

## BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE: AS FLORESTAS BRASILEIRAS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS COM PROPRIEDADES ANTITUMORAIS

WENDEL MATTOS POMPILHO<sup>1\*</sup>, FRANZ VIANA BORGES<sup>2</sup> & EMÍLIO DE CASTRO MIGUEL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Biologia/UFES, Alto Universitário, caixa postal 16, s/n. 29500-000 - Alegre, ES – Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer /UENF, Av. Alberto Lamego, 2000, Horto. 28013-600 - Campos dos Goytacazes, RJ – Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Morfologia, Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins /UFES, Av. Marechal Campos, Maruípe. 29043-900 - Vitória ES - Brasil

### ABSTRACT

Cancer main feature is the abnormal, diffuse and uncontrolled cell growth. It is the major cause of mortality all over the world and, in this context, every day the number of papers reporting the importance of screening pharmacologically active molecules derived from plants increases. Therefore, in this paper we present a literature review on the importance of plants as source of natural products, active in combating and treating cancer as well as cultivation techniques of tumor cells used in this screening process.

Key-Words: Cell Culture, Cancer, Medicinal Plants.

### INTRODUÇÃO

A natureza é uma fonte atrativa de compostos farmacologicamente ativos candidatos ao tratamento de inúmeras patologias, devido à enorme diversidade química encontrada nos milhares de espécies de plantas, animais e microorganismos (Rocha et al., 2001).

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do interesse das instituições de pesquisa e indústrias farmacêuticas pelas modernas técnicas de síntese química, os produtos naturais e, particularmente, as plantas com propriedades medicinais, permanecem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra doenças

infecciosas (fúngicas ou bacterianas), câncer, dislipidemia e imunomodulação (Rocha et al., 2001).

Estima-se que, aproximadamente, 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas superiores. Em alguns casos particulares, tais como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, cerca de 60% dos disponíveis no mercado e em fase de teste clínico são derivados de plantas (Newman et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), devido à pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, 65-80% da população mundial, que vive em países em desenvolvimento, depende essencialmente das plantas para cuidados primários de saúde. Atualmente, as grandes empresas farmacêuticas demonstram

interesse na investigação de plantas superiores como fonte de novas moléculas bioativas, bem como, para o desenvolvimento de agentes fitoterápicos padronizados com eficácia, segurança e qualidade comprovadas (Calixto, 2000).

O número de espécies de plantas superiores (Angiospermas e Gymnospermas) do planeta é estimado em 300.000-500.000 e, provavelmente apenas 20% das plantas conhecidas na terra, foram investigadas para os potenciais efeitos terapêuticos, e uma porcentagem ainda menor para uma possível atividade anticancerígena (Cragg et al., 2009).

O Brasil apresenta a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas, bem como alguns dos ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais - a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado (Ministério do Meio Ambiente, 2012). Muitas plantas frequentemente utilizadas por populações locais ainda não foram estudadas ou seus princípios ativos ainda não foram identificados (Pan et al., 2009). Este trabalho tem como objetivo, uma revisão da literatura sobre o potencial biotecnológico das florestas brasileiras como fonte de fármacos propriedades antitumorais.

## O CÂNCER

A palavra câncer vem do latim *cancro*, que significa caranguejo. Este nome foi dado a essa doença devido à semelhança com que este crustáceo se adere firmemente a sua presa, assim como o tumor se adere ao local do corpo onde se desenvolve (Bold et al., 1997).

O câncer pode ser genericamente definido como tumor ou neoplasma. Neoplasma (do grego *neos* – novo; e *plasma* – algo formado) significa “novo crescimento” (Harrison et al., 2008). Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenada ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que a provocou (Baak, 2003).

As neoplasias são classificadas de acordo com a origem embrionária dos tecidos dos quais são derivados: os carcinomas são originários de

três camadas germinativas: ectodérmica, mesodérmica e endodérmica. Logo, os carcinomas com padrão microscópico de crescimento glandular são definidos como adenocarcinomas. Os sarcomas são derivados de tecido mesenquimatoso como osso, cartilagem e gordura. Os linfomas são neoplasias originárias de tecido linfóide, enquanto que as leucemias são de células hematopoiéticas de origem medular (Cotran et al., 2000). Existem, aproximadamente, 200 tipos de câncer os quais correspondem aos vários tipos de células do corpo, e diferenciam-se pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (Brasil, 2012; Weinberg, 2008).

