualização tanto da membrana citoplasmática quanto nuclear. Esses dados reforçam a importância dos radicais livres na iniciação do processo de morte em células HL-60 para o composto em questão.

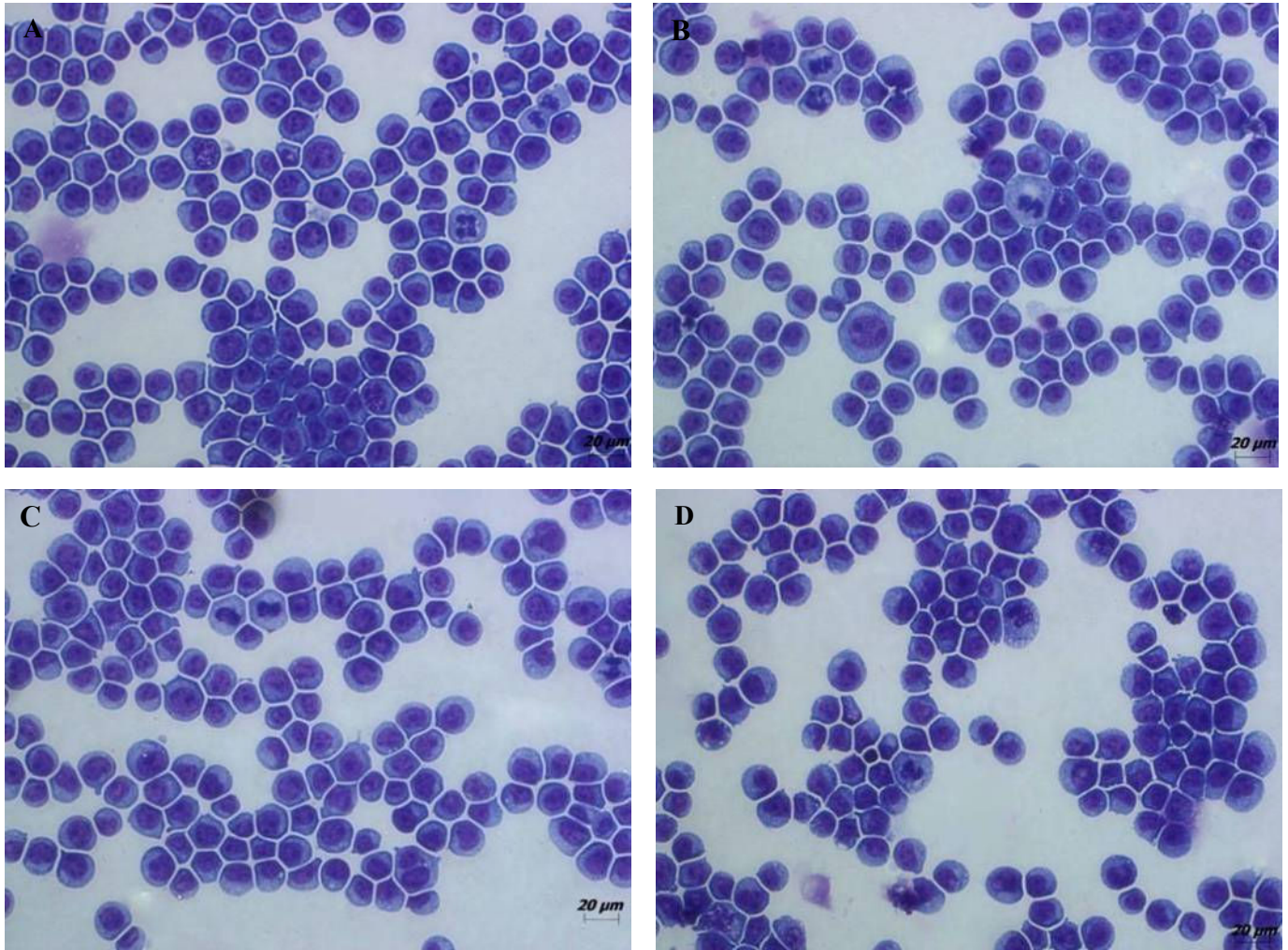


Figura 16: Análise morfológica de células da linhagem HL-60 (leucemia), coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica, após pré-tratamento com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$) e pós-tratamento com o composto MFLC-1 por 24 horas de incubação. (A): controle negativo tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias e com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$). (B), (C) e (D): células tratadas com MFLC-1 nas concentrações de 0,35; 0,7 e $1,4\mu\text{g/mL}$ na presença do α -tocoferol, respectivamente.

4.4 Análises celulares utilizando citometria de fluxo

A integridade da membrana celular e a concentração de células, a análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA, a determinação do potencial transmembrânico de mitocôndria, a determinação da externalização da fosfatidilserina, a ativação das caspases

iniciadoras 8 e 9 e a ativação das caspases efetoras 3 e 7 foram resolvidas utilizando citometria de fluxo. Todas as análises descritas a seguir foram realizadas em dois momentos: no primeiro momento o composto MFLC-1 foi adicionado após o plaqueamento das células HL-60; e, no segundo momento, as células foram pré-tratadas com α -tocoferol e pós-tratadas com MFLC-1. O tempo de incubação com MFLC-1 foi de 24 horas em ambos os testes.

4.4.1 Integridade de membrana celular e concentração de células por citometria de fluxo

Como mostrado na **figura 17A**, o composto MFLC-1 causou diminuição do número de células de maneira dose-dependente. A doxorubicina (DOX), utilizada como controle positivo, mostrou uma diminuição acentuada do número de células.

Já a **figura 17B**, mostra que, quando a cultura é pré-tratada com α -tocoferol (40 μ M) não há uma diminuição do número de células em relação ao controle negativo, nem mesmo nas maiores concentrações testadas.

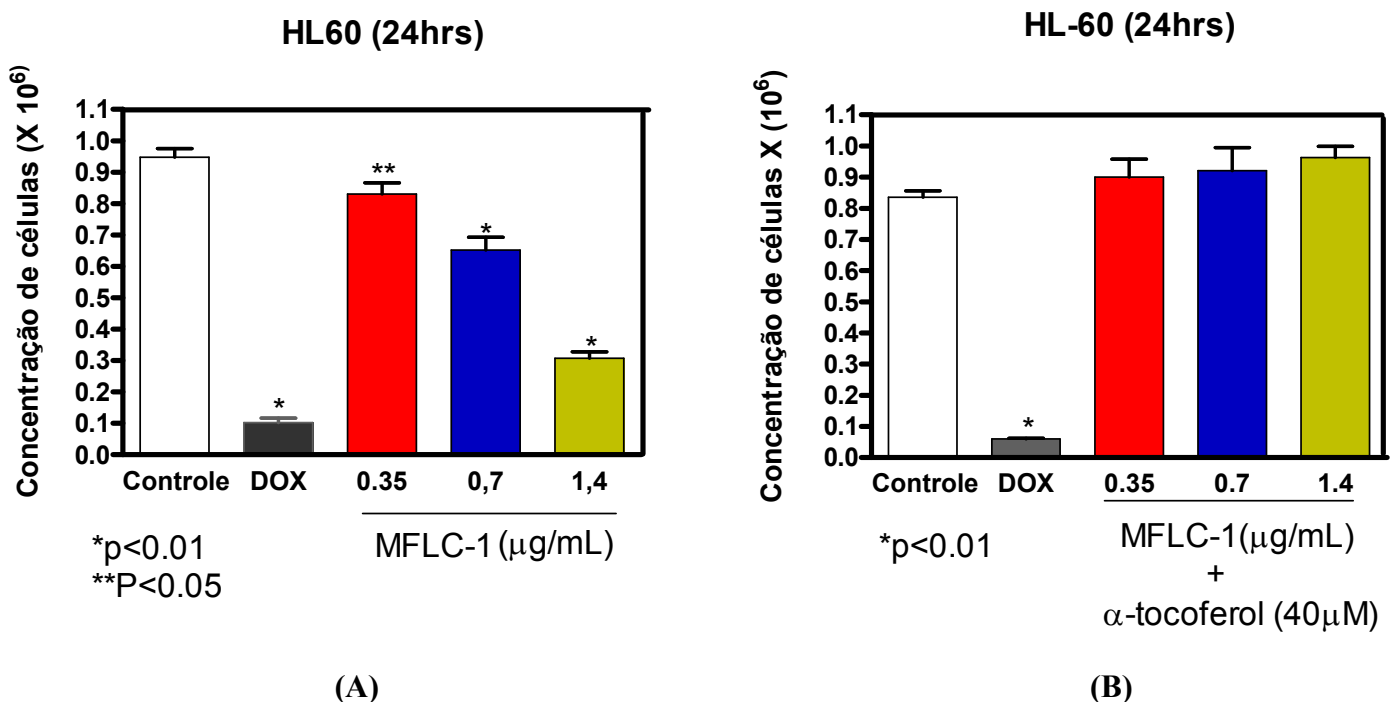


Figura 17: Efeito do composto MFLC-1 sobre a densidade de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação, na ausência (A) na presença de α -tocoferol 40 μ M (B).

O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas e α -tocoferol 40 μ M. Doxorubicina (0,35 μ g/mL) foi utilizada como

controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. $*p < 0,01$ e $**p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Já na avaliação da integridade de membrana utilizando o corante iodeto de propídeo, corante hidrofílico permeável somente em células com a membrana rompida, mostrou que, na menor concentração testada ($0,35\mu\text{g/mL}$) não houve perda da integridade de membrana, enquanto que na concentração de $0,7\mu\text{g/mL}$ houve uma pequena perda da integridade de $10,67\%$ e na concentração de $1,4\mu\text{g/mL}$ a perda foi de $34,06\%$ (**Figura 18A**). Esses dados confirmam os resultados prévios (viabilidade por exclusão do azul de tripan, incorporação de BrdU e coloração diferencial por Laranja de Acridina / Brometo de Etídio) presentes no anexo C, D e F, respectivamente, e com os resultados dos testes de MTT e coloração por May-Grunwald-Giemsa, anexo B e E, respectivamente. A doxorubicina (DOX), utilizada como controle positivo, mostrou uma perda da integridade de membrana em $47,58\%$.

Já, quando a cultura foi pré-tratada com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$), não houve perda da integridade de membrana em relação ao controle negativo, nem mesmo nas maiores concentrações testadas. Esses dados de densidade celular e integridade de membrana celular para a cultura de HL-60 pré-tratada com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$), confirmam os resultados prévios de MTT e coloração por May-Grunwald-Giemsa, onde se encontrou, para as concentrações testadas, células com a mesma morfologia do controle negativo (**Figura 18B**).

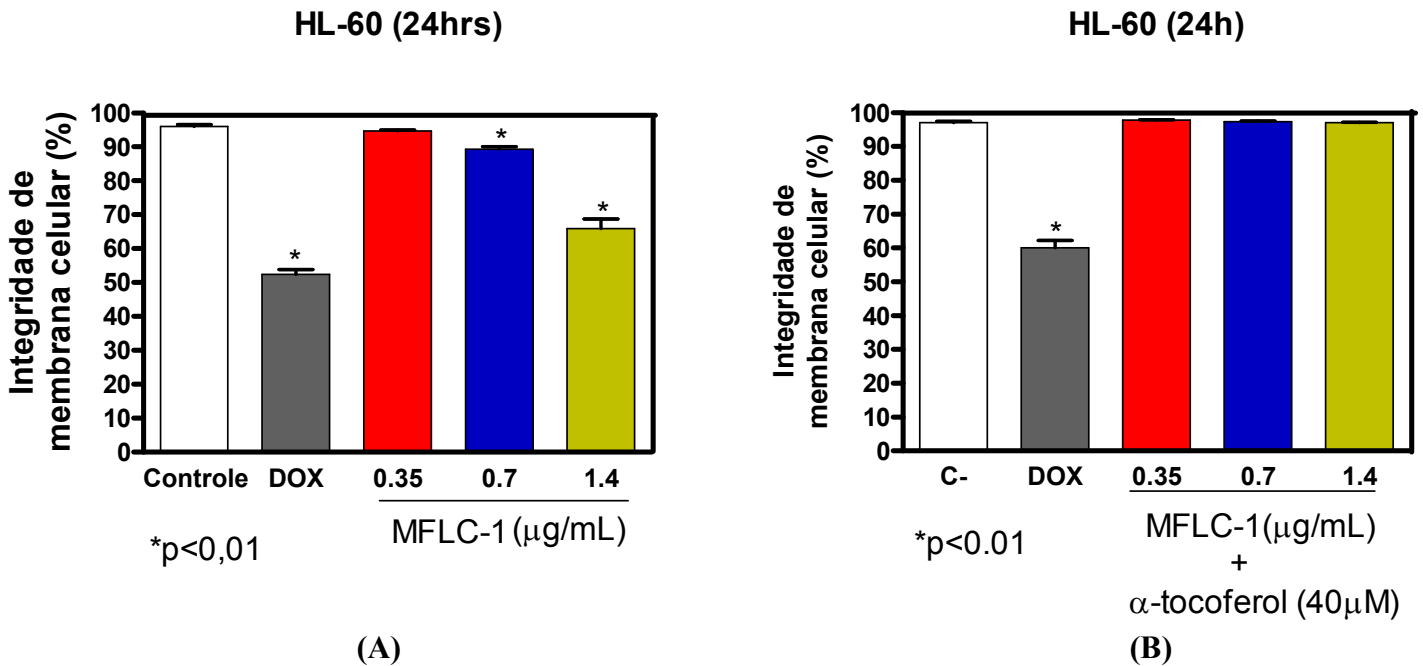


Figura 18: Efeito do composto MFLC-1 sobre a integridade de membrana de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação, na ausência (A) na presença de α -tocoferol 40 μ M (B).

O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,35 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.2 Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA por citometria de fluxo

A progressão do ciclo celular e a fragmentação internucleossomal do DNA das células de HL-60, tratadas com o composto MFLC-1 foram realizadas por citometria de fluxo e analisadas através do programa ModFit LT 3.1. Os resultados demonstram que tanto o controle positivo (DOX) quanto as duas maiores concentrações do composto MFLC-1

causaram aumento significativo na fragmentação do DNA. Após 24 horas de exposição, as células do controle negativo apresentaram 10,58% de fragmentação, enquanto que, as células tratadas com MFLC-1 nas concentrações de 0,35, 0,7 e 1,4 μ g/mL apresentaram 13,19%, 22,82% e 51,76% de fragmentação do DNA, respectivamente. Já a Doxorubicina, utilizada como controle positivo mostrou 82,56% das células com DNA fragmentado (**Figura 19A**).

Quanto à progressão das fases do ciclo celular, o composto MFLC-1 não interferiu no ciclo celular, sugerindo um mecanismo ciclo-independente. Porém, pôde-se observar uma pequena tendência, embora estatisticamente significativa, do acúmulo de células tratadas na fase G2/M. A doxorubicina, utilizada como controle positivo, reduziu a porcentagem de células em G2/M (**Figura 19C**).

Porém, quando se pré-trata as células leucêmicas de HL-60 com α -tocoferol (40 μ M), as efeitos de fragmentação do DNA (**Figura 19B**) e as alterações nas fases do ciclo (**Figura 19D**), causados pelo composto MFLC-1, são extinguidos; demonstrando um papel importante dos radicais livres nos efeitos do composto teste. O efeito da doxorubicina, utilizada como controle positivo, foi o mesmo como demonstrado em gráficos anteriores, aumento significativo da porcentagem de fragmentação de DNA e redução da porcentagem de células em G2/M.

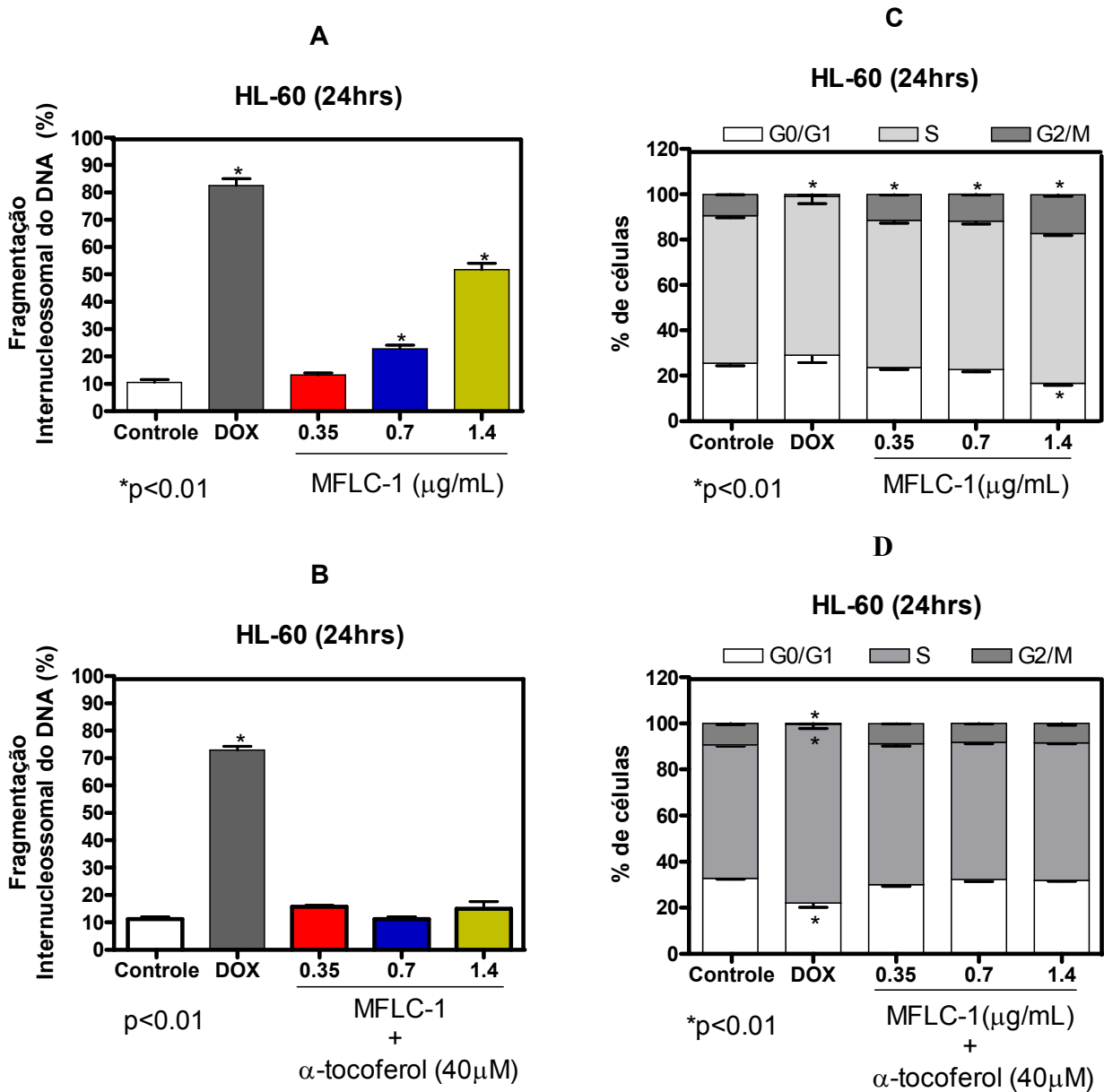


Figura 19: Efeito do composto MFLC-1 sobre a fragmentação de DNA e a distribuição do ciclo celular em células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação na ausência (A e C) e na presença de α -tocoferol 40 μ M (B e D), respectivamente.

O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,35 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil

eventos foram contados em cada experimento. $*p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.3 Determinação da Externalização da fosfatidilserina

A externalização da fosfatidilserina (PS) é considerada um marco importante nas fases iniciais da ativação do processo apoptótico (MARTIN *et al.*, 1995). Logo, as células tratadas com os compostos durante 24 horas e os controles (DMSO, 0,1%) foram incubadas com anexina V (proteína com alta afinidade por PS) com o objetivo de avaliar a porcentagem de células com PS externalizado sobre a superfície da membrana celular.

Após a exposição, as duas maiores concentrações testadas apresentaram aumentos significativos na frequência de células com PS externalizado quando confrontadas com o controle negativo. Para a concentração de $0,7\mu\text{g/mL}$, houve um aumento significativo de células em processo de apoptose tardia, já a maior concentração testada ($1,4\mu\text{g/mL}$) houve aumentos significantes de apoptose tardia e necrose, e uma diminuição significativa de células viáveis (**Figura 20**).

Porém, quando se pré-trata as células leucêmicas de HL-60 com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$), não se observa uma acentuada, ou até mesmo significativa, externalização da PS, demonstrando que as células dos grupos tratados estão iguais as do controle negativo (**Figura 21**).

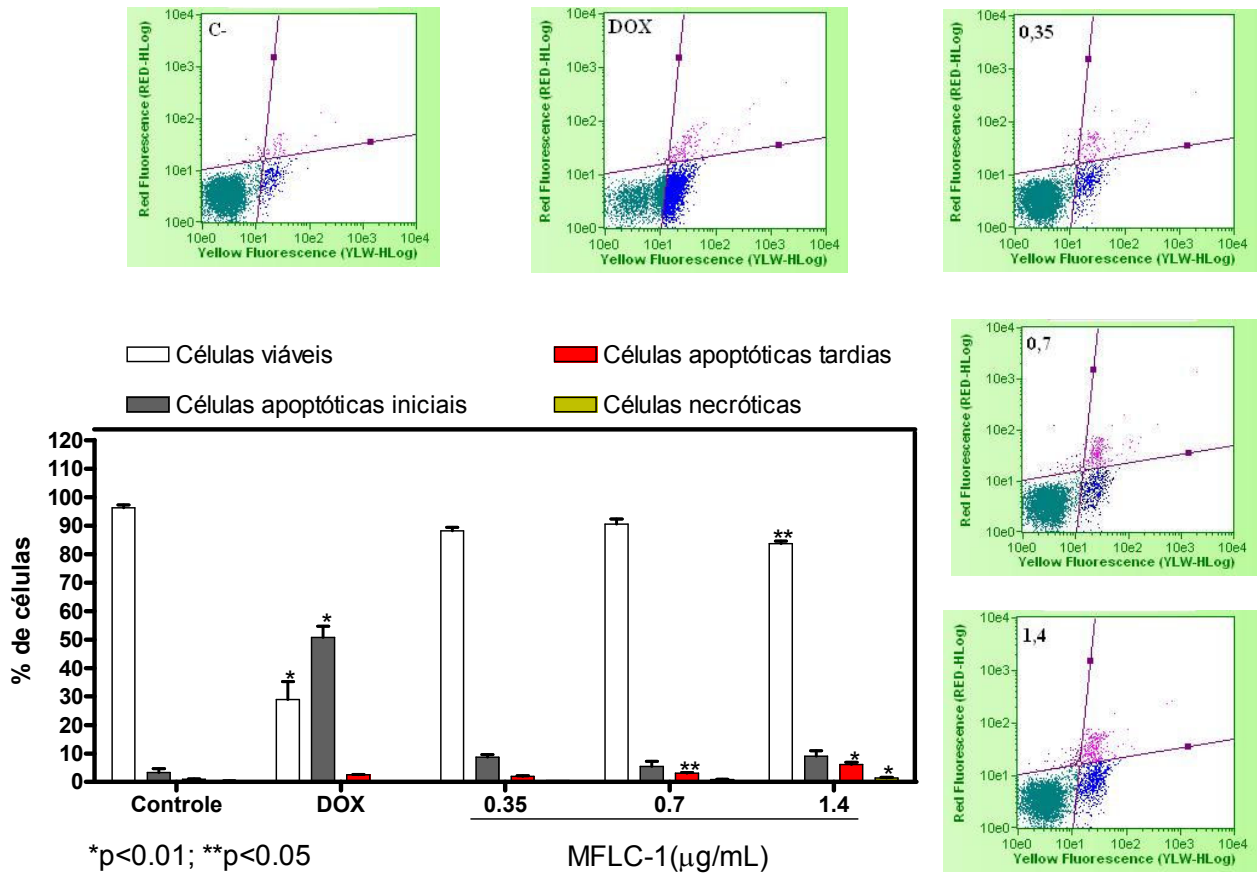


Figura 20: Efeito do composto MFLC-1 sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$; * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

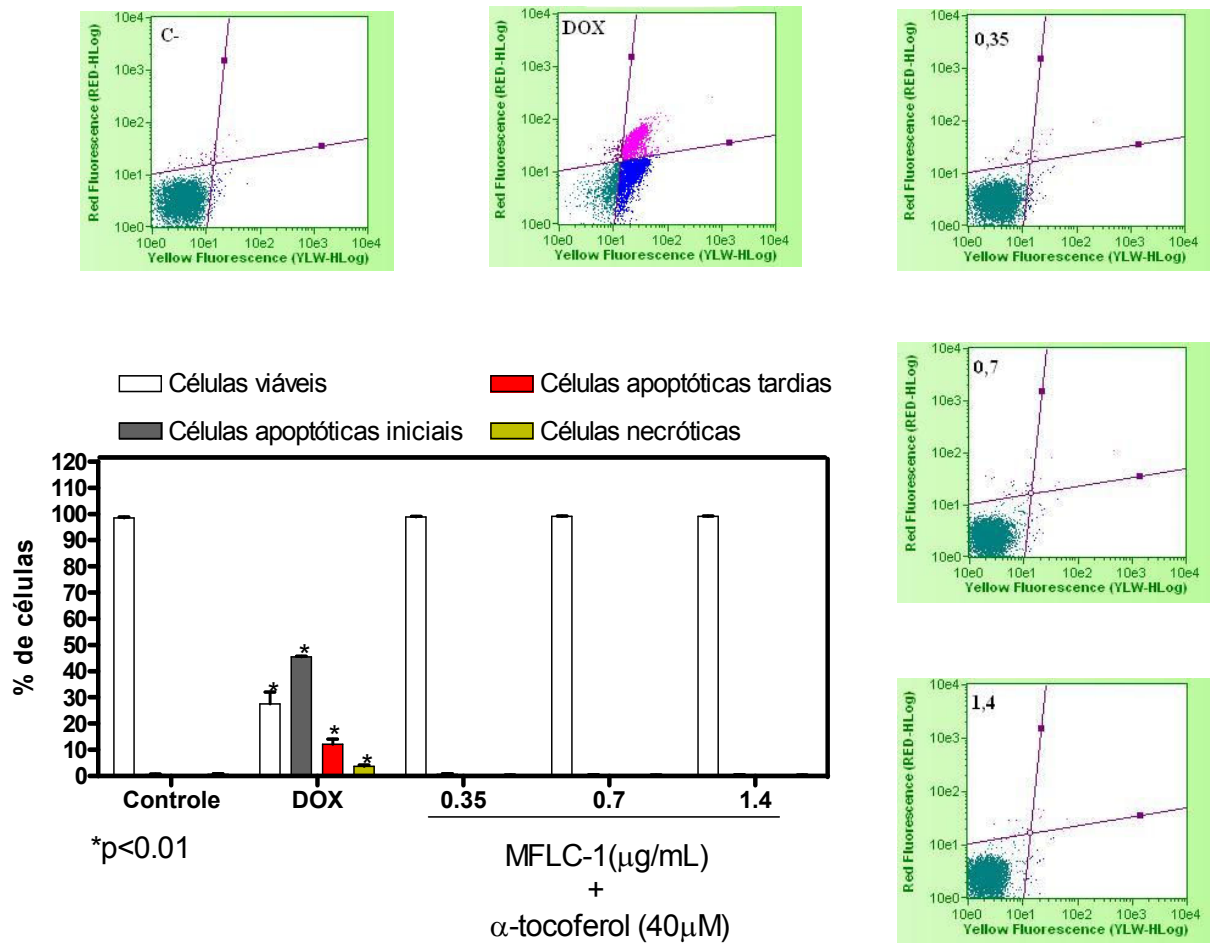


Figura 21: Efeito do composto MFLC-1 sobre a externalização da fosfatidilserina em células leucêmicas de HL-60 pré-tratadas com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$), determinado por citometria de fluxo utilizando Anexina V-PE e 7-AAD, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir a substância testada e com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$). Doxorrubicina ($0,3\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p<0,01$; * $p<0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.4 Efeitos da MFLC-1 sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9 em células HL-60

Existem duas vias de sinalização para a morte celular por apoptose: a via intrínseca, ou dependente da mitocôndria, onde está envolvida a caspase 9, e a via extrínseca, ou via receptor de morte, onde está envolvida a caspase 8. Essas caspases ativadas são capazes de ativar as caspases efetoras que irão clivar substratos intracelulares (FADEEL; ORRENIUS, 2005).

Após 24 horas de exposição, foi observado significativa ativação de caspase iniciadora 8 apenas na maior concentração (1,4µg/mL). A porcentagem de células, na concentração de 1,4µg/mL, em apoptose inicial é 35,27%, em apoptose tardia é 19,65% e em necrose é 4,21% (**Figura 22A**).

Já para a caspase 9, após 24 horas de exposição, foi observado significativa ativação de caspase iniciadora 9 nas duas maiores concentrações testadas (0,7 e 1,4µg/mL). A porcentagem de células, na concentração de 0,7µg/mL, em apoptose inicial é 15,22%, em apoptose tardia é 7,17% e em necrose é 2,54%. Na concentração de 1,4µg/mL, 56,37% das células estão em apoptose inicial, 28,91% em apoptose tardia e 10,81% em necrose (**Figura 22B**).

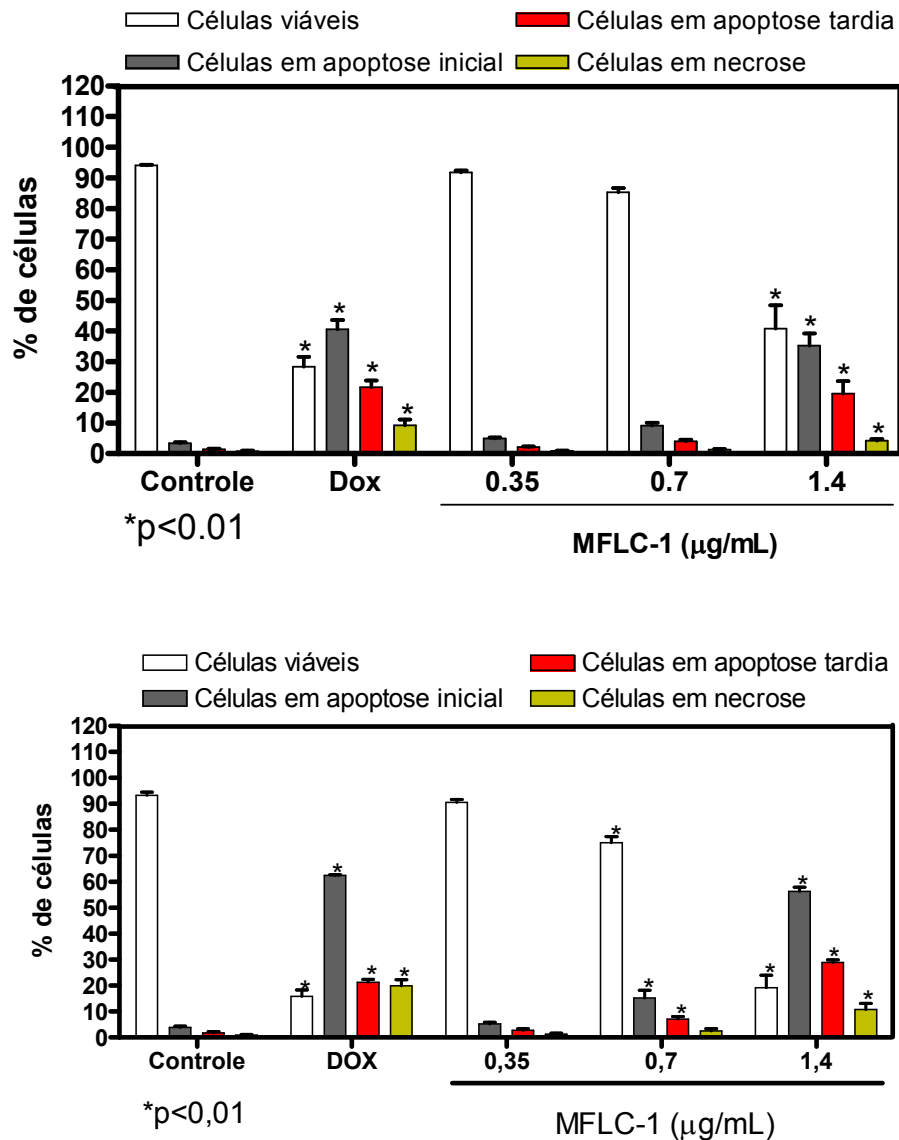


Figura 22: Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação de caspase iniciadora 8 em células leucêmicas de HL-60 determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,3μg/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Porém, quando se pré-incubam as células de HL-60 com α -tocoferol (40μM) e posteriormente se trata com MFLC-1, não se observa uma alteração significativa da ativação

das caspases iniciadoras 8 e 9; demonstrando que o α -tocoferol inibe a ativação das vias intrínseca e extrínseca, uma vez que o composto MFLC-1, quando incubado com as células de HL-60, tem capacidade de ativá-las (**Figura 23**).

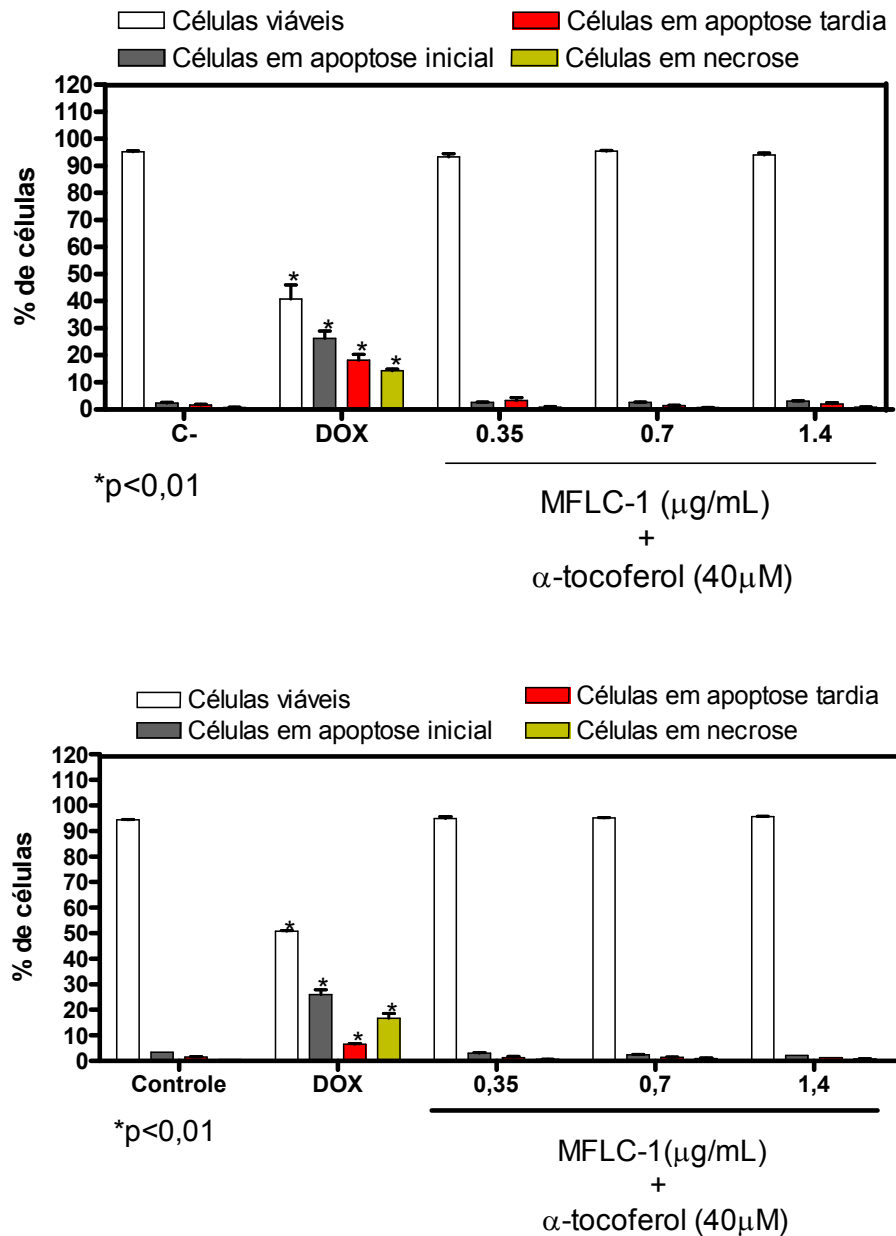


Figura 23: Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação das caspases iniciadoras 8 (A) e 9 (B) em células leucêmicas de HL-60 pré-tratadas com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas e com α -tocoferol ($40\mu\text{M}$). Doxorrubicina ($0,3\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle

positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * $p < 0,01$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.5 Efeitos da MFLC-1 sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células HL-60

Uma vez ativadas, as caspases efetoras são as responsáveis pelas mudanças morfológicas observadas durante o processo apoptótico, como a fragmentação do DNA e a condensação de cromatina (MARCELLI *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 1999).

Após 24 horas de exposição, foi observado significativa ativação de caspases efetoras 3 e 7 apenas na maior concentração (1,4 μ g/mL). A porcentagem de células, na concentração de 1,4 μ g/mL, em apoptose inicial é de 28,76%, em apoptose tardia é 24,24% e em necrose é 4,25% (**Figura 24A**).

Quando se pré-incubam as células de HL-60 com α -tocoferol (40 μ M) e posteriormente se trata com MFLC-1, não se observa uma ativação significativa das caspases efetoras quando confrontadas com o controle (**Figura 24B**). Esse resultado corrobora com os dados da **figura 23**, uma vez, como as caspases iniciadoras, não foram ativas; é de se esperar que as caspases efetoras também não seriam ativas, pois estas dependem da ativação das iniciadoras.