A carcinogênese pode ser compreendida como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, particularmente: os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA; crescimento celular; imunidade; e quimio-resistência às drogas (Weinberg, 2008).

A vida da célula normalmente necessita da expressão equilibrada dos genes proliferativos que favorecem o desencadeamento da divisão celular e da diferenciação celular; e dos genes antiproliferativos (supressores de tumores) os quais, inibem o ciclo celular ou induzem a morte celular programada (apoptose) (Weinberg, 2008). Sendo assim, o câncer é decorrente das transformações celulares que promovem a ruptura do equilíbrio fisiológico (Medelaine, 2005).

Os fatores de risco de câncer são encontrados no ambiente ou herdados. Entende-se por ambiente: meio em geral (água, terra e ar); ambiente ocupacional (quando insalubre); ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida); e ambiente de consumo (alimentos, medicamentos).

As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (Anthony, et al., 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam que ocorrerão 518.510 casos novos de câncer (Brasil, 2012). 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 de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Brasil, 2012).

Em 2012, são esperados 257.870 casos novos, para o sexo masculino, e 260.640 para o sexo feminino. Estima-se que os tipos de câncer de próstata mais incidentes na população brasileira serão de próstata e de mama, respectivamente nos homens (60.180 novos casos) e nas mulheres (52.680 novos casos) (Brasil, 2012).

O crescente número de casos novos de câncer acelera a busca por moléculas bioativas no combate desta doença, neste sentido as espécies vegetais disponíveis na biodiversidade das florestas brasileiras atuam como reservatório de novas moléculas com potencial anticâncer.

#### A BIODIVERSIDADE DAS FLORESTAS BRASILEIRAS COMO FONTE DE MOLÉCULAS ANTITUMORAIS

#### A BIODIVERSIDADE DAS FLORESTAS BRASILEIRAS

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil possui seis biomas, diferenciados basicamente pela sua vegetação, são eles a Amazônia, o Cerrado, a Caatinga, a Mata Atlântica, o Pantanal e o Pampa (IBGE, 2004). Pela maior extensão territorial, descreveremos com um pouco mais de detalhes a Amazônia, o Cerrado e a Floresta Atlântica.

A Amazônia é o maior bioma brasileiro em extensão e ocupa quase metade do território nacional (49,29%), compreendendo a maior reserva de diversidade biológica do mundo. A bacia amazônica ocupa 2/5 da América do Sul e 5% da superfície terrestre. Sua área, de aproximadamente 6,5 milhões de quilômetros quadrados, abriga a maior rede hidrográfica do planeta, que escoia cerca de 1/5 do volume de água doce do mundo. Sessenta por cento da bacia amazônica se encontra em território brasileiro (IBGE, 2004). Este bioma é caracterizado por uma vegetação com diferentes complexos como a Floresta Inundada, Floresta Terra firme, a Flo-

do pasto, fruto da ação antrópica que ocupa grande área desse bioma (Afonso et al., 2005).

Vários trabalhos concluídos na Amazônia Ocidental e Central têm revelado que as florestas de terra firme possuem alta diversidade de espécies com árvores de DAP (Diâmetro a altura do peito) maiores ou iguais a 10 cm, e grande percentual de espécies com apenas um indivíduo por hectare, além de baixa similaridade florística entre parcelas próximas (Campbell, 1994; Valência et al., 1994; Amaral, 1996; Ferreira & Prance, 1998; Lima Filho, 2001).

A fitofisionomia de um ambiente florestal de terra firme na Amazônia caracterizou-se por um grande número de árvores altas e finas, com mais de 50% dos indivíduos situando-se entre 14 e 25 m. Dos 670 espécimes amostrados, 467 apresentaram  $DAP \leq 22,1$  cm, perfazendo 70% do total. *Abarema mataybifolia* (Sandw.) Barneby & Grimes, *Leonia glycyarpa* Ruiz & Pav., *Swartzia reticulata* Ducke e *Aspidosperma oblongum* A. DC., foram as únicas espécies a apresentarem valores superiores a 90 cm de DAP. Dos indivíduos estudados foram catalogados 670 indivíduos, distribuídos em 48 famílias, 133 gêneros e 245 espécies, destacando-se pelo número de espécies as famílias Annonaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lauraceae, Lecythidaceae, Mimosaceae, Moraceae e Sapotaceae (Oliveira et al., 2008).