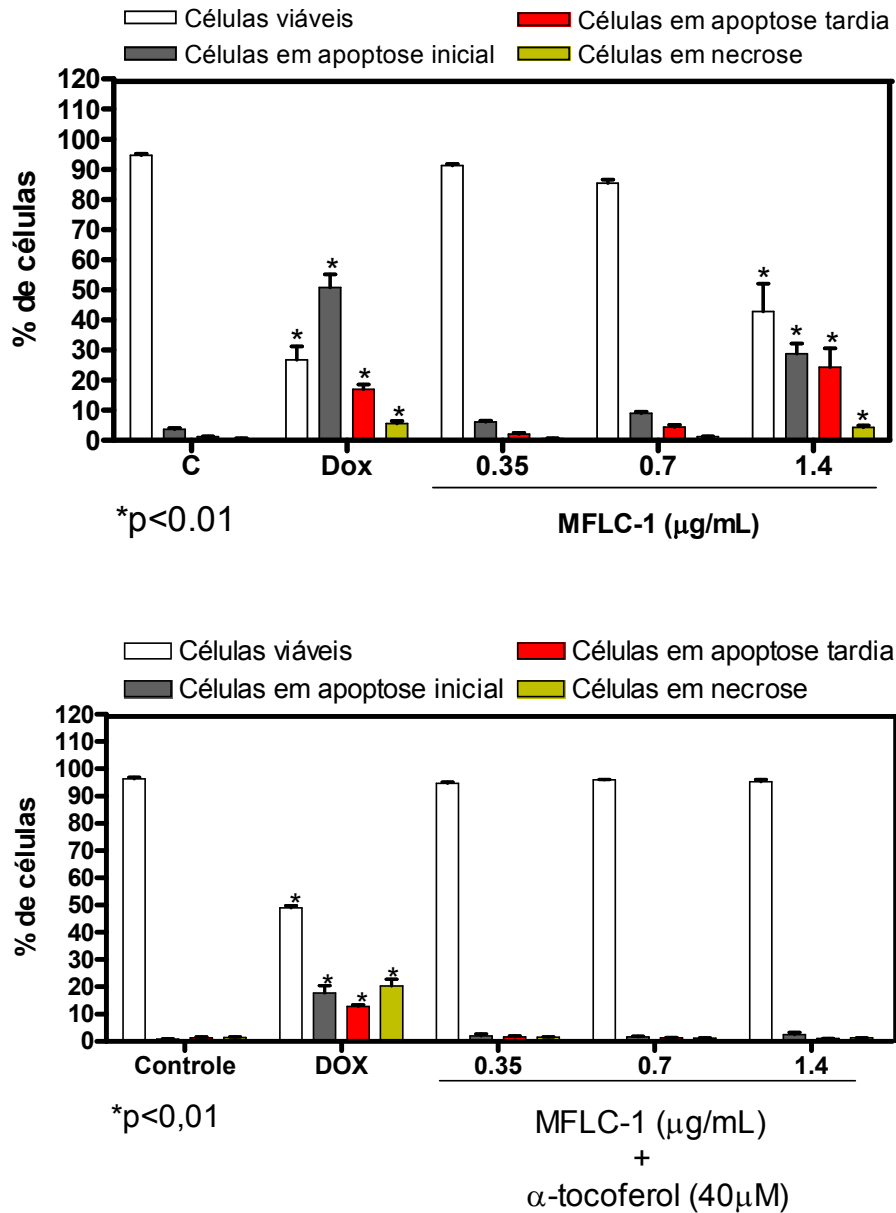


Figura 24: Efeito do composto MFLC-1 sobre a ativação de caspases efetoras 3 e 7 em células leucêmicas (HL-60) determinado por citometria de fluxo utilizando FLICA e FAM (verde), após 24 horas de incubação na ausência (A) e na presença de α -tocoferol 40 μ M (B), respectivamente.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (0,3 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo (DOX). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. $*p < 0,01$; comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5 Avaliação do potencial genotóxico em células tumorais humanas de HL-60 e Células mononucleadas de sangue periférico (CMSP)

A avaliação do potencial genotóxico em células de HL-60 e CMSP, tratadas com o composto MFLC-1, foi realizada pelo ensaio do cometa em condições alcalinas. A **figura 25** revela, para as células HL-60 e CMSP, respectivamente, que todas as doses foram capazes de induzir quebras de fitas simples, porém foi observado uma maior migração do DNA na menor concentração.

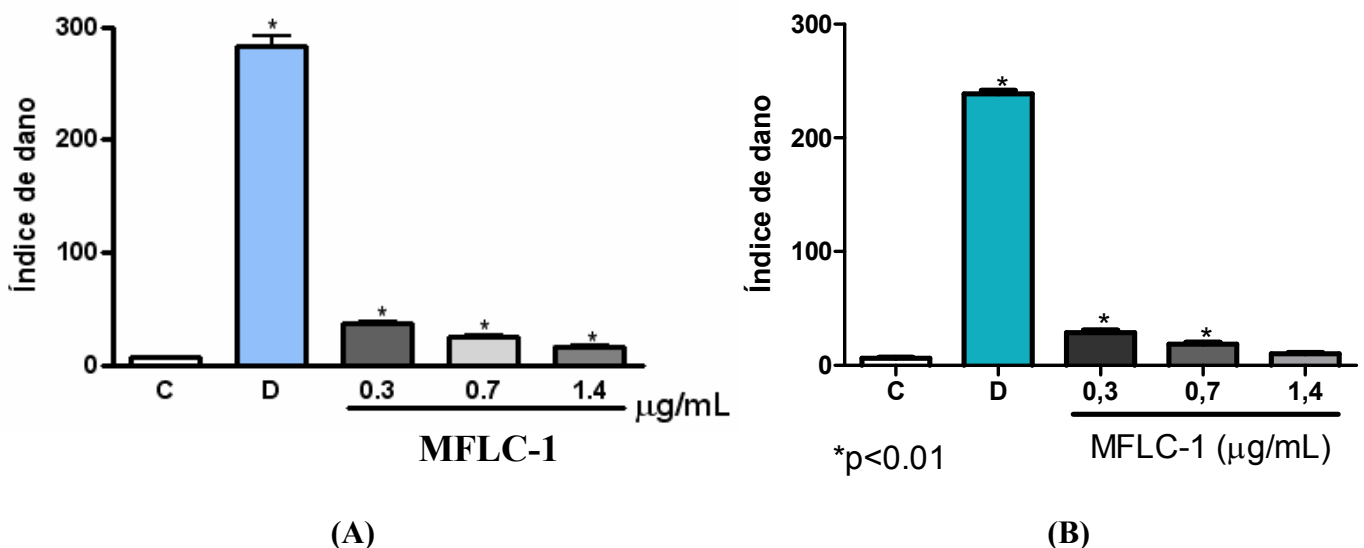


Figura 25: Efeito do composto MFLC-1 sobre a indução de dano no DNA em células leucêmicas de HL-60 (A) e CMSP (B) determinadas pelo ensaio do cometa, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas (DMSO 0,1%). Doxorubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

A fim de verificar se esse comportamento da substância MFLC-1, em induzir maiores índices de dano nas menores concentrações, ocorre devido a indução da formação de ligações cruzadas (covalentes) entre DNA e proteínas nucleares, as células (HL-60 e CMSP) foram incubadas com proteinase K (1mg/mL) e submetidas à eletroforese.

A **figura 26** mostra para as células HL-60 e CMSP respectivamente, incubadas com

proteínase K, que todas as doses foram capazes de induzir significativamente quebras de fita simples em células de HL-60, e que somente as duas maiores concentrações induziram significativamente as quebras em CMSP. Porém, diferentemente do cometa sem proteínase K, foi observado um aumento da migração do DNA de acordo com o aumento da concentração testada.

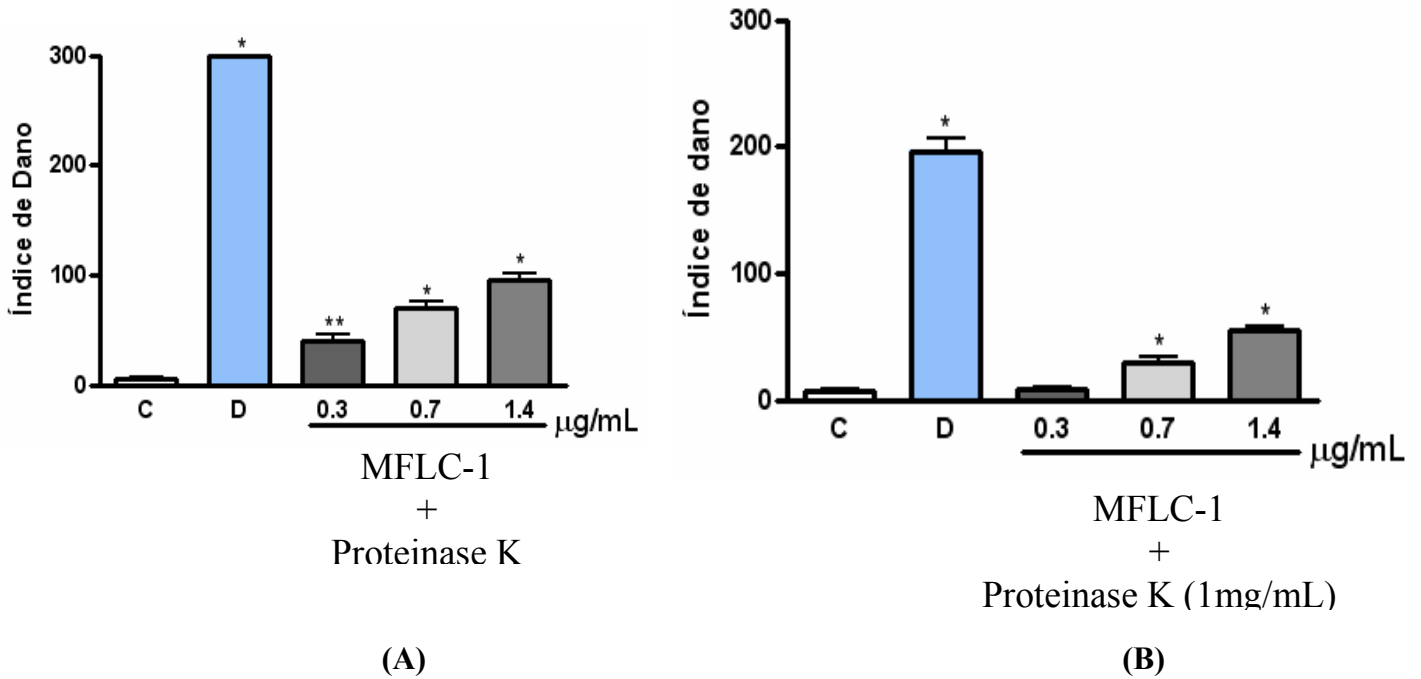


Figura 26: Efeito do composto MFLC-1 sobre a indução de dano no DNA em células leucêmicas de HL-60 (A) e em CMSP (B) tratadas com proteínase K (1mg/mL) determinadas pelo ensaio do cometa, após 24 horas de incubação.

O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas (DMSO 0,1%) e com proteínase K na mesma concentração dos tratamentos. Doxorubicina (0,3µg/mL) foi utilizada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.6 Avaliação da atividade antitumoral da MFLC-1 em camundongos transplantados com Sarcoma 180

A avaliação da atividade antitumoral da MFLC-1 foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do Sarcoma 180. O composto MFLC-1 foi

administrado nos animais pela via intraperitoneal (25 e 50 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço e rins.

Nas duas doses testadas, o composto MFLC-1 foi capaz de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (DMSO 4%). O peso médio dos tumores dos animais tratados com DMSO 4% foi de $0,914 \pm 0,30$, enquanto que nos animais tratados com 25 e 50mg/kg/dia do composto MFLC-1 por via i.p. (intra-peritoneal) foi de $0,410 \pm 0,26$ g, $0,260 \pm 0,12$ g, respectivamente. Dessa maneira foi possível determinar os percentuais de inibição do crescimento tumoral. O composto MFLC-1 administrado por via i.p. inibiu em 55,11 e 71,58 % o crescimento do tumor nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente. O 5-FU inibiu em 49,8 % ($0,460 \pm 0,25$ g) do crescimento tumoral (**Figura 27**).

Na análise histopatológica do tumor, em todos os grupos foram encontradas células poligonais pleomórficas. A neoplasia apresentou alto índice mitótico, invasão muscular e áreas de necrose de coagulação (**figuras 28A e -B; -C; -D; -E**). Nos grupos tratados de 25 e 50mg/Kg/dia foi observado um aumento nas áreas de necrose de coagulação.

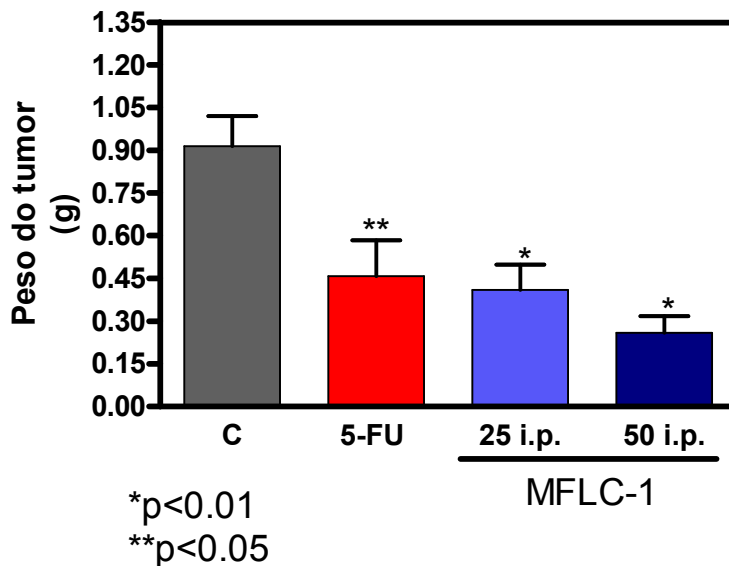


Figura 27: Efeito da MFLC-1 nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia i.p. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculos*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 4%). 5-FU: o 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 8 animais. *p < 0,01, **p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnet.

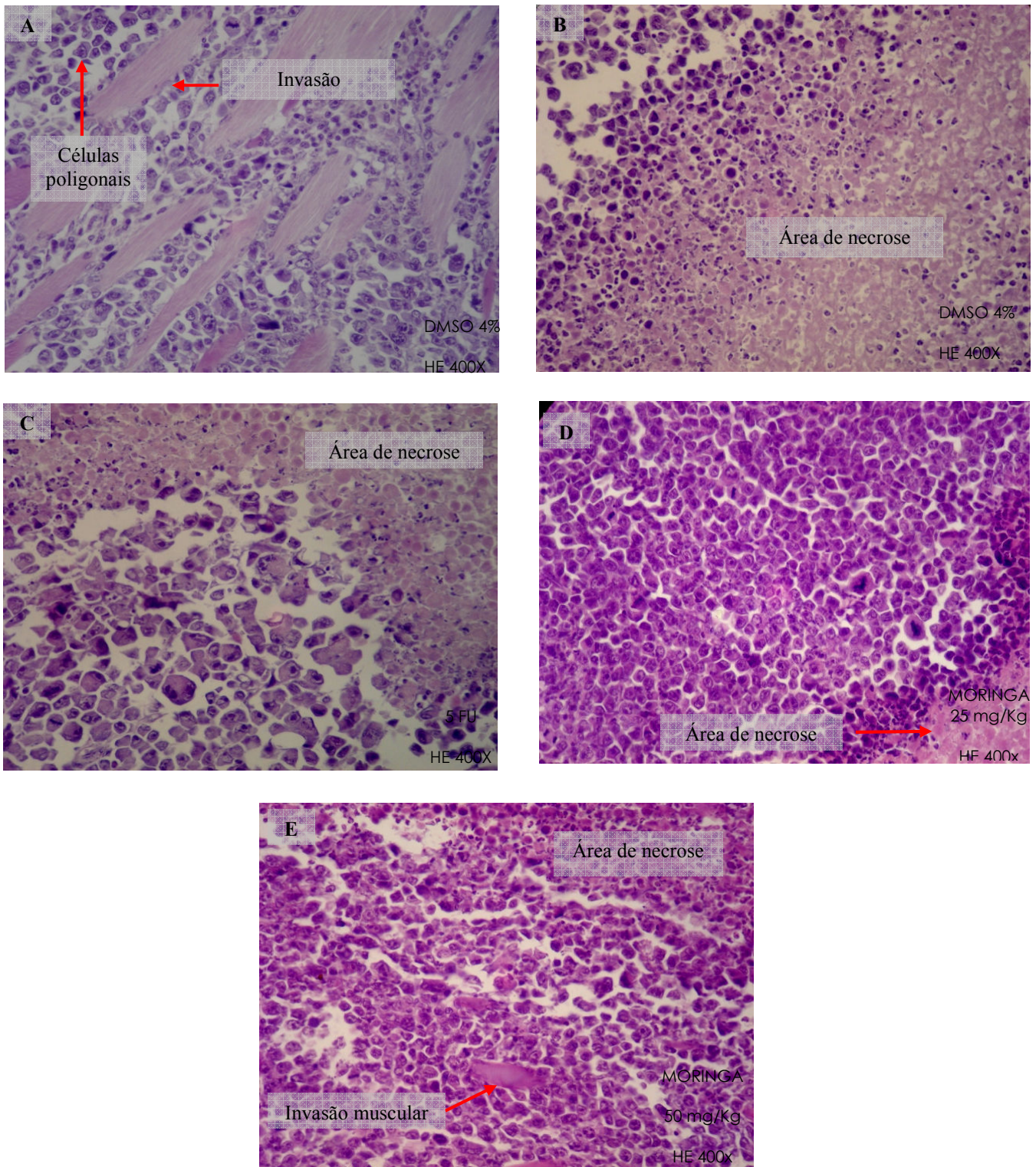


Figura 28: Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (C). MFLC-1 foi administrada nas doses de 25 (D) e 50mg/kg/dia i.p (E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

4.7 Análise histopatológica dos órgãos

Os pesos dos órgãos dos animais tratados com a MFLC-1 nas doses de 25mg/Kg e 50mg/Kg apresentaram diferenças significativas quando comparados com os do grupo controle, sendo bastante notável a redução no tamanho do baço e do fígado dos animais tratados (**tabela 5**).

Na análise do fígado, foi detectado, para todos os grupos, uma hiperplasia das células de Kupffer. Para as dose de 25 e 50 mg/Kg, **figuras 29C, -D/E**, respectivamente, foram observados intensa tumefação celular de hepatócitos, focos inflamatórios e esteatose microvesicular focal.

Os cortes histológicos dos rins mostram arquitetura glomerular preservada para todos os grupos. Para o grupo controle (**figura 30A**) observa-se uma discreta tumefação celular do epitélio tubular (proximais e distais) e nos grupos tratados de 25 e 50mg/Kg, **figuras 30C/D, -E/F**, respectivamente, observa-se que alguns glomérulos estão hipocelulares e ocorre uma moderada tumefação celular do epitélio tubular (proximais e distais).

Na análise do baço, encontramos, para o grupo controle (**figuras 31A e B**) e o grupo tratado de 25 mg/Kg (**figuras 31E e -F**), os folículos linfóides evidentes com nítida visualização da polpa branca e vermelha e pigmentos de hemossiderina. No grupo tratado de 50 mg/Kg (**figuras 31G e -H**), observa-se folículos linfóides pequenos com áreas definidas e outras irregulares, escassa polpa branca intercalada por áreas de congestão e muitos megacariócitos.