O Cerrado ocupa a totalidade do Distrito Federal, mais da metade dos estados de Goiás (97%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%) e Tocantins (91%), além de porções de outros seis estados (IBGE, 2004). Dos aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados iniciais (25% do território nacional) restam, hoje, cerca de 350.000 (Mittermeier et al., 1999). Sua vegetação é considerada perenifólia. Mas no Nordeste do Brasil quando os climas semi-áridos, responsáveis vegetação de caatinga em faixas de solos relativamente bons, avançam sobre solos pobres associados com vegetação de cerrado, as espécies mais resistentes à seca da flora do cerrado reagem contra a falta d'água, deixando cair suas folhas. Daí resulta um tipo de vegetação

pouco comum: o cerrado caducifólio. Espécies e solo são típicos do cerrado (IBAMA, 2004).

Em uma área de Cerrado de Minas Gerais foram notados exemplares das famílias Leguminosae e Vochysiaceae (12 e 6 espécies, respectivamente), Asteraceae (4 espécies), Bignoniaceae (4 espécies), Erythroxylaceae (4 espécies), Rubiaceae (4 espécies), Myrtaceae (4 espécies), Melastomataceae (3 espécies), Malpighiaceae (3 espécies), Anacardiaceae (2 espécies), Annonaceae (2 espécies) e Loganiaceae (2 espécies) (Balduino et al., 2005).

Em contrapartida, no município de Corumbá, em uma área de borda de Cerrado foram encontradas na área de estudo 31 espécies, distribuídas em 23 gêneros e 20 famílias, sendo que cerca de 65% das famílias e dos gêneros foram representados por apenas uma espécie (Lehn et al., 2008). A riqueza encontrada foi considerada baixa em comparação com outras áreas de cerrado brasileiras

O bioma denominado Floresta Atlântica engloba vários tipos de vegetação (Rizzini, 1997) como florestas ombrófila densas ou mistas, florestas estacionais e ecossistemas associados como restingas e manguezais. É uma das formações vegetais tropicais mais ameaçadas do mundo pelo crescente desmatamento (Myers et al., 2000).

Desde o início da colonização, com a ocupação dos primeiros espaços territoriais próximos a região costeira, o Brasil passou por diferentes ciclos de exploração como: o do pau-brasil; da cana-de-açúcar; da pecuária; do ouro; e do café que contribuíram para a perda da cobertura florestal. Também a industrialização e consequente urbanização com o surgimento das principais cidades e metrópoles brasileiras fizeram com que a área originalmente ocupada pela Floresta Atlântica fosse reduzida drasticamente (Quinet et al., 2000).

Mundialmente, apenas da década de 80 foram extintos cerca de 154 milhões de hectares de florestas tropicais (FAO, 1993). Na Floresta Atlântica, possuindo altos índices de endemismo (WCMC, 1992), estima-se que ocorram cerca de 8000 espécies de plantas (Conservation

International, 2012). No entanto, ainda e pouco conhecida em relação a composição florística e aos processos ecológicos que envolvem suas comunidades e populações. Originalmente, esta formação vegetal ocupava cerca de 1,2 milhões de km<sup>2</sup>, hoje ocupa apenas 7% do território original, sendo que desta área, somente 1-2% tem chances de ser preservada (Myers et al., 2000).

Atualmente, a Floresta Atlântica compreende remanescentes de cobertura florestais bastante diversificadas na sua fisionomia e florística. Com uma grande população humana vivendo em seu domínio, ocorre uma grande pressão sobre este conjunto de ecossistemas e sua biodiversidade. Esta ocupação desordenada acaba por causar utilização irracional de recursos naturais. Dentre as principais atividades presentes hoje nesse ecossistema, resultam da ação direta do homem sobre as florestas: expansão agropecuária e urbana, inclusive loteamentos clandestinos; empreendimentos de infraestrutura; exploração predatória de recursos florestais, sendo exemplos a extração de madeira e o turismo desordenado; dentre outras (Fundação SOS Mata Atlântica, 2012).

A variedade de clima e relevo dos domínios da Floresta Atlântica proporciona uma grande diversidade de ambientes e ecossistemas complexos a ele associados, englobando a floresta pluvial atlântica, a floresta estacional semidecidual, mangues, restingas e campos de altitude (Mantovani 1990, Leitão-Filho 1994, Mantovani 1998, Ivanauskas et al. 2000, Oliveira-Filho & Fontes 2000, Scudeller et al. 2001, Scaramo 2002). Tal variação reflete em uma grande variedade e diversidade de espécies vegetais.

Em um estudo de um remanescente florestal do estado de São Paulo foram registradas 436 espécies, 74 monocotiledôneas e 362 eudicotiledôneas (incluindo os grupos parafiléticos, conforme APG 2003), pertencentes a 233 gêneros e 90 famílias, 16 de monocotiledôneas e 74 de eudicotiledôneas; 17 espécies permaneceram identificadas apenas em nível de família. Oito famílias mais ricas em espécies, Myrtaceae (55), Rubiaceae (32), Fabaceae (25), Melastomataceae (23), Araceae (20),

Araceae (20), Lauraceae, Orchidaceae e Solanaceae (14 espécies cada), compreenderam 45,2% do total de espécies levantadas (Zipparro et al. 2005).

Outros estudos como o de Guedes-Bruni et al. (1997) amostraram 187 espécies em 1 ha de floresta atlântica de encosta em Macaé de Cima – Rio de Janeiro, evidenciando o alto índice de riqueza de espécies na referida floresta.

A grande diversidade vegetal dos Biomas brasileiros faz com que as florestas apresentem um potencial para extração de moléculas biologicamente ativas derivadas do metabolismo secundário vegetal, as quais podem ser utilizadas como insumos biotecnológicos de baixo custo e grande abundância.

## O METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

O metabolismo vegetal é capaz de produzir moléculas de alta complexidade, partindo de moléculas simples como nitrogênio e gás carbônico. A biossíntese de tais moléculas ocorre por meio de rotas metabólicas específicas, em produtos primários ou secundários, que variam em concentração de acordo com as necessidades do organismo. Sendo assim: metabólitos primários são aqueles com funções vitais, incluem-se nesta classe: Lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos; e metabólitos secundários são aqueles necessários à sobrevivência e perpetuação dos organismos no seu ecossistema (Simões, et al. 2004).

A origem dos metabólitos secundários inicia no metabolismo da glicose, sendo os dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores dos metabólitos secundários aromáticos (Taiz & Zeiger, 2008; Simões, et al. 2004). Os derivados do acetato podem ser classificados conforme as seguintes vias metabólicas: Ciclo do ácido cítrico; Mevalonato; Produtos da condensação do acetato (Taiz & Zeiger, 2008; Simões, et al. 2004). Alguns metabólitos secundários derivam não

apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, flavonóides, e taninos condensados (Taiz & Zeiger, 2008; Simões, et al. 2004). Os metabólitos secundários são compostos pouco abundantes nas plantas, isso ocorre devido baixa atividade de suas vias metabólicas, bem como ao fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos. Nas plantas o metabolismo secundário é ativo apenas durante alguns períodos de seu desenvolvimento; estresse nutricional e climático; ataque de microrganismos e insetos (Simões, et al. 2004).

Os metabólitos secundários têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas. Os produtos do metabolismo secundário aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim, tais como: antibióticos, antifúngicos e antivirais atuantes na proteção das plantas contra patógenos; fitoalexinas, apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas a outras plantas (Simões, et al. 2004). Neste sentido, os objetivos da utilização de metabólitos secundários de origem vegetal como agentes terapêuticos são: Isolar os componentes bioativos para uso direto como drogas; Produzir compostos bioativos a partir de estruturas novas ou já conhecidas para semissíntese de produtos patenteáveis com elevada atividade e baixa toxicidade; Usar os agentes como ferramentas farmacológicas; e usar a planta inteira ou parte dela como um medicamento fitoterápico (Fabricant & Farnsworth, 2001). Atualmente, um grande número de moléculas isoladas, bem como extratos de origem vegetal são estudados quanto à sua atividade antitumoral, em vários modelos experimentais. Tais estudos colaboram com o desenvolvimento de inúmeras drogas efetivas no combate e tratamento do câncer.