Esses achados demonstram que a substância testada apresentou indícios de toxicidade hepática, caracterizada principalmente pela esteatose microvesicular, e renal, porém, não é dose-dependente. Todas essas alterações encontradas apresentam caráter de reversibilidade, pois não encontramos áreas de necrose tecidual e, além disso, em todas as amostras o parênquima hepático e a arquitetura glomerular estavam preservados.

Tabela 5: Efeito da MFLC-1 nas doses de 25 e 50 mg/Kg/dia i.p., sobre o peso úmido relativo dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180, após 7 dias de tratamento. C: o controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir a droga (DMSO 4%). 5-FU: o quimioterápico 5-Fluorouracil (25 mg/Kg/dia) foi utilizado como controle positivo. *p<0,01.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Peso final dos animais (g)	Baço g/100g de massa corporea	Rim g/100g de massa corpórea	Fígado g/100g de massa corporea
Controle DMSO (4%)	-	30,7 ± 2,3	0,22 ± 0,04	0,32 ± 0,04	1,48 ± 0,14
5-FU	25 i.p.	29,2 ± 1,8	0,08 ± 0,02*	0,29 ± 0,02	1,30 ± 0,10
MFLC-1	25 i.p.	24,2 ± 2,1*	0,09 ± 0,02*	0,32 ± 0,03	0,90 ± 0,32*
	50 i.p.	24,0 ± 3,6*	0,06 ± 0,03*	0,33 ± 0,03	0,64 ± 0,42*

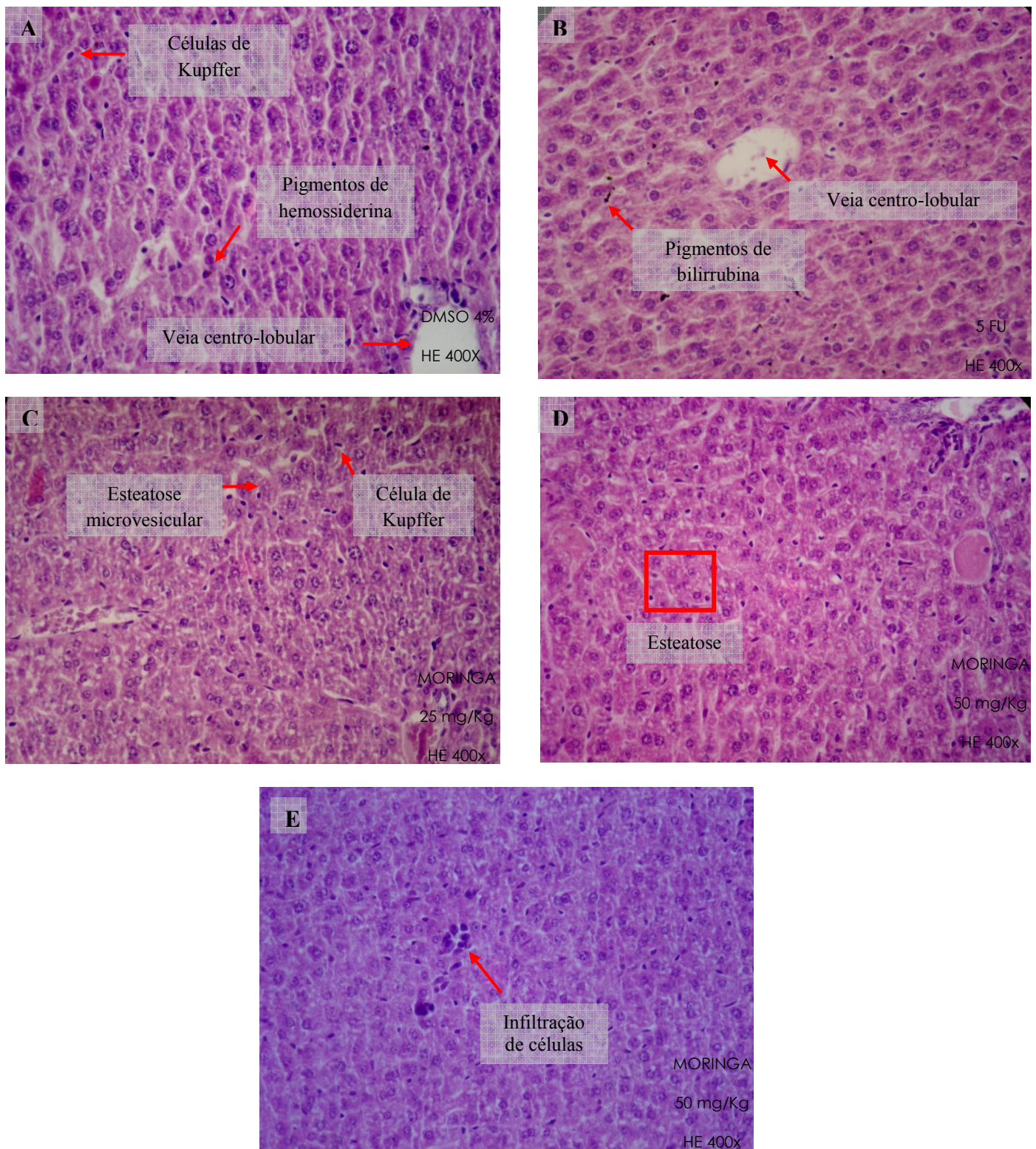


Figura 29: Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). MFLC-1 foi administrada nas doses de 25 (C) e 50mg/kg/dia i.p. (D e E). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

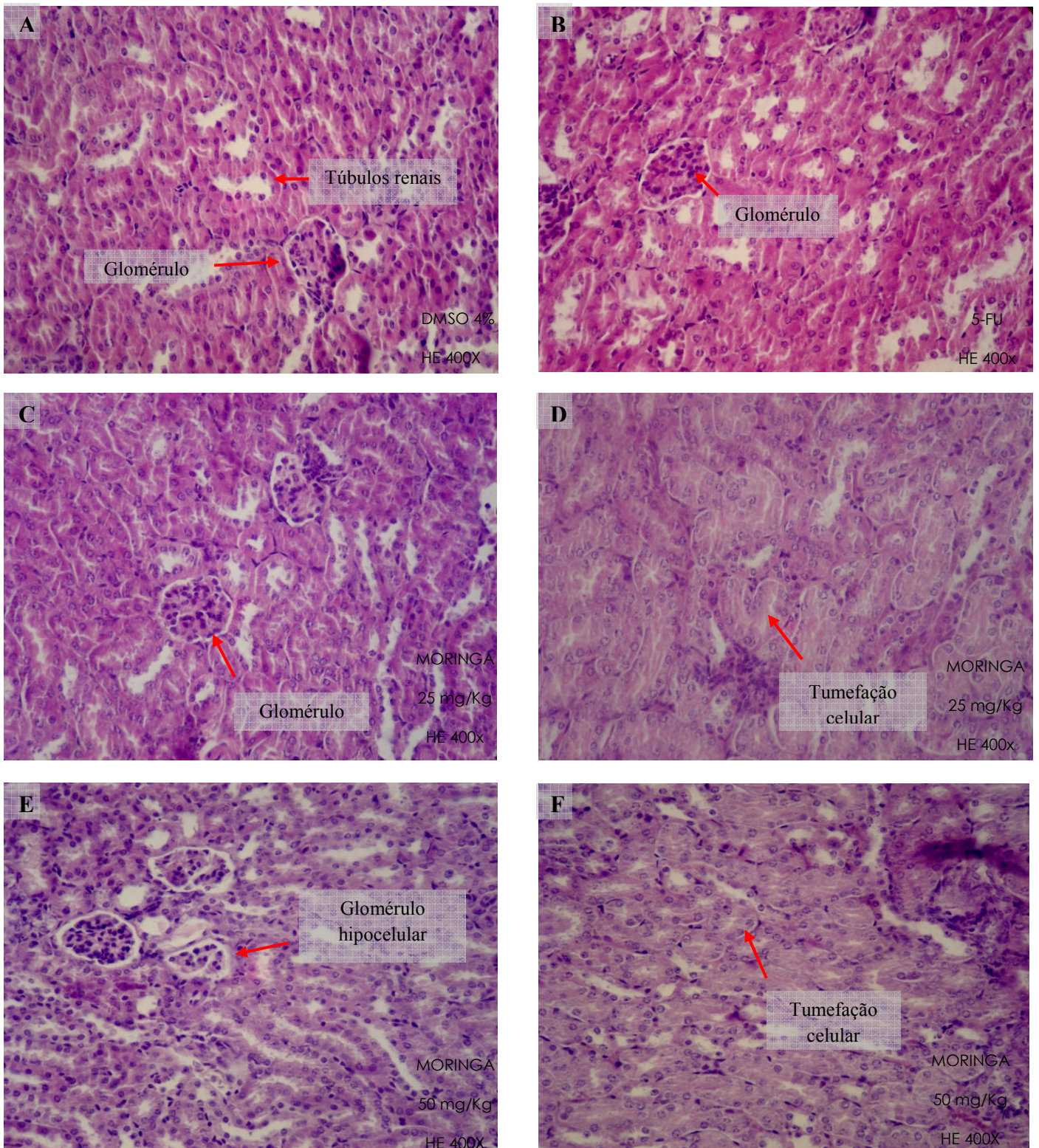


Figura 30: Fotomicrografia do rim de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4 %). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (B). MFLC-1 foi administrada nas doses de 25 (C e D) e 50mg/kg/dia i.p. (E e F). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

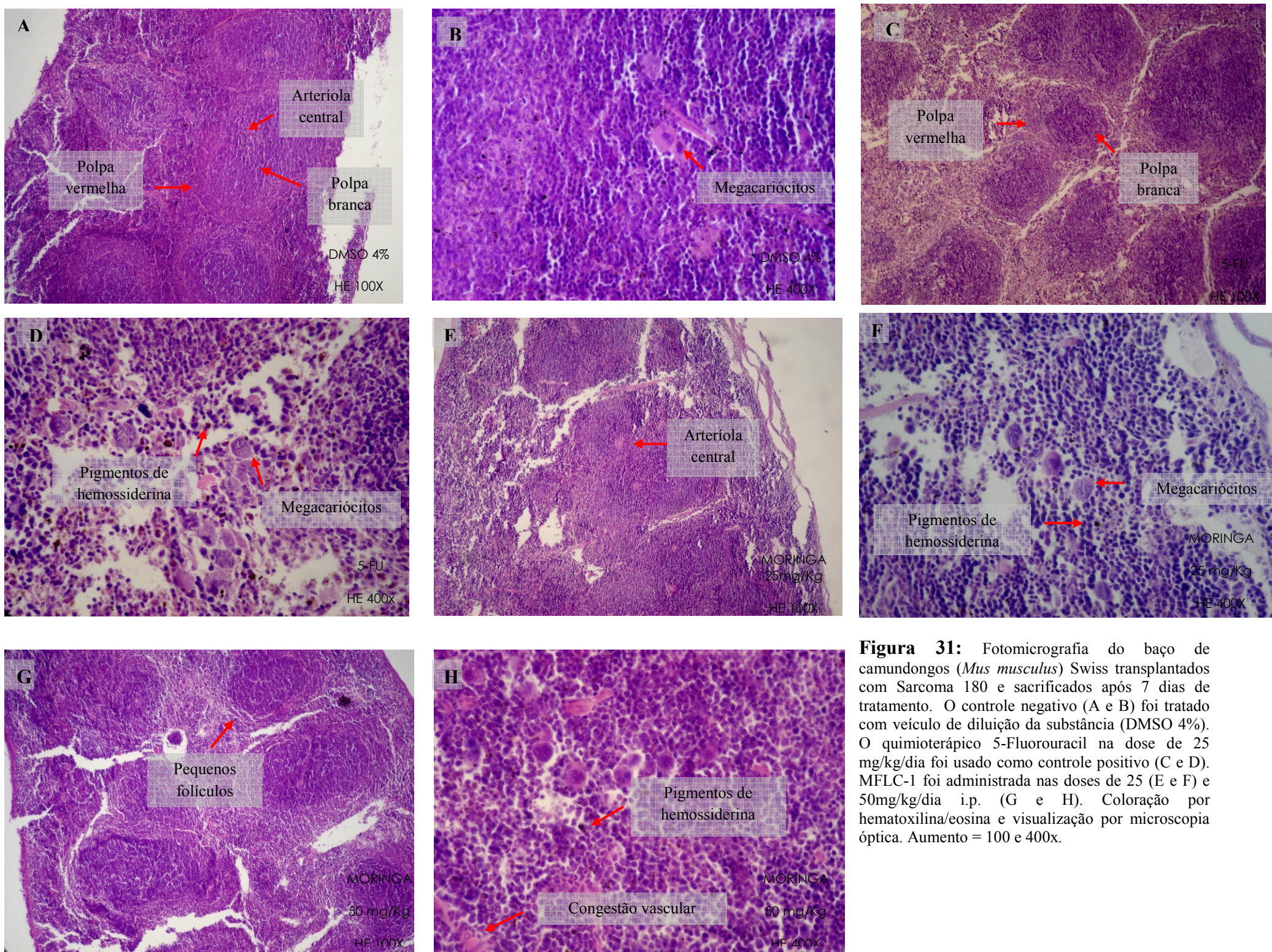


Figura 31: Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A e B) foi tratado com veículo de diluição da substância (DMSO 4%). O quimioterápico 5-Fluorouracil na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo (C e D). MFLC-1 foi administrada nas doses de 25 (E e F) e 50mg/kg/dia i.p. (G e H). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 100 e 400x.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A utilização de plantas no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (BALLADRIN *et al.*, 1993). Nos últimos 25 anos, de todos os compostos bioativos descobertos, 63% são produtos naturais, derivados deles ou possuem estruturas baseadas em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). O valor dos produtos naturais pode ser avaliado por três critérios: (1) taxa de introdução de novas entidades químicas, (2) número de doenças tratadas e/ou evitadas pela molécula e (3) freqüência no uso e no tratamento da doença.

A busca de agentes anticâncer a partir de fontes vegetais iniciou-se por volta dos anos cinqüenta com a descoberta de vários agentes citotóxicos. Segundo o FDA, 75% das drogas aprovadas e utilizadas no tratamento do câncer provêm de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003; CRAGG; NEWMAN, 2005; CHIN *et al.*, 2006; HARVEY, 2008). Há um grande número de agentes anti-neoplásicos derivados de vegetais sob avaliação pré-clínica e clínica (SRIVASTAVA *et al.*, 2005), e apesar do desenvolvimento da química combinatória e da modelagem molecular, a quimioterapia do câncer ainda permanece desalentadora, devido à múltipla resistência às drogas e aos sérios efeitos colaterais resultantes das similaridades morfológicas e fisiológicas entre as células normais e transformadas, o que torna difícil evitar a toxicidade advinda do tratamento (KAMB, 2005). Por isso, é importante identificar moléculas naturais com potencial atividade terapêutica para a realização de futuros estudos clínicos e que sirvam de fonte de conhecimento para a síntese de novos compostos com atividade tumoral mais efetiva e menos tóxica e/ou novos mecanismos de ação.

A planta *Moringa oleifera* vem despertando a atenção dos cientistas pelo fato de ser utilizada por diferentes culturas em várias partes do mundo, sendo considerada como uma fonte potencial de compostos anticâncer. Inúmeras propriedades medicinais têm sido atribuídas a várias partes dessa árvore. Na medicina popular ela tem sido utilizada no tratamento de inflamação, tumores, doenças infecciosas, juntamente com distúrbios cardiovasculares, gastrointestinais, hematológicos e hepatorreais, atividade antiespasmódica e antidiurética (GUEVARA *et al.*, 1999; BENNET *et al.*, 2003; FAHEY, 2005; ANWAR *et al.*, 2007; BOSE *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008; SABALE *et al.*, 2008). Costa-Lotufo *et al.* (2005) demonstraram atividade citotóxica do extrato de raiz de *M. oleifera* coletadas em Chittagong, Bangladesh. A amostra foi testada em diferentes linhagens celulares de tumores sólidos e de suspensão. Segundo os autores, a CI_{50} desse

extrato em linhagens de CEM (leucemia) e B-16 (melanoma murino) foi de, respectivamente, 12,7 e 28,8 μ g/mL. Lampronti *et al.* (2008) mostraram que o extrato etanólico das raízes de *M. oleifera* possuem atividade citotóxica em células K-562 (eritroleucemia), com CI_{50} de 6,88 μ g/mL, em células Jukart, CI_{50} de 18 μ g/mL, e em células Raji, CI_{50} de 1,88 μ g/mL.

Em estudo prévio, o composto MFLC-1, extraído das flores de *M. oleifera*, apresentou elevado potencial citotóxico. Para as linhagens leucêmicas de HL-60 e K-562 suas CI_{50} , após 72h de incubação, foram de 1,32 e 2,87 μ g/mL, respectivamente; e para as linhagens de tumores sólidos, SF-295 (glioblastoma) e HCT-8 (carcinoma de cólon), as CI_{50} foram de 2,66 e 3,38 μ g/mL, respectivamente. Esse composto foi ainda capaz de diminuir a viabilidade celular, a proliferação celular e induzir a morte celular por apoptose seguida de necrose secundária em células de HL-60 (RODRIGUES, 2008).

No presente estudo, a CI_{50} do composto MFLC-1 foi determinada igualmente pelo ensaio do MTT. Em células de HL-60, o composto testado apresentou CI_{50} de 1,39 μ g/mL, após 24 horas de incubação, um valor bem próximo àquele obtido após 72h de tratamento desta mesma célula.

Fahey (2005) e Anwar et al. (2007) destacaram que o composto MFLC-1 apresenta significativa inibição da promoção tumoral induzida pelo vírus Epstein-Barr, destacando ainda que essa atividade depende do grupo isotiocianato. Esse grupamento, isotiocianato, é formado a partir da hidrólise de glicosinolatos (β -tioglicosídeo-N-hidroxissulfatos), por ação da enzima mirosinase (VERHOEVEN et al., 1997; KASSIE et al., 1999; MURATA et al., 2000; FAHEY, 2005; BHEEMREDDY; JEFFERY, 2006; ANWAR et al., 2007; CASTRO et al., 2008; AL-GENDY et al., 2010). Fhahey (2005) em um estudo fitoquímico descreve que as plantas da família da *M. oleifera* são ricas em compostos contendo o açúcar simples ramnose, sendo também abundantes em compostos glicosinolatos e isotiocianatos.

Existem vários tipos de isotiocianatos, dentre eles o benzil-isotiocianato (BITC), que exibe atividade sobre câncer de pulmão e possui a capacidade de aumentar a ocorrência de morte celular por apoptose em células cancerosas (CASTRO et al., 2008). Tsou et al. (2009) afirmam que o composto BITC é um potente inibidor da carcinogênese mamária em ratos e pulmonar em camundongos induzida por hidrocarbonetos policíclicos, além de inibir a tumorigênese pulmonar induzida pelo benzo[a]pireno em camundongos. Esses autores demonstraram que esse composto é citotóxico para as células de leucemia mielocítica murina (WEHI-3), com CI_{50} de $0,74\mu M$ após 24 horas de incubação.