## AVALIAÇÃO IN VITRO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DE EXTRATOS E/OU MOLÉCULAS DE ORIGEM VEGETAL

Os metabólitos secundários de plantas e seus derivados semi-sintéticos desempenham um papel importante na quimioterapia anticancer, sendo utilizados atualmente para tratar alguns tipos de leucemias, linfomas e tumores sólidos (Chabner et al, 2005; DeVita et al, 2008). Existem quatro principais classes estruturais de compostos derivados de plantas em uso clínico, alcalóides da vinca (Vinblastina, vincristina, vinorelbina), os linhanos de epipodofilotoxina (etoposídeo, teniposídeo, etoposídeo fosfato), os taxanos diterpenóides (taxol, paclitaxel, docetaxel), e a camptotecina quinolina derivada dos alcalóides (topotecano, irinotecano) (Newman e Cragg, 2012).

No entanto, para alcançar a clínica médica todos esses compostos tiveram que passar por rigorosos testes, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, além de inúmeros testes clínicos e farmacológicos, a fim de obterem a aprovação pelo órgão que regulamenta a liberação de drogas e alimentos nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration). Todo candidato a fármaco, seja de origem natural ou sintética, antes de chegar na clínica medicinal, deve cumprir um critério tão óbvio quanto primordial: exibir um alto efeito benéfico com mínimos efeitos colaterais (Barreiro et al., 2002). Na clínica oncológica estes fármacos devem ser altamente específicos para células tumorais, causando efeitos mínimos nas células normais do organismo.

Em uma recente revisão, Melo e colaboradores fizeram um levantamento e documentaram 84 plantas da flora brasileira citadas como tendo atividade antitumoral. Dessas, apenas para 36% foram realizados estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, e apenas 3 extratos e uma molécula estão sendo utilizados em ensaios clínicos (Melo et. al, 2011).

De uma maneira geral, moléculas e extratos vegetais que possuam atividade antitu-

moral devem induzir parada do ciclo celular e/ou morte por apoptose das células tumorais.

Um dos testes mais utilizados ultimamente para o screening inicial de drogas é o ensaio de viabilidade celular empregando o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico), o qual tem se mostrado promissor para a predição “*in vitro*” de atividade biológica de novos compostos frente a linhagens de células cancerígenas humanas. Neste ensaio, o sal tetrazólico (MTT) é reduzido pela succinato desidrogenase, presente na mitocôndria, formando um precipitado de cor púrpura, chamado formazam, quantificado por espectrofotometria.

O resultado deste ensaio é dependente da população de células metabolicamente ativas capazes de reduzir o MTT, o que reflete o estado geral da mitocôndria e conseqüentemente se a célula esta ou não viável (Albrecht et al., 2004).

Apesar de importante para o fornecimento rápido de dados em um screening inicial da atividade de novos compostos frente a várias linhagens tumorais, o ensaio de MTT não nos dá muita informação sobre o mecanismo de ação dos compostos, levando a questionamentos óbvios. Esse novo composto está matando as células ou simplesmente causando uma parada do ciclo celular? Se ocorrer morte celular, é por apoptose ou necrose? Se for por apoptose, qual via apoptótica esta ativada? Descrever todo o processo de apoptose e detalhar todas as formas de detecção está além do escopo desse artigo. No entanto, a importância do processo apoptótico para terapia antitumoral e os principais tipos de ensaios utilizados para detecção da apoptose serão comentados.

A apoptose é um processo mecanicamente orientado de morte celular como resposta a estímulos específicos (como o fator de necrose tumoral TNF e o ligante FAS) ou em resposta a diversas formas de dano celular ou estresse (Smith et al., 1994; Nagata, 1994; Gerschenson e Rotello, 1992). Esta forma de morte celular programada recebeu maior atenção após a identificação da fragmentação do DNA, o que não é observado na necrose, sugerindo ação de endonucleases e de complexos processos bioquímicos (Hannun,

997). A apoptose apresenta fundamental importância para o controle das neoplasias uma vez que falhas nesse processo podem promover a sobrevivência e acúmulo de células transformadas levando a formação de tumores (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005).