Fazendo uma análise estrutural no composto MFLC-1, podemos observar que este possui, além de uma porção glicosilada contendo o açúcar simples ramnose (figura 12, em verde), um grupamento benzil-isotiocianato (BITC) (figura 12, em vermelho), que pode ser o responsável pela expressiva atividade citotóxica, acima mencionada, em células de HL-60.

Um dos grandes problemas evidenciados no tratamento do câncer, utilizando quimioterápicos, são os seus efeitos colaterais. Grande parte desses efeitos se deve à baixa seletividade dos fármacos às células tumorais, onde as células normais mais afetadas são as que proliferam rapidamente, como as da pele, do trato gastrointestinal e do sangue. Nesse contexto, hoje em dia, o principal objetivo da quimioterapia é a busca por novos fármacos seletivos que sejam capazes de destruir apenas as células tumorais, preservando as células normais (ANAZETTI *et al.*, 2003). Segundo alguns autores, na avaliação do potencial citotóxico de uma substância, é de fundamental importância à utilização de células normais, tais como os linfócitos, para avaliar a seletividade da droga teste para células normais ou tumorais (ZUCO *et al.*, 2002; ANAZETTI *et al.*, 2003).

O composto MFLC-1 apresentou CI_{50} em CMSP de $3,62\mu g/mL$. Embora deva considerar-se relevante tal citotoxicidade frente às células normais, vale ressaltar que,

tomados em conjunto, os valores de CI_{50} para HL-60 e CMSP podem ser traduzidos numa maior sensibilidade das células leucêmicas a MFLC-1, cerca de 2,6 vezes, em detrimento das células normais.

Cultura de células de mamíferos, dentre elas a linhagem leucêmica de HL-60 representam uma importante ferramenta exaustivamente utilizada nos estudos dos efeitos de uma droga sobre a proliferação e densidade celular, a progressão do ciclo e a indução de morte celular (PAILARD *et al.*, 1999; MILITÃO *et al.*, 2006). Esta linhagem derivou de sangue periférico de um paciente com leucemia promielocítica aguda, caracterizada, cultivada e estabelecida inicialmente por Collins *et al.* (1977).

As drogas indutoras de morte celular por apoptose podem ser úteis na quimioterapia do câncer (ZAMAI *et al.*, 2001; LOS *et al.*, 2003; BRADY, 2004). Esse processo de morte celular é altamente regulado e elimina células e tecidos indesejados, protegendo o organismo contra a formação de neoplasias. O mau-funcionamento do processo de apoptose pode ocasionar diversas patologias, sobremaneira o câncer (MAJNO; JORIS, 1995; OPALKA *et al.*, 2002). Diversas alterações morfológicas da célula podem ser sugestivas de apoptose: redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação internucleosomal do DNA, formação de “blebbings” na membrana plasmática e, finalmente, fragmentação celular, formando os corpos apoptóticos (REED, 2000; NAGANE *et al.*, 2001; REED, 2001; FADEEL & ORRENIUS, 2005; GREEN; KROEMER, 2005; KROEMER *et al.*, 2005; RICCI & ZONG, 2006; ELMORE, 2007; MELLIER *et al.*, 2010).

Em contraste, a morte por necrose é, freqüentemente, atribuída simplesmente a perturbações metabólicas ou injúrias mecânicas, onde há uma rápida desestabilização da membrana plasmática causada pelo um aumento inicial do volume celular, sendo, comumente, relacionada com a resposta inflamatória. Muitos estímulos indutores de apoptose podem fazer com que células da mesma população morram por necrose (SERGEY *et al.*, 2003).

As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente das necróticas. Confirmando com os resultados de MTT e os resultados prévios do teste de exclusão por azul de tripan (**figura 33, anexo B e C, respectivamente**), o composto MFLC-1 reduziu significativamente e de maneira concentração-dependente a quantidade de células viáveis. MFLC-1 diminuiu a integridade da membrana plasmática nas duas maiores concentrações testadas, sendo o efeito mais pronunciado na maior concentração (1,4 μ g/mL). Os dados de concentração de células e

integridade de membrana corroboram com os resultados da coloração por May-Grunwald Giemsa, onde é possível observar características morfológicas evidentes do processo de morte por apoptose. Esses dados também corroboram com os resultados prévios de coloração diferencial com laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) (**figura 36, anexo F**), onde foi possível observar uma perda da integridade de membrana nas maiores concentrações.

Zhang *et al.* (2003) demonstraram que vários tipos de isotiocianatos, dentre eles o benzil-isotiocianato, são capazes de inibir a proliferação de células tumorais de maneira dose-dependente, além de induzir a morte celular por apoptose em células de HL-60.

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta na extensa clivagem (quebra) do DNA (VERMES *et al.*, 2000), que pode ser detectada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídio. A análise da fragmentação do DNA realizada por citometria de fluxo demonstrou que o composto MFLC-1 induz fragmentação significativa no DNA nas duas maiores concentrações testadas, sendo esta fragmentação bastante expressiva na concentração de 1,4µg/mL. Assim, as células expostas à concentração de 1,4µg/mL e que apresentaram perda da integridade de membrana e extensa fragmentação no DNA, após 24 horas de incubação com o composto MFLC-1, podem ser consideradas, segundo Ormerod (2002), células apoptóticas em estágios finais ou em processo de necrose secundária.

Existe uma variedade de métodos para avaliar alterações no ciclo celular induzida por drogas, sendo um deles a citometria de fluxo. Alguns tratamentos que induzem apoptose podem ser ciclo-específico ou não, mas todos podem de alguma forma influenciar este processo (ORMEROD, 2002). O composto MFLC-1, quando incubado com as células HL-60, não interferiu em nenhuma fase do ciclo celular, não sendo, portanto ciclo-específico, mas prejudicando o mesmo ao causar intensa fragmentação no DNA como descrito anteriormente. Não é bem esclarecido se os isotiocianatos interferem em alguma fase específica do ciclo celular. Sug *et al.* (2006) mostraram que um extrato da planta *Raphanus sativus*, contendo uma mistura de isotiocianatos, promoveu uma parada no ciclo celular na fase de G1 em células de músculo liso vascular de aorta de ratos. Já Visanji *et al.* (2004), utilizando células de adenocarcinoma colorretal humano Caco-2, conseguiu observar parada em G2/M com isotiocianatos, dentre eles, o benzil-isotiocianato.

Muitos quimioterápicos induzem a morte celular em células cancerígenas através da elevação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essa super-produção de EROs tem como objetivo atingir diferentes alvos, incluindo proteínas, lipídios e

ácidos nucleicos, a fim de causar lesões celulares suficientes para estimular moléculas pró-apoptóticas, ou, até mesmo, acionar a cascata apoptótica mitocondrial (LI, *et al.*, 2010). EROs são definidos como espécies químicas que possuem oxigênio com propriedades reativas, incluindo todos os radicais do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radicais hidroxila (HO^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LIMA; ABDALLA, 2001; PELICANO *et al.*, 2004). Durante a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, os elétrons são enviados através de uma cadeia respiratória e um gradiente de prótons é estabelecido no espaço intermembrânico para que ocorra a síntese de ATP. Um evento bioquímico associado a este processo metabólico é a produção do superóxido. Alguns elétrons podem escapar do transporte de elétrons na cadeia mitocondrial, especialmente nos complexos I e III, e reagir com o oxigênio molecular para formar o superóxido. Estima-se que 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria é reduzido para formar superóxido, que é posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio, sendo a mitocôndria considerada como a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (KENT *et al.*, 2000; PELICANO *et al.*, 2004).

O grau de estresse oxidativo em uma célula depende do equilíbrio dinâmico entre a sua geração e os processos de eliminação. O que muitos quimioterápicos fazem é aumentar excessivamente a produção de EROs, causando danos em vários componentes celulares, entre eles os lipídios de membrana, ocasionando um processo chamado de peroxidação lipídica (HIGUCHI, 2003; PELICANO *et al.*, 2004). A peroxidação lipídica é definida como uma cascata de eventos bioquímicos envolvendo a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), ocasionada pela incorporação de um oxigênio molecular a estes AGPI. Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis ao processo de peroxidação; isso acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade da troca iônica e formação de produtos citotóxicos, entre eles o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonal (4-HNE) (LIMA; ABDALLA, 2001; PELICANO *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2007; BARRERA *et al.*, 2008; CAVALCANTE; BRUIN, 2009; PIZZIMENTI *et al.*, 2010). As principais metodologias utilizadas para avaliar a peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases desse processo. Um dos principais métodos utilizados, conhecido como TBARS, é o teste que mensura o malondialdeído (MDA), produto formado durante a peroxidação lipídica (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; LIMA; ABDALLA, 2001).

O composto MFLC-1 aqui estudado, aumentou à produção de malondialdeído, sendo que apenas a maior concentração testada foi estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Segundo Gago-Dominguez *et al.* (2007) os isotiocianatos são potentes indutores de peroxidação lipídica e que evidências sugerem que a apoptose mediada por isotiocianatos é induzida por estresse oxidativo fruto dos produtos da peroxidação lipídica.

A fim de corroborar a participação dos produtos de peroxidação lipídica na citotoxicidade mediada pelo composto MFLC-1, utilizou-se células de HL-60 pré-incubadas com o antioxidante α -tocoferol (vitamina E). Segundo alguns autores, α -tocoferol é um potente inibidor da peroxidação lipídica, agindo como um sequestrador de radicais peroxil sendo oxidado à tocoferoxil, bloqueando, assim, a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (ZHANG *et al.*, 2001; ALMEIDA; BALL, 2005).

Quando as células de HL-60 são pré-incubadas com α -tocoferol (40 μ M) e pós-tratadas com MFLC-1, todos os efeitos previamente vistos de citotoxicidade são inibidos ou, pelo menos, atenuados. Começando pelo teste do MTT, notamos um aumento da CI_{50} , de 1,39 para 3,9 μ g/mL para as células de HL-60; e um aumento da CI_{50} de 3,66 para >5 μ g/mL em CMSP. Nos ensaios que avaliaram número de células, viabilidade celular, fragmentação de DNA e ciclo celular, utilizando citometria de fluxo, em células HL-60 pré-tratadas com α -tocoferol e pós-tratadas com MFLC-1 não foram identificadas nenhuma alteração significativa para cada um dos parâmetros analisados, sendo os dados dos grupos tratados iguais estatisticamente aos do grupo controle negativo, diferentemente do que foi observado para as células tratadas apenas com MFLC-1. Esses resultados corroboram com a coloração por May-Grunwald Giemsa onde não foi possível localizar características morfológicas compatíveis com morte celular em todos os grupos pré-tratados com α -tocoferol e pós-tratados com MFLC-1, sendo as células desses grupos muito similares às do controle negativo. Isso se deveu a capacidade de o α -tocoferol inibir a produção de agentes citotóxicos, como as espécies reativas de oxigênio e os produtos oriundos da peroxidação lipídica, fazendo com que a morte celular fosse, também, inibida. Segundo Aoshiba *et al.* (2001) o α -tocoferol, dentre outros antioxidantes, inibiram “*in vitro*” a indução de apoptose pelos componentes da fumaça de cigarro em macrófagos de pulmão de rato.

Até agora podemos perceber indicativos, através dos testes de citometria de fluxo e de coloração por May-Grunwald Giemsa, de que a molécula MFLC-1 induz a morte em células HL-60 quando incubadas por 24 horas. Porém, fazem-se necessárias evidências bioquímicas, a fim de comprovar de fato qual o tipo de morte está envolvida no processo. Para isso, alguns

parâmetros foram analisados, dentre eles a externalização do fosfolipídio de membrana, fosfatidilserina; e a ativação das caspases iniciadoras, caspases 8 e -9, e efetoras, -3 e 7.

Durante as primeiras fases do processo apoptótico, ocorre a perda de simetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina (PS) da membrana interna da camada lipídica para a superfície celular (VERMES *et al.*, 1995; KRYSKO *et al.*, 2008). A fosfatidilserina é um fosfolipídio interno de membrana, que ao ser externalizado sinaliza que a célula deve ser fagocitada, pois está sofrendo apoptose (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; KRYSKO *et al.*, 2008). A detecção da PS externalizada pode ser realizada através da sonda fluorescente anexina V, uma proteína com alta afinidade por PS (KRYSKO *et al.*, 2008).

Após 24 horas de exposição à MFLC-1, foram observadas células HL-60 com PS externalizado conjugado com anexina V, levando-nos a sugerir que a apoptose está envolvida no processo de morte celular. Contudo, quando comparamos os resultados da externalização da fosfatidilserina com as alterações morfológicas observadas na coloração por May-Grunwald Giemsa, AO/BE (RODRIGUES, 2008) e fragmentação internucleossomal, pode-se observar uma quantidade de células apoptóticas e necróticas bem superior que a população positiva para fosfatidilserina externalizada, principalmente na maior concentração testada (1,4 µg/mL).

Zhang *et al.* (2003), utilizando células HL-60 incubadas com benzil-isotiocianato por 24 horas, observou que o aumento da dose causou uma diminuição de células apoptóticas identificadas por citometria de fluxo, utilizando marcação de 7-AAD e anexina V conjugada com PE. Voitkum e Zhitkovith (1999) descrevem que os produtos oriundos da peroxidação lipídica são capazes de reagir com fosfolipídios, dentre eles a fosfatidilserina. Isso explicaria a pequena marcação de fosfatidilserina nas células incubadas com MFLC-1, o que ocasionou um resultado falso-negativo. Logo, podemos inferir que essa metodologia utilizada sozinha, nesse caso, não é suficiente para concluirmos qual tipo de morte está envolvida nesse processo.

Com isso, deu-se prosseguimento ao estudo do mecanismo de morte celular induzida pelo composto MFLC-1 utilizando a técnica para a marcação das caspases. As caspases são cisteíno-proteases sintetizadas como precursores inativos e estão envolvidas no processo de morte celular por apoptose (FULDA; DEBATIN, 2006). Existem duas principais vias do processo apoptótico, a via extrínseca mediada por receptores de morte, tendo como principal iniciadora a caspase 8; e a via intrínseca, a qual é desencadeada pelo aumento da permeabilidade mitocondrial, com liberação de moléculas pró-apoptóticas e citocromo c no

citoplasma, ativando a caspase 9, responsável pela iniciação dessa via (STRASSER *et al.*, 2000; GUPTA, 2003; PAPADOPOULOS, 2006).

O composto MFLC-1, após 24 horas de incubação, foi capaz de induzir a ativação das caspases iniciadoras 8 e 9. As caspases 8 foram ativadas de forma estatisticamente significativa apenas na maior concentração testada (1,4µg/mL), enquanto que as caspases 9 foram ativadas significativamente nas duas maiores concentrações (0,7 e 1,4µg/mL). Na maior concentração foi possível observar quantidades expressivas de células em apoptose e necrose, demonstrando que o composto induz uma morte celular por apoptose, seguida de uma possível necrose secundária. Além disso, foi possível determinar que a ativação das caspases iniciadoras 9 é mais expressiva e já se manifesta em concentrações menores, quando comparado à ativação da caspase 8, sugerindo que a via intrínseca, que conta com a participação da mitocôndria, seja a mais relevante para a iniciação do processo de morte induzido pelo composto.

Muitos estudos têm ressaltado o papel da mitocôndria durante o processo apoptótico (GREEN; REED 1998; SMAILI *et al.*, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2009). A redução do tamanho, aumento da densidade da matriz mitocondrial e a redistribuição das mitocôndrias nas células são algumas das principais alterações mitocondriais descritas durante a apoptose (DESAGHER; MARTINOU, 2000). O aumento da permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) é considerado um ponto irreversível na cascata de eventos que levam a ativação da morte celular através da via intrínseca apoptótica (GAO *et al.*, 2006; HSU; YEN, 2007; KROEMER *et al.*, 2007). O aumento do PMM leva a um mau funcionamento mitocondrial, resultando em um colapso do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e no extravasamento para o citosol de proteínas solúveis como, por exemplo, o citocromo *c* e o fator indutor de apoptose (VAN LOO *et al.*, 2002; GALLUZZI *et al.*, 2010). Depois de liberado, o citocromo *c* liga-se ao Apaf-1 (fator protease-ativador de apoptose 1) onde irá ocorrer a ativação da caspase 9 e formação do apoptossomo. Uma vez que as caspases iniciadoras forem ativadas, ocorrerá uma ativação das caspases efetoras 3 e 7 que irão dar prosseguimento a cascata de eventos da apoptose, clivando os substratos intracelulares executando o programa de morte celular.

Como era de se esperar, o composto MFLC-1, após incubado com células HL-60 por 24 horas, promoveu uma ativação das caspases efetoras 3 e 7, onde na maior concentração foi possível observar muitas células em processos de apoptose. Vários relatos na literatura reforçam a idéia de que o composto benzil-isotiocianato ativam caspases efetoras 3 e 7

(NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2005) e a formação de “DNA ladder”, indicativo de apoptose (MIYOSHI *et al.*, 2008). Srivastava *et al.* (2004) relatam o aumento da taxa BAX /Bcl-2 (moléculas pró-apoptóticas / anti-apoptóticas) em células de câncer de pâncreas humano (BxPC-3) tratadas com BITC. Miyoshi *et al.* (2004) demonstraram a ativação de caspase 3 em células Jukart incubadas com BITC; já Lui *et al.* (2003) demonstraram essa ativação em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço. Zhang *et al.* (2003) observaram ativação de caspases -8 e -9 em células de HL-60 tratadas com BITC. Nakamura *et al.* (2002), utilizando células epiteliais de fígado de rato, demonstraram que BITC é capaz de causar uma despolarização mitocondrial com posterior liberação do citocromo c, que por sua vez ativará caspase 9, responsável pela ativação de caspases efetoras 3 e -7. Esse dados reforçam a idéia de que a via intrínseca pode ser de fundamental importância para a indução de apoptose pelo composto MFLC-1, o qual possui um grupo benzil-isotiociano (BITC).

Apesar de todo o cenário bioquímico prever que as células HL-60 estejam morrendo por apoptose, pode-se também visualizar características morfológicas sugestivas de necrose induzidas pelo composto MFLC-1, principalmente na maior concentração testada. Isso pode ser explicado pelo envolvimento dos níveis de ATP intracelular. É sabido que todo o processo apoptótico requer energia, como a ativação de caspases, a hidrólise enzimática de macromoléculas, condensação da cromatina, a formação de “blebbings” e corpos apoptóticos, e uma deficiência de ATP nessas etapas impediria todo o processo. Além disso, os baixos níveis intracelulares de ATP livre podem permitir que estímulos apoptóticos direcionem as células para processos de morte por necrose (MIYOSHI *et al.*, 2008). Segundo Miyoshi *et al.*, 2008, altas concentrações de BITC rapidamente reduzem os níveis intracelulares de ATP, bloqueando a realização da apoptose. Além disso, a utilização de inibidores de caspases, Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp fluorometil-cetona), em células incubadas com BITC, não só diminuíram a porcentagem de células apoptóticas, mas também de necróticas. Esses resultados sugerem que a necrose induzida por BITC pode ter causas secundárias, conseqüência de apoptose inacabada, em vez de uma simples morte acidental por danos fisiológicos graves.

As células HL-60 quando pré-incubadas com α -tocoferol (40 μ M) e pós-tratadas com MFLC-1 não exibiram evidências bioquímicas de morte celular. Não se observou diferenças significantes entre o controle negativo e os grupos tratados em relação e a externalização da fosfatidilserina, nem tampouco a ativação de caspases iniciadoras, -8 e -9, e, como de se

esperar, a ativação de caspases efetoras. Esses dados demonstram a importância das espécies reativas de oxigênio, especialmente os produtos de peroxidação lipídica, uma vez que o α -tocoferol impede sua formação, na gênese do processo apoptótico deflagrado pelo tratamento com MFLC-1.

O estresse celular provocado por agentes físicos e químicos pode atingir um outro sensor de morte celular e de grande relevância, o DNA (ácido desoxirribonucléico). Uma lesão a este ácido nucléico, denominada de lesão genotóxica, perturba as funções que necessitam da integridade funcional desse polímero, tais como a transcrição e a replicação. Essas lesões são variadas e incluem quebra simples, quebra dupla, ligações cruzadas entre as fitas de DNA de moléculas diferentes, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e DNA e lipídeos, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações das bases, perda de bases, desaminações, depurinações (comum nas altas temperaturas que ocorrem durante a inflamação sistêmica) e oxidações das bases, entre outras (ROSA, 2008). Muitos agentes anti-neoplásicos que estão hoje na clínica são genotóxicos (ANDERSON; BERGER, 1994; DE MESA *et al.*, 2002) e apesar do risco que esses fármacos trazem, o benefício resultante da remissão ou cura da neoplasia é considerado. Com isso, a avaliação sistemática do potencial genotóxico de um composto citotóxico permite a identificação e o desenvolvimento de novos agentes menos tóxicos que podem substituir agentes mais genotóxicos nos esquemas de quimioterapia.

O teste do cometa foi primeiramente introduzido por Österling e Johanson (1984) como uma técnica de microeletroforese para visualização direta de danos no DNA. Essa técnica pode ser uma ferramenta valiosa para determinação dos mecanismos de genotoxicidade e reparo do DNA (FAIRBAIRN *et al.*, 1995), tendo sido bastante utilizado para se avaliar a segurança de novos fármacos (HARTMANN *et al.*, 2003), uma vez que é considerado um método bastante sensível, em relação à detecção da quebra de fitas simples ou dupla do DNA (GONTIJO; TICE, 2003).

As células HL-60 e CMSP quando incubadas com o composto MFLC-1 por 24 horas e submetidas ao ensaio do cometa, apresentaram um padrão de migração do DNA não usual, onde o aumento da concentração do composto diminuiu a migração do DNA, efeito contrário ao esperado, onde o aumento da concentração de compostos genotóxicos aumentam o dano ao DNA. Esse comportamento é típico de substâncias que causam ligações cruzadas entre DNA, chamadas de “cross-links”, e essas ligações podem ser DNA-DNA intercadeias, DNA-DNA intracadeias ou DNA-proteínas (MERK *et al.*, 2000).

Muitos quimioterápicos promovem a elevação dos níveis intracelulares de radicais livres, dentre eles as espécies reativas de oxigênio (EROs). Sabe-se que radicais livres de oxigênio podem atacar as bases do DNA ou resíduos de desoxirribose produzindo bases danificadas ou quebras nas fitas do DNA. Alternativamente, os radicais de oxigênio podem oxidar moléculas de lipídeos ou proteínas que geram intermediários com o DNA para a formação de adutos – modificações covalentes no DNA resultantes do ataque de compostos eletrofílicos bifuncionais. Tais adutos consistem na adição de um anel de 5 ou 6 membros com vários graus de insaturação às bases: adenina, citosina ou guanina (CARVALHO, 2001; HALLIWELL; ARUOMA, 1991; TAN *et al.*, 1999; MARNETT, 2000; SALMON *et al.*, 2004; ROWE *et al.*, 2008). Quando o alvo desses radicais são os lipídeos, ocorre então a oxidação através do processo de peroxidação lipídica, com a liberação de malondialdeído (MDA) e outros aldeídos e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (VOITKUM; ZHITKOVITH, 1999).

O MDA é amplamente estudado pelo fato de reagir com adenina, citosina e guanina, sobretudo com a última formando adutos do tipo pirimidopurinona (M₁dG). (CARVALHO, 2001). Já o 4-HNE, incluído quimicamente no grupo dos 4-hidroxicenais, é bastante reativo devido a presença de três grupos funcionais principais em sua estrutura: o grupo aldeído, a dupla ligação e o grupo hidroxila. A sua habilidade em reagir rapidamente com nucleófilos em pH fisiológico contribui significativamente para sua toxicidade. Assim, reagem com grupos tióis (-SH) presentes em GSH e proteínas e grupos amino presentes em bases de DNA, proteínas (como resíduos de lisina em lipoproteínas) e nos fosfolipídios fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. O padrão de danos induzidos no DNA por esses aldeídos é bem diversificado, uma vez que os adutos podem ser formados diretamente, através da reação direta dos aldeídos com as bases do DNA, ou indiretamente, através da via de seus derivados epoxidados (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Considerando que o composto MFLC-1 é capaz de induzir, como já descrito, oxidação de ácidos graxos poliinsaturados através da peroxidação lipídica, e que os seus produtos são altamente reativos às moléculas biológicas incluindo o DNA, pode-se sugerir que o padrão incomum de migração do DNA observado decorra da formação de *cross-links* (ligações cruzadas). Tanto o MDA quanto o 4-HNE podem reagir com DNA formando adutos, tornando-os agentes bifuncionais com características de reagir com DNA e proteínas formando complexos estáveis, como *cross-links* do tipo DNA-DNA e DNA-proteína. Porém, o cometa apesar de ser um teste sensível para a detecção de uma variedade de lesões no DNA, não detecta *cross-links* nas condições em que é usualmente utilizado. Com isso, modificações

do protocolo padrão foram propostas para a detecção dessas ligações cruzadas (MERK; SPEIT, 1999; MERK *et al.*, 2000), e dentre essas mudanças à utilização de proteinase K com a capacidade de clivar ligações envolvendo proteínas e dessa forma detectar o *cross-links* do tipo DNA-proteína (VOITKUM; ZHITKOVITH, 1999; BARKER *et al.*, 2005).

As células HL-60 e CMSP quando incubadas com o composto MFLC-1 por 24 horas e submetidas ao ensaio do cometa com adição da proteinase K, apresentaram um aumento da migração do DNA de maneira dose-dependente. Para as células HL-60, todas as concentrações mostraram diferenças significativas em relação ao índice de dano do controle negativo, já as CMSP mostraram diferenças significativas apenas nas maiores concentrações (0,7 e 1,4µg/mL). Contudo, o índice de dano nessas concentrações foram de menor intensidade que nas células HL-60, demonstrando que o composto MFLC-1 é mais genotóxico para as células leucêmicas testadas. De fato, esses resultados corroboram com o padrão de compostos que induzem formação de ligações cruzadas do tipo DNA-Proteína.

Nem sempre os efeitos observados *in vitro* podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, desta forma é necessário estudar o efeitos desse composto em sistemas biológicos completos. Animais de laboratório representam um poderoso sistema experimental para a compreensão da intricada patogênese do câncer em seres humanos. De fato, a maioria dos conceitos de tumorigênese atualmente aceitos é fortemente influenciada por modelos de desenvolvimento do câncer em camundongos, uma vez que esses organismos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos nossos (KAMB, 2005). Fundamentando no uso de tumores experimentais para a identificação de substâncias com potencial antitumoral, a atividade *in vivo* do composto MFLC-1 foi avaliada utilizando camundongos transplantados com Sarcoma 180. O Sarcoma 180 é um tumor original de camundongo e uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (LEE *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

Alguns relatos mostram a utilização de pasta e extratos de *Moringa oleifera* no tratamento de neoplasias. Evidências científicas sobre ervas utilizadas na medicina Ayurvedica, dentre elas *M. oleifera*, provou ter propriedades contra leucemia linfocítica epidermóide (KINJAVADEKARA, 1998; MURTHY, 2001). Pasta de sementes de *M. oleifera* preparada com soro tem sido utilizada para diversos tipos de câncer e para desintegrar cistos (BALACHANDRAN; GOVINDARAJAN, 2005). Bose *et al.* (2007) descrevem a *M. oleifera* como uma planta com potencial anticâncer utilizada pelo povo de Bangladesh. Já os isotiocianatos, dentre eles o benzil-isotiocianato, são muito utilizados como agentes químio-

protetores, induzindo mecanismos químicos de defesa contra agentes cancerígenos por aumentar a resistência celular. Os isotiocianatos atuam tanto como indutores das enzimas da Fase II do mecanismo de detoxificação celular, como também atuam inibindo as enzimas de Fase I, acentuando o processo de desintoxicação química (CASTRO *et al.*, 2008).

Os resultados do presente trabalho confirmam a atividade antitumoral *in vivo* do MFLC-1, que quando administrado por via intraperitoneal, inibiu em 55,11 e 71,58 % o crescimento do tumor nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente. Esses dados sugerem que esse composto contribua para as propriedades terapêuticas descritas para diferentes formulações de *M. oleifera*.

Na avaliação do potencial terapêutico de uma nova molécula, pode-se considerar tão importante ou mais a comprovação de sua segurança que da própria eficácia, uma vez que novas estratégias terapêuticas devem fundamentalmente incorporar uma melhoria nos efeitos tóxicos ou colaterais observados (MORAES *et al.*, 2003). Desta maneira, em paralelo a comprovação da atividade antitumoral *in vivo*, procedeu-se com uma avaliação toxicológica preliminar do MFLC-1, com base na análise das alterações histopatológicas em órgãos como fígado, baço e rins, e na alteração do peso corpóreo dos animais tratados.

Um dos aspectos mais fáceis e lógicos de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o ganho de peso corpóreo. O peso dos camundongos submetidos à administração intraperitoneal de MFLC-1 mostra que as doses de 25 e 50 mg/kg/dia diminuíram no peso dos animais, indicando a presença de efeitos deletérios. Outra evidência *in vivo* que aponta toxicidade de substâncias são as alterações pós-tratamento (aumento ou diminuição) no peso relativo dos órgãos (BARDOCZ *et al.*, 1996). Dos órgãos dissecados, o baço e o fígado apresentaram alteração de importância estatística ($p < 0,01$), manifestada por involução. Ao se observar a associação entre a toxicidade do composto MFLC-1 com sua ação antitumoral, acredita-se que o composto que possui atividade antitumoral seja também o responsável pela interferência no peso dos animais e dos órgãos fígado e baço, sugerindo uma relação direta entre atividade tóxica e antitumoral.

Os estudos histopatológicos dos animais tratados com MFLC-1 25 e 50 mg/kg/dia mostraram discreta hepatotoxicidade não dose-dependente representada por congestão venosa portal e esteatose microvesicular focal. A hiperplasia das células de Kupffer vista nesses animais pode ser explicada pela ativação de células mononucleadas envolvidas na degradação eritrocitária, na fagocitose de detritos celulares, absorção de ferro ou por focos hemorrágicos devido à congestão vascular. Além disso, esses macrófagos teciduais, quando ativados,

liberam citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas à toxicidade tecidual local ou sistêmica (KUMAR *et al.*, 2004). O fígado, como principal órgão metabolizador de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais, está sujeito a danos (LIEBLER; GUENGERICH, 2005). De qualquer modo, lesões hepáticas ocorridas na presença de agentes tóxicos são potencialmente reversíveis desde que a arquitetura do tecido conjuntivo se mantenha íntegra e capaz de favorecer a regeneração hepatocelular (KUMAR *et al.*, 2004).

A nefrotoxicidade causada pelo MFLC-1 nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia se deve à moderada tumefação do epitélio tubular e glomérulos hipocelulares. Discretas tumefações celulares foram vistos no grupo controle negativo e no tratado com 5-FU. A moderada tumefação do epitélio tubular indica leve toxicidade caracterizada por alterações incipientes e reversíveis, devido à arquitetura glomerular estar preservada.

A toxicidade ao baço causada pelo composto MFLC-1 foi bastante evidenciada na dose 50 mg/kg/dia, onde foram encontrados folículos linfóides pequenos, escassa polpa branca intercalada com áreas de congestão e pigmentos de hemossiderina; indicando um quadro de imunossupressão seguido de pequenos focos de hemorragia.

Apesar de terem sido encontradas alterações típicas de toxicidade, todas essas alterações são de caráter reversível, visto que não foram encontradas áreas de necrose tecidual em nenhum órgão analisado.

De qualquer modo, os resultados *in vivo* demonstram o potencial antitumoral do composto MFLC-1, chegando a inibir mais de 70% do crescimento tumoral sem causar graves danos tóxicos e irreversíveis nos animais. Segundo Ortholand *et al.* (2004) um produto natural não necessariamente precisa ser o melhor composto para o uso na clínica. Esses compostos podem servir como protótipo para o desenvolvimento de outros fármacos que apresentem melhores características, como o aumento da atividade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e principalmente o aumento da seletividade, assim como, da redução dos efeitos adversos.

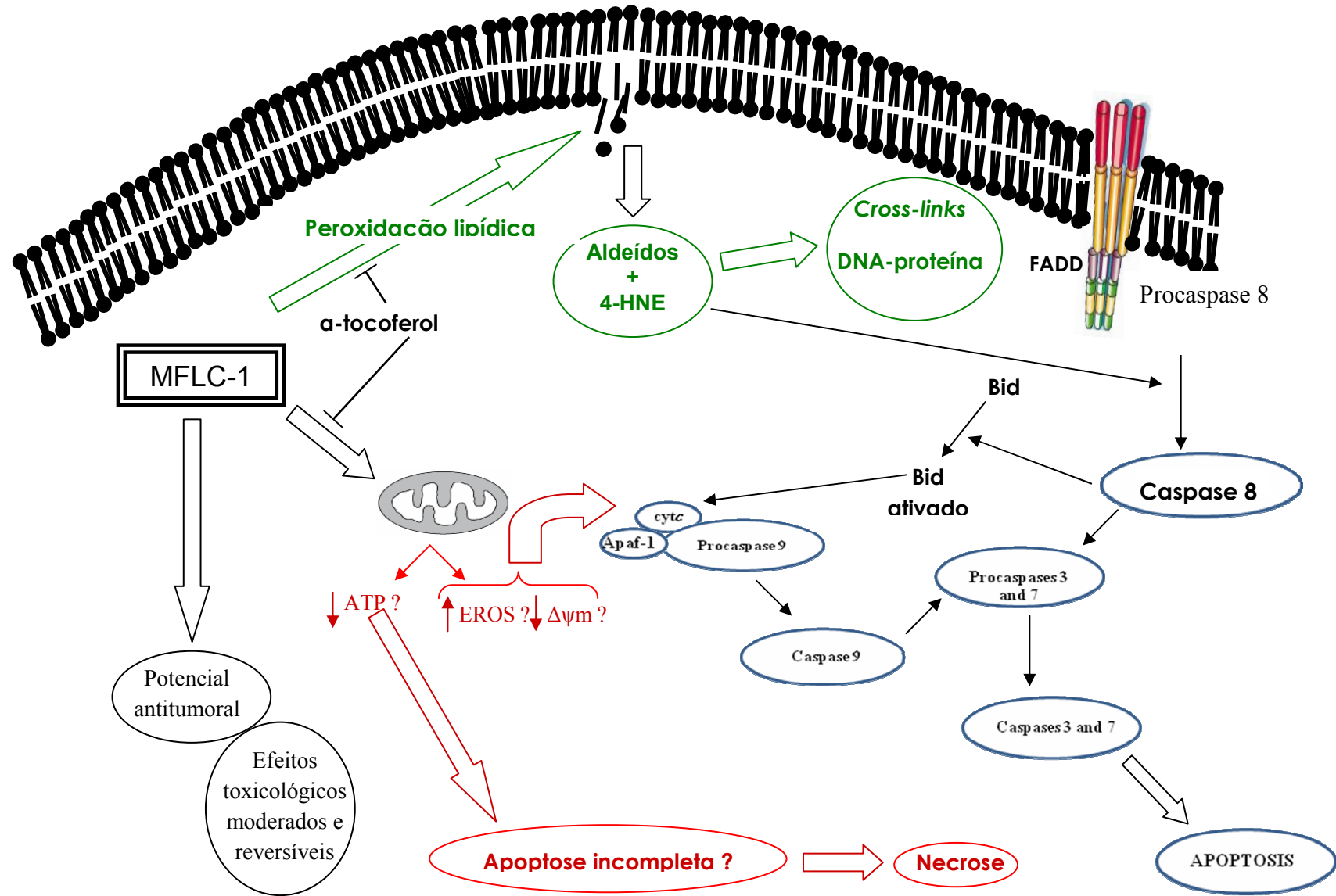


Figura 32: Resumo esquemático dos efeitos celulares do composto MFLC-1.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O composto 4-(4'-*O*-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)benzil isotiocianato (MFLC-1) isolado das flores de *Moringa oleifera* possui potente atividade citotóxica possuindo ligeira seletividade para células tumorais. Esse composto causa estresse oxidativo induzindo peroxidação lipídica, e os produtos dessa peroxidação lipídica, por serem citotóxicos, causam diminuição do número de células e da viabilidade celular, aumento da fragmentação do DNA, externalização de fosfatidilserina e ativação de caspases iniciadoras e efetoras. Esse produtos também causam ligações cruzadas do tipo DNA-proteína, e por esse motivo, o composto teste é genotóxico para células HL-60 e CMSP. Além disso, a redução de 71,58 % no crescimento tumoral *in vivo*, pelo MFLC-1, e a moderada toxicidade sistêmica, ressaltam o potencial antitumoral desse composto.

REFERÊNCIAS

- AL-GENDY, A. A.; EL-GINDI, O. D.; HAFEZ, A. L. S.; ATEYA, A. M. Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). **Food Chem.**, v.118, p.519-534, 2010.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effects of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Anim. Reprod.**, v.87, p.321-337, 2005.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p.118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **The history of cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_6x_the_history_of_cancer_72.asp?sitearea=&level=>. Acesso em: 30 June 2010.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261-274, 2003.
- ANDERSON, D.; YU, T.W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.**, 307, 261 - 271, 1994.
- ANDERSON, R.D.; BERGER, N.A. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. **Mutat. Res.**, v.309, p.109-142, 1994.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. **Phytother. Res.**, v.21, p.17-25, 2007.
- AOSHIBA, K.; TAMAOKI, J.; NAGAI, A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v.281, p.1392-1401, 2001.
- BALACHANDRAN, P.; GOVINDARAJAN, R. Cancer - an ayurvedic perspective. **Pharmacol. Res.**, v.51, p.19-30, 2005.
- BALADRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. **Human medicinal agents from plants**. Washington: Am. Chem. Soc. Books, 1993. (ACS Symposium Series, n. 534).
- BALDUCCI, L. Molecular insight in cancer treatment and prevention. **The Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, p. 1329-1336, 2007.

- BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A.; FRANKLIN, M. F.; CARVALHO, A. F. F. U. The effect of phytohaemagglutinin on the growth, body composition, and plasma insulin of the rat at different dietary concentrations. **Br. J. Nutr.**, v.76, p.613-626, 1996.
- BARKER, S.; WEINFELD, M.; MURRAY, D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. **Mutat. Res.**, v.589, p.111-135, 2005.
- BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DIANZANI, M. U. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. **Mol. Aspects Med.**, v.29, p.1-8, 2008.
- BENNETT, R.N.; MELLON, F.A.; FOIDL, N.; PRATT, J.N.; DUPONT, S. PERKINS, L.; KROON, P.A. Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3546-3553, 2003.
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v.21, p. 167-223, 2001.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from Piper Species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 60, p. 539-543, 2005.
- BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 599-607, 2008.
- BHEEMREDDY, R. M.; JEFFERY, E. H. Glucosinolates. **Nutritional Oncology**. 2nd ed. London: Elsevier, 2006. cap. 34.
- BOSE, C. K. Possible Role of *Moringa oleifera* Lam. Root in Epithelial Ovarian Cancer. **Med. Gen. Med.**, v.9, p.26-31, 2007.
- BOYLE, P.; LEVIN, B. World Cancer Report 2008. , Lyon: World Health Organization / International Agency for Research on Cancer, 2008.
- BRADY, H.J.M. **Apoptosis Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.
- BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.

CARVALHO, V. M. **Adutos de DNA gerados por produtos da lipoperoxidação:** caracterização, detecção, incorporação, em oligonucleotídeos e implicações biológicas. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.-L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v.23, p. 2825–2837, 2008.

CASTRO, I. M.; ANJOS, M. R.; OLIVEIRA, E. S. Determinação de isotiocianato de benzila em *Carica papaya* utilizando cromatografia gasosa com detectores seletivos. **Quím. Nova**, v. 31, p.1953-1959, 2008.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **J. Bras. Pneumol.**, v.35, p.1227-1237, 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, v.30, p. 441-449, 2007.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. **AAPS J.**, v.8, p.239-243, 2006.

CHIPUK, J.E.; BOUCHIER-HAYES, L.; GREEN, D.R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death Different.**, v.13, p.1396-1402, 2006.

CHUANG, P.; LEE, C.; CHOU, J.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.; CHEN, H. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p.232-236, 2007.

COAST, G. J.; FREYVERT, Y.; VAFIADIS, A.; SANTIAGO, Y.; MILLER, J.C.; REBAR, E.; COLLINGWOOD, T.N.; SNOWDEN, A.; GREGORY, P.D. BAK and BAX Deletion Using Zinc-Finger Nucleases Yields Apoptosis-Resistant CHO Cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 105, p. 330-340, 2010.

COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**, v.270, p.347-349, 1977.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 58, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.21–30, 2005.

CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. (Ed.). **Anticancer Agents from Natural Products**. Boca Raton, FL: Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. **Ann. Appl. Biol.**, v.143, p.127-133, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.72-79, 2005.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Cell Biol.**, v. 10, p.369-377, 2000.

DE MESA, R.L.; DE CERAIN; SALSAMENDI, A.L.; ARIZNABARRETA, L.S.; AGABEYNZANO, M.J.C.; PATINO-GARCIA, A. Measurement and analysis of the chemotherapy-induced genetic instability in pediatric cancer patients. **Mutagenesis**, v.17, p.171-175, 2002.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol. Pathol.**, v.35, p.495-516, 2007.

FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, M. A. A.; KAMAKURA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R. Seleção por meios de células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.62, p.217-224, 1990.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees Life J.**, p.1-5, 2005.

FAHY, J.; DUFLOS, A.; RIBET, J.P.; JACQUESY, J.C.; BERRIER, C.; JOUANNETAUD, M.P.; ZUNINO, F. Vinca alkaloids in superacidic media: a method for creating a new family of antitumor derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, v.119, p.8576-8577, 1997.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37 - 59, 1995.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A. H. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, v.38, p.957-963, 1995.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SALEEM, R.; AFTAB, K.; SHAHEEN, F.; GILANI, A. H. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. **Planta Medica**, v.64, p.225-228, 1998.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. F. U.; SOUSA, D. F.; MAGALHÃES, J. F.; MARTINS, A. R.; MARTINS, A. M. C.; QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Rev. Eletr. Pesqui. Méd.**, v.1, p. 45-53, 2007.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Rev. Nutr.**, v.21, p.431-437, 2008.

- FLEMING, S. **The molecular biology of cancer: the basics.** *Surgery*, Oxford, p. iii-vi, 2003.
- FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v.25, p.4798-4811, 2006.
- GAGO-DOMINGUEZ, M.; JIANG, X.; CASTELAO, J. E. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Res.**, v.9, p.1-11, 2007.
- GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Ciênc. Agron.**, v.37, p.106-109, 2006.
- GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; KROEMER, G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1787, p.402-413, 2009.
- GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; VITALE, I.; RIGONI, A.; VACCHELLI, E.; MICHAUD, M.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial gateways to cancer. **Mol. Aspects Med.**, v.31, p.1-20, 2010.
- GAO, S.Y.; WANG, Q.J.; JI, Y.B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and $[Ca^{2+}]_i$ in the cells. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.3359-3367, 2006.
- GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet fed wistar rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.69, p.21-25, 2000.
- GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; HENRIKSSON, H.; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Res.**, v.39, p.2338-2344, 2005.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 247-275.
- GREEN, D.R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **J. Clin. Invest.**, v.115, p.2610-2617, 2005.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v.28, p. 1309- 1312, 1998.
- GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; HARUKUNI, T.; NISHINO, H. An antitumor Promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutat. Res.**, v.440, p.181-188, 1999.
- GUPTA, S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Life Sci.**, v. 69, p.2957-2964, 2003.
- HALL, M.A.; CLEVELAND, J.L. Clearing the TRAIL for Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v.12, p.5-6, 2007.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, v.281, p.9-19, 1991.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **J. Clin. Nutr.**, v.57, p.715S-725S, 1993.

HANAHAH, D.; WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57 – 70, 2000.

HAO, Z.; MAK, T.W. Type I and Type II Pathways of Fas-mediated Apoptosis Are Differentially Controlled by XIAP. **J. Mol. Cell Biol. Res. Highlight**, p.1-2, 2009.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p.45-51, 2003.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Disc. Today**, v.13, p.894-901, 2008.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p.1730-1736, 2007.

HSU, R.; MIDCAP, S.; ARBAINSY, A. H.; WITTE, L.D. **Moringa Oleifera**: Medicinal and socio-economic uses. National Herbarium Leiden, International Course on Economic Botany, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2010**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. **J. Food Composition Analysis**, v.19, p.544-555, 2006.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, p.161-165, 2005.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.84, p.105-108, 2003.

KARADI, R. V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R.; SAVADI, R. V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p.306-311, 2006.

KASSIE, F.; POOL-ZOBEL, B.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER. Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent. **Mutagenesis**, v.14, p.595-603, 1999.

KIM, J.; XU, W.; REED, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat. Rev.**, v.7, p.1013-1030, 2008.

KINGSTON, D.G.I. Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. **J. Nat. Prod.**, v.72, p. 507-515, 2009.

KINJAVADEKARA, R. S. **Astanga sangraha**. New Delhi: Uppal Publishing House, 1998.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The Comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KNOWLES, M.A.; SELBY, P.J. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. 4th ed. New York: Oxford University Press Inc., 2005.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M.E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Different.**, v.12, p. 1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, p. 472-482, 2008.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v.44, p.205-221, 2008.

KRZAKOWSKI, M.; DOUILLARD, J.; RAMLAU, R.; JASSEM, J.; SZCZESNA, A.; ZATLOUKAL, P.; PAWEL, J.; HANSEN, O.; SUN, X. Phase III study of vinflunine versus docetaxel in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) previously treated with a platinum-containing regimen. **J. Clin. Oncol.**, v.25, p.7511, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**. 7th ed. **Cidade**: WB Saunders, 2004.

LAKO, J.; TRENERRY, V. C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chem.**, v.101, p.1727-1741, 2007.

LAMPRONTI, I.; KHAN, M. T. H.; BORGATTI, M.; BIANCHI, N.; GAMBARI, R. Inhibitory Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts on Interactions between

Transcription Factors and Target DNA Sequences. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine - eCAM**, v.5, p.303-312, 2008.

LEE, Y. L.; KIM, H. J.; LEE, M. S.; KIM, J. M.; HAN, J. S.; HONG, E. K.; KWON, M. S.; LEE, M. J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Anim.**, v.52, p.371-375, 2003.

LEVINE, B. Autophagy and câncer. **Cell Biol.**, v. 446, p. 745-747, 2007.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.

LIEBLER, D. C.; GUENGERICH, F. P. Elucidating Mechanisms of Drug-induced Toxicity. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.4, p.410-420, 2005.

LING, Y.; EL-NAGGAR, A.K.; PRIEBE, W.; PEREZ-SOLER, R. Cell Cycle-Dependent Cytotoxicity, G2/M Phase Arrest, and Disruption of p34cdc2/Cyclin B1 Activity Induced by Doxorubicin in Synchronized P388 Cell. **Mol. Pharmacol.**, v.49, p.832-841, 1996.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.37, p.293-303, 2001.

LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYONTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAK, K. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against *herpes simplex virus* type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral Res.**, v.60, p.175-180, 2003.

LOS M.; BUREK, C. J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as target for drug design. **Drug Discov. Today**, v.8, p.67-77, 2003.

LOUREIRO, A. P. M.; MASCIO, P. D.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quím. Nova**, v.25, p.777-793, 2002.

LUI, V. W.; WENTZEL, A. L.; XIAO, D; LEW, K. L.; SINGH, S. V.; GRANDIS, J. R. Requirement of a carbon spacer in benzyl isothiocyanate-mediated cytotoxicity and MAPK activation in head and neck squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v.24, p.1705-1712, 2003.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v.136, p. 823-837, 2009.

MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v.146, p.3-15, 1995.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **Plos Medicine**, v.3, p.2011-2030, 2006.

MAGALHÃES, H. I. F.; VERAS, M. L.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.58, p.235-241, 2006.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera*. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.63 p.211-228, 1996.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev.**, v.2, p.143-148, 2002.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G.R.; WALKUP, M.; HE, Z.; STURGIS, L.; KAGAN, C.; MANNUCCI, R.; NICOLETTI, I.; TENG, B.; DENNER, L. Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 382-390, 1999.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361–370, 2000.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and abl. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MEHMET, H. Apoptosis: caspase Wnds a new place to hide. **Nature**, v. 403, p. 29 – 30, 2002.

MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A. H.; BAFNA, P. A.; GULATI, O. D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **J. Ethnopharmacol.**, v.86, p.191-195, 2003.

MELÉNDEZ, A.; NEUFELD, T.P. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. **Development**, v. 135, p. 2347-2360, 2008.

MELLIER, G.; HUANG, S.; SHENOY, K.; PERVAIZ, S. TRAILing death in cancer. **Mol. Aspects Med.**, v.31, p.93-102, 2010.

MERK, O.; REISER, K.; SPEIT, G. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. **Mutat. Res.**, v.471, p.71-80, 2000.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of Crosslinks the Comet Assay in Relationship to Genotoxicity and Cytotoxicity. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.33, p.167-172, 1999.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.

Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MIYOSHI, N.; UCHIDA K.; OSAWA T.; NAKAMURA, Y. A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrest and apoptosis: involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation. **Cancer Res.**, v.64, p.2134–2142, 2004.

MIYOSHI, N.; WATANABE, E.; OSAWA, T.; OKUHIRA, M.; MURATA, Y.; OHSHIMA, H.; NAKAMURA, Y. ATP depletion alters the mode of cell death induced by benzyl isothiocyanate. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1782, p.566–573, 2008.

MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; LOTUFO, L. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A. Avaliação Clínica da Eficácia e Segurança de Fitoterápicos no Brasil. **Arq. Bras. Fitomed. Científ.**, v.1, p.30-38, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MURATA, M.; YAMASHITA, N.; INOUE, S.; KAWANISHI, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. **Free Rad. Biol. Med.**, v.28, p.797-805, 2000.

MURTHY, K. R. S. **Bhavaprakasa of bhavamisra**. Varanasi: Krishnadas Academy, 2001.

NAGANE, M.; HUANG, H.-J.S.; CAVENEE, W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. **Apoptosis**, v.6, p.191-197, 2001.

NAKAMURA, Y.; KAWAKAMI, M.; YOSHIHIRO, A.; MIYOSHI, N.; OHIGASHI, H.; KAWAI, K.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. Involvement of the Mitochondrial Death Pathway in Chemopreventive Benzyl Isothiocyanate-induced Apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.8492-8499, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as drug over the past 25 years. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.461-477, 2007.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 1028-1042, 1999.

NUÑEZ, G.; BENEDICT, M.A.; HU, Y.; INOHARA, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, v.17, p.3237-3245, 1998.

OBERST, A.; BENDER, C.; GREEN, D.R. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. **Cell Death Differ.**, v.15, p.1139-1146, 2008.

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

OPALKA, B.; DICKOPP, A.; KIRCH, H.C. Apoptotic genes in cancer therapy. **Cells Tissues Organs**, v.172, p.126-132, 2002.

ORMEROD, M. G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v.265, p.73–80, 2002.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Op. Chem. Biol.**, v.8, p.271 - 280, 2004.

PAPAC, R.J. Origins of Cancer Therapy. **J. Biol. Med.**, v. 74, p. 391-398, 2001.

PAPADOPOULOS, K. Targeting the Bcl-2 family in cancer therapy. **Semin. Oncol.**, v. 33, p.449-456, 2006.

PAZDUR, R.; KUDELKA, A. P.; KAVENAGH, J. J.; COHEN, P. R.; RABER, M. N. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). **Cancer Treat. Rev.**, v.19, p.351-86, 1993.

PAILARD, F.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J.A. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol. in Vitro**, v.13, p.693–700, 1999.

PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A.; MORAIS, M. E. A.; MORAIS, M. O., Anticancer potential of northeast brazilian plants. In: KHAN, M. T. H.; ATHER, A. (Ed.). **Advances in Phytomedicine: Leads molecules from natural products: discovery and new trends**. Amsterdam: Elsevier, 2006. v. 2, p. 197-211.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 187-191, 2000.

PHILLIP, K.; BASTIANS, H. Mitotic Drug Targets. **J. Cell. Biochem.**, 2010.

PIZZIMENTI, S.; TOALDO, C.; PETTAZZONI, P.; DIANZANI, M. U.; BARRERA, G. The “two-faced” effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-Hydroxynonenal in the Hallmarks of Câncer. **Cancers**, v.2, p.338-363, 2010.

PROSKURYAKOV, S.Y.; KONOPLYANNIKOV, A.G.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res.**, v.283, p.1-16, 2003.

REED, J.C. Mechanisms of Apoptosis. **Am. J. Pathol.**, v.157, p.1415-1430, 2000.

REED, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. **Trends Mol. Med.**, v.7, p.314-319, 2001.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist**, v.11, p.342-357, 2006.

RIEGER, P.T. The Biology of Cancer Genetics. **Semin. Oncol. Nurs.**, v.20, p.145-154, 2004.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.1, p.364–369, 2001.

RODRIGUES, F. A. R. **Avaliação da atividade citotóxica de um heterosídeo monoacetilado de benzilamina isolado das flores de *Moringa oleifera* (Moringaceae) Lam.** Monografia (Conclusão de Curso) - Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROSA, R. M. **Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico do diseleneto de difenila em células de mamíferos.** Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ROWE, L. A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P. W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radic. Biol. Med.**, v.45, p.1167-1177, 2008.

RUIZ-VELA, A.; OPFERMAN, J.T.; CHENG, E.H.-Y.; KORSMEYER, S.J. Proapoptotic BAX and BAK control multiple initiator Caspases. **EMBO Reports**, v.6, p.379-885, 2005.

SABALE, V.; PAEL, V.; PARANJAPE, A.; ARYA, A.; SAKARKAR, S. N.; SABALE, P.M. *Moringa oleifera* (Drumstick): An Overview. **Pharmacognosy Rev.**, v.2, p.7-13, 2008.

SALMON, T. B.; EVERT, B. A.; SONG, B.; DOETSCH, P. W. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v.32, p.3712–3723, 2004.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Res.**, v.39, p.975-980, 2005.

SANTOS, R. P. B. **Estudo estrutura-atividade do Taxol e derivados.** Tese (Doutorado) - Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacol. Ther.**, v. 1, p. 411 - 435, 1977.

SERGEY, Y.A.P.; ANATOLI, G.K.; GABAI, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp. Cell Res.**, v.283, p.1-16, 2003.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicologia.** Porto Alegre: Alcance, 2003.

SINGH, N.P.; MACCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184 - 191, 1988.

SINGH, R.; GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. **Cell Division**, v.5, p.1-12, 2010.

SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p.183-190, 2003.

SPEIT, G.; FRÖHLER-KELLER, M.; SHÜTZ, P.; NEUSS, S. Low sensitivity of the comet assay to detect acetaldehyde-induced genotoxicity. **Mutat. Res.**, v.657, p.93-97, 2008.

SPEIT, G.; SCHÜTZ, P.; HÖGEL, J.; SCHMID, O. Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells. **Mutagenesis**, v.22, p. 387-394, 2007.

SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S. V. Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. **Carcinogenesis**, v.25, p.1701–1709, 2004

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

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p.217-245, 2000.

SUH, S.-J.; MOON, S.-K.; KIM, C.-H. *Raphanus sativus* and its isothiocyanates inhibit vascular smooth muscle cells proliferation and induced G1 cell cycle arrest. **Int. Immunopharmacol.**, v.6, p.854-861, 2006.

TAN, X. Z.; GROLLMAN, A. P.; SHIBUTANI, S. Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v.20, p.2287-2292, 1999.

TAHILIANI, P.; KAR, A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. **Pharmacol. Res.**, v.41, p.319-323, 1999.

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

TSOU, M.-F.; PENG, C.-T.; SHIH, M.-C.; YANG, J.-S.; LU, C.-C.; CHINAG, J.-H.; WU, C.-L.; LIN, J.-P.; LO, C.; FAN, M.-J.; CHUANG, J.-C. Benzyl isothiocyanate inhibits murine WEHI-3 leukemia cells *in vitro* and promotes phagocytosis in BALB/c mice *in vivo*. **Leukemia Res.**, v.33, p.1505–1511, 2009.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ.**, v.15, p.1153-1162, 2008.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with

more than one bullet. **Cell Death Differ.**, v.9, p.1031-1042, 2002.

VAUX, D.L.; SILKE, J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.304, p.499-504, 2003.

VERHOEVEN, D. T. H.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A.; VAN POPPEL, G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. **Chemico-Biological Interactions**, v. 103, p.79-129, 1997.

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

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Methods**, v.243, p.167-190, 2000.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

VISANJI, J. M.; DUTHIE, S. J.; PIRIE, L.; THOMPSON, D. G.; PADFIELD, P. J. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induced G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. **J. Nutr.**, v.134, p.3121-3126, 2004.

VOITKUM, V.; ZHITKOVITH, A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. **Mut. Res.**, v.424, p.97-106, 1998.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v.51, p.239-254, 1996.

WEINBERG, R.A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WOJEWODZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutat. Res.**, v. 518, p. 9 – 20, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Statistics and Informatics Department. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/index.html>. Acesso em: 1 jul. 2010.

WOZNIAK, K.; BLASIAK, J. Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride. **Mutat. Res.**, v.514, p. 233-243, 2002.

WU, X.; KASSIE, F. MERSCH-SUNDERMANN, V. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. **Mutat. Res.**, v. 589, p. 81-102, 2005.

ZAMAI, L.; CANONICO, B.; LUCHETTI, F.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GUIDOTTI, L.; CAPPELLINI, A.; CUTRONEO, G.; VITALE, M.; PAPA S. Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptoses on Adherent Cells. **Cytometry**, v.44, p.57-64, 2001.

ZHANG, J.-G.; TIRMENSTEIN, M. A.; NICHOLLS-GRZEMSKI, F. A.; FARISS, M. W. Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and – independent cell death: protective role of antioxidants. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.393, p.87-96, 2001.

ZHANG, R.; LI, Y.; CAI, Q.; LIU, T.; SUN, H.; CHAMBLESS, B. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.41, p.257-267, 1998.

ZHANG, Y.; TANG, L.; GONZALEZ, V. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. **Mol. Cancer Therap.**, v.2, p.1045-1052, 2003.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, DR. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol. Therap.**, v.92, p.57-70, 2001.

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

Anexos

Anexo A – Resultados prévios do composto MFLC-1

Anexo B - Atividade Citotóxica e Hemolítica

Tabela 6 – Atividade citotóxica *in vitro* da MFLC-1 isolado da flor de *Moringa oleifera* frente às linhagens tumorais humanas de leucemias (HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-435), carcinoma de cólon (HCT-8) e glioblastoma (SF-295); e células normais de linfócitos periféricos humanos (PBMC) – tempo de incubação de 72h.

Composto	HL-60	K-562	MDA-MB 435	HCT-8	SF-295	PBMC
	CI ₅₀ [µg/mL]*					
MFLC-1	1,32	2,87	3,11	3,38	2,66	3,26
	0,99-	2,11-	2,86-	2,88-	2,27-	3,05-
	1,78	3,90	3,39	3,96	3,11	3,48
DOX	0,02	0,14	0,22	0,01	0,23	0,97
	0,01-	0,09-	0,18-	0,01-0,02	0,1-	0,52 –
	0,02	0,23	0,26		0,25	1,80

* Valores originados de experimentos independentes (n = 2) e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95 %.

Os estudos de atividade hemolítica foram feitos usando suspensão de eritrócitos de camundongos a 2 %. MFLC-1 não foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (50 µg/mL), nos tempos de 1h, 2h e 4h de incubação, sugerindo que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular.

Tabela 7 – Atividade citotóxica *in vitro* da MFLC-1 isolado da flor de *Moringa oleifera* frente à linhagem tumoral humana de leucemia HL-60 – tempo de incubação de 24h.

Composto	HL-60
	CI ₅₀ [µg/mL]*
MFLC-1	1,44
	1,31–1,62
DOX	0,018
	0,011–0,024

* Valores originados de experimentos independentes (n = 2) e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95 %.

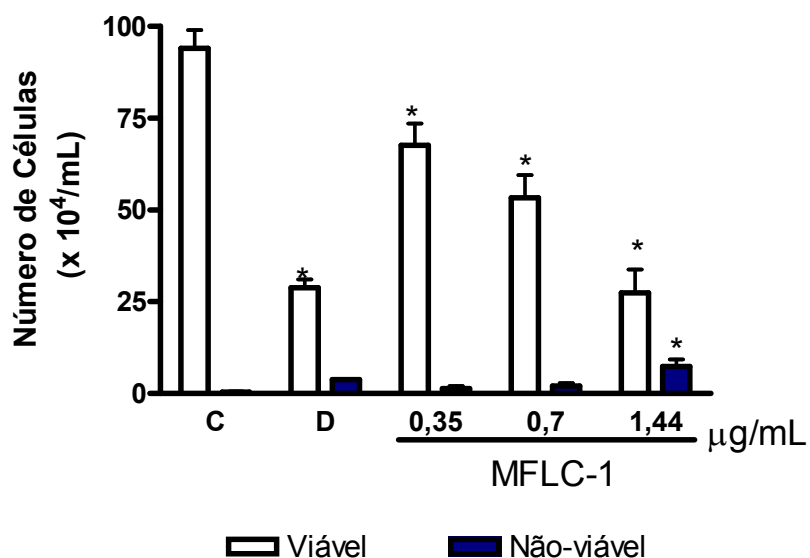
Anexo C - Viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán

Figura 33 – Efeito da MFLC-1 na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p < 0,01 comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls test.

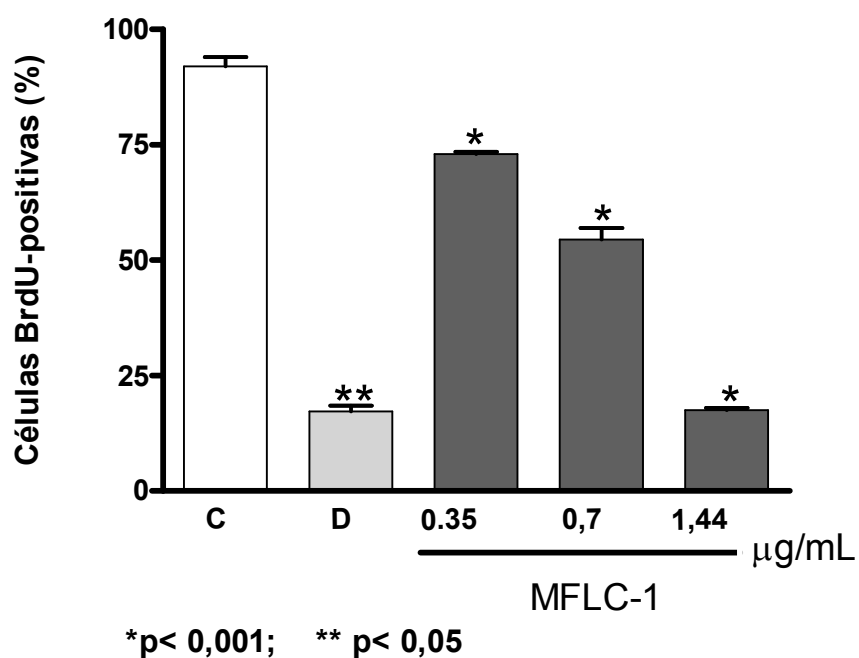
Anexo D - Inibição da síntese de DNA através da incorporação de BrdU

Figura 34 – Inibição da síntese de DNA pela MFLC-1, expresso em número de células, avaliada através da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 após 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem à média ± E.P.M. de

experimentos independentes ($n = 2$). * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$, ANOVA, seguida de Student Newman Keuls.

Anexo E - Análise morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

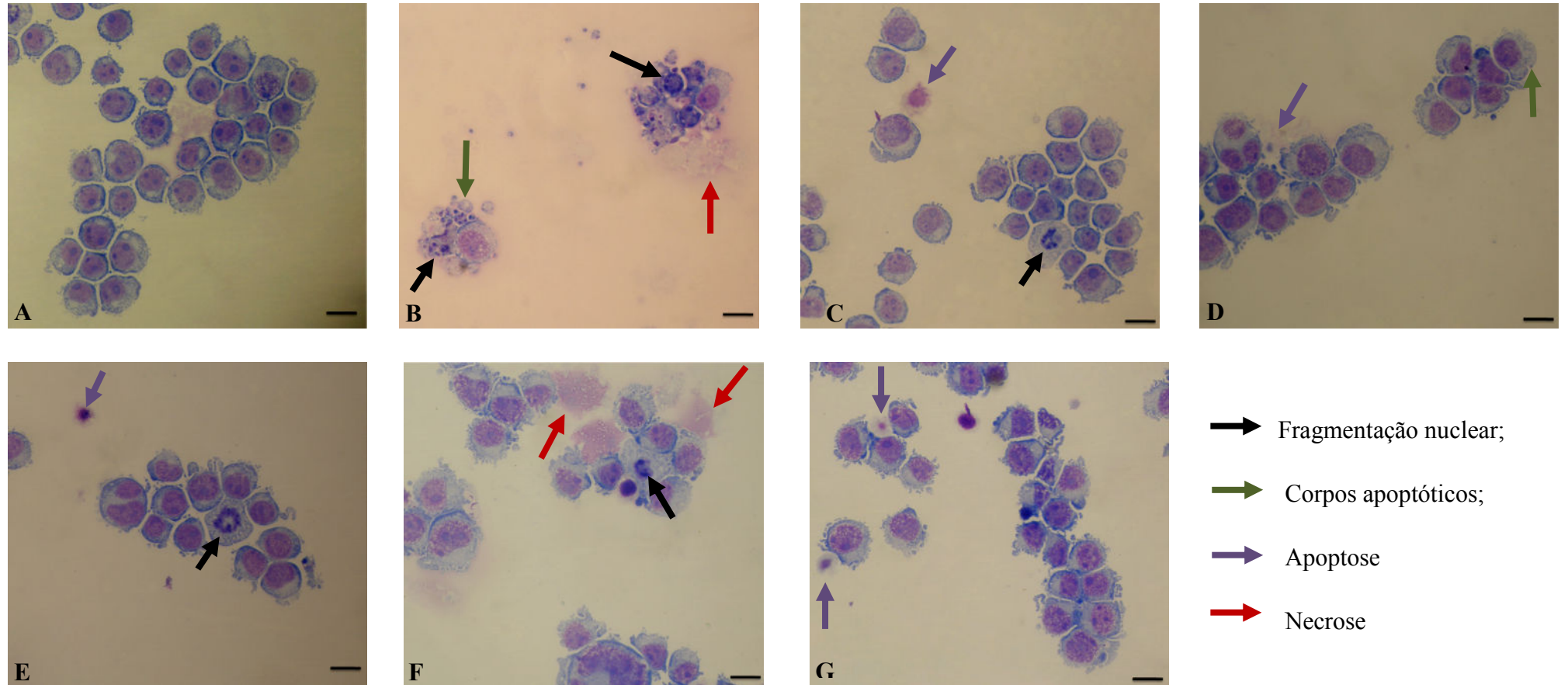


Figura 35 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorubicina (0,3 µg/ml) foi usado como controle positivo (B). (C) corresponde ao tratamento com MFLC-1 na concentração de 0,35 µg/ml. (D) e (E) ao tratamento na concentração de 0,7 µg/ml. (F) e (G) ao tratamento na concentração de 1,44 µg/ml. Aumento = x 400. Escala: 30 µm.

Anexo F - Coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

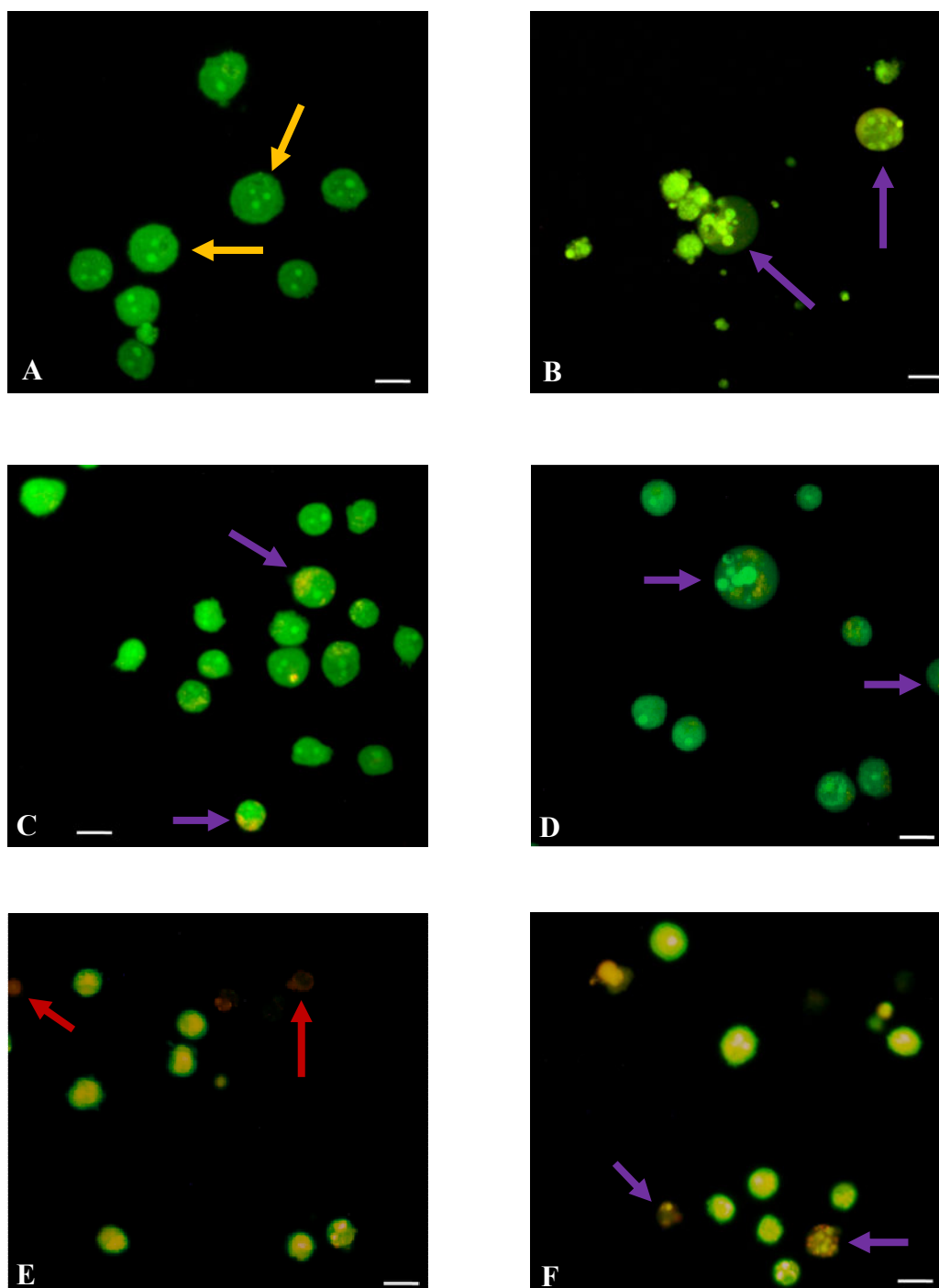


Figura 36 – Morfologia de células da linhagem leucêmica HL-60 após 24 h de incubação, coradas por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina e visualizadas por microscopia de fluorescência. O controle negativo (A) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (B). (C), (D) e (E, F) correspondem ao tratamento com o composto MFLC-1 nas concentrações de 0,35; 0,7 e 1,44 µg/mL, respectivamente. Aumento = 400x. Escala: 30 µm. Células viáveis; Células apoptóticas e Células Necróticas.

Anexo G - Avaliação de células viáveis por exclusão de Azul de Tripán

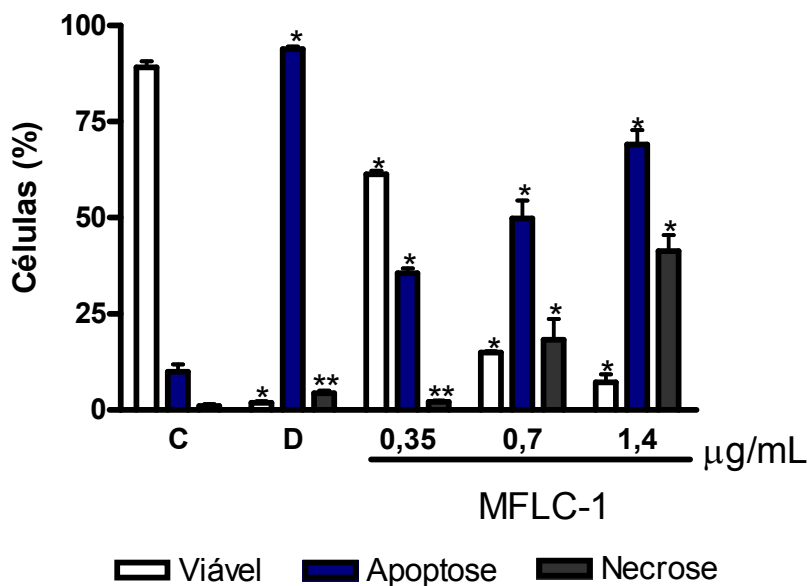


Figura 37 – Atividade da MFLC-1 nas concentrações de 0,35; 0,7 e 1,4 µg/mL, expresso em percentual (%), sobre os eventos celulares (viabilidade, apoptose e necrose) avaliada em células leucêmicas HL-60 e analisada por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina após de 24 h de incubação. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 1,6 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usado como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p < 0,001 e ** p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls.

Anexo H – Equipamentos e Soluções, Reagente e Fármacos

Anexo I - Equipamentos:

- Agitador de placa MLW Modelo Thys 2;
- Balança analítica, GEHAKA AG200;
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLTA;
- Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206;
- Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403;
- Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin;
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini;
- Cuba de eletroforese horizontal, BioRad;
- Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count;
- Estufa de secagem e esterilização, FANEM, MOD. 315SE;
- Fluxo laminar VECO;
- HTS (*High Throuput Screening*, BIOMECK 3000) Beckman Coulter;
- Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow;
- Microondas, Panasonic;
- Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41;
- Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab;
- Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot;
- pHmetro Micronal B474;
- Pipetas automáticas, Gilson.

Anexo J - Soluções, Reagente e Fármacos:

- Ácido acético P.A. (MERCK);
- Ácido clorídrico 0,1 N (VETEC);
- Agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen);
- Agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen);
- Álcool etílico P.A. (VETEC);
- Cloreto de sódio (VETEC);
- DMSO (VETEC);
- Doxorrubicina (ZODIAC);
- EDTA (PROQUÍMICOS);
- Entellan (MERCK);
- Fitohemaglutinina (CULTILAB);
- Formaldeído (VETEC);
- Hidróxido de Sódio (VETEC);
- Histopaque (SIGMA);
- Iodeto de propídeo (SIGMA);
- Meio de cultura celular RPMI 1640 (INVITROGEN);
- Metanol P.A. (MERCK);
- NaOH 10M (VETEC);
- Penicilina-estreptomicina (CULTILAB);
- Peróxido de Hidrogênio (VETEC);
- Ringer-lactato (Cloreto de Sódio = 0,600g, Cloreto de Potássio = 0,030g, Cloreto de Cálcio 2H₂O = 0,020g, Lactato de Sódio = 0,30g, Água q. s. p. 100 mL);
- Rodamina 123 (SIGMA);
- Solução de Neutralização (Tris 0,4 M, pH = 7,5);
- Solução de Lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH= 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %);
- Solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (PBS) (SIGMA);
- Solução de KCl 0,075 M em água destilada (LABSYNTH);
- Solução de Triton X-100 a 1% (Vetec);
- Solução salina 0,9% (LABSYNTH);

- Solução tampão fosfato pH 6,8 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, LABSYNTH);
- Soro fetal bovino (CULTILAB);
- Tripsina 0,25% (CULTILAB);
- Tris (PROQUÍMICOS);
- Xilol 10%;
- 5-Fluoracil, 25mg/Kg (ICN FARMACÊUTICA).