Diferente da necrose, que causa respostas potencialmente graves como a inflamação, a apoptose constitui uma forma eficiente de morte sem comprometimento dos tecidos adjacentes. Examinando os padrões de ativação de caspases seguido de diferentes estímulos apoptóticos, pelo menos duas distintas vias foram elucidadas. A via mitocondrial (via intrínseca) e a via dos receptores de morte (via extrínseca), que podem ser divididas em três estágios: sinalização, ativação e execução (Schulze-Osthoff et al., 1998; Yu & Zhang, 2003). Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca de sinalização da apoptose dependem de uma cascata enzimática mediada por caspases. As caspases (caspases 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10) correspondem a uma família de proteases sintetizadas na célula como precursores inativos, pró-caspases (zimogênio), que após sofrerem clivagem proteolítica promovem a iniciação e regulação da via da apoptose (Yu & Zhang, 2003).

Os ensaios para detecção de apoptose induzida por compostos podem ser divididos nos seguintes grupos: a) Alterações citomorfológicas; b) Ensaios de fragmentação de DNA; c) Análise de ciclo celular; d) Detecção de caspases e liberação de citocromo c; e e) Ensaios mitocondriais.

## ALTERAÇÕES CITOMORFOLÓGICAS

Visualizar alterações na morfologia celular devido ao processo de apoptose é um procedimento chave para avaliar a atividade de um novo composto. A apoptose é marcada por características celulares específicas, quem podem ser visualizadas por diferentes técnicas de microscopia. Dentre essas técnicas se encontram a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A microscopia de fluorescência utiliza fluorocromos que se intercalam ao DNA (laranja

de acridina e brometo de etídio). É um método simples e preciso para se avaliar o índice de indução de apoptose de um determinado composto (Remoize et al., 1998; Nafisi et al., 2007). O corante laranja de acridina é um marcador que permeia as células cuja integridade da membrana celular está preservada. Neste método as células vivas apresentam núcleo verde e íntegro, já as células em apoptose primária apresentam o núcleo verde condensado ou fragmentado. Como o brometo de etídio é permeável apenas nas células que perderam a integridade da membrana celular, células em apoptose secundária apresentam núcleo condensado ou fragmentado, corado de laranja e células em necrose apresentam o núcleo alaranjado, íntegro e volumoso (Remoize et al., 1998). A principal desvantagem desse método é dificuldade de detecção do processo de apoptose em fases iniciais. MET é considerado um procedimento padrão para confirmação do processo de apoptose. Isso porque a classificação de uma célula apoptótica torna-se irrefutável se ela possui certas características morfológicas ultraestruturais, tais como: a) núcleo eletro-denso; b) fragmentação nuclear; c) membrana celular intacta, mesmo em fase avançada do processo apoptótico; d) Organelas citoplasmáticas desorganizadas; e) Surgimento de grandes vacúolos; e f) “blebs” na superfície da membrana plasmática. Como principais desvantagens da técnica estão o alto custo e o longo tempo de preparação das amostras (Elmore, 2007).

## ENSAIO DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA

O processo de apoptose quase sempre culmina com a fragmentação da molécula de DNA por endonucleases. Sendo assim, torna-se fundamental a detecção da fragmentação do DNA como forma de confirmar a morte celular por apoptose. Dentre as principais técnicas encontram-se a análise do padrão de fragmentação de DNA em gel de agarose (“DNA laddering”) e o ensaio de TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling).

O ensaio em gel de agarose envolve a extensão do DNA a partir de um homogenato ce-

O ensaio em gel de agarose envolve a extração do DNA a partir de um homogenato celular lisado seguido por eletroforese, o processo apoptótico será identificado pelo padrão de “escada de DNA” característico, com cada banda na escada separados por aproximadamente 180 pares de bases. Esta metodologia é indicada para os tecidos e as culturas de células com elevado número de células apoptóticas. No entanto, não é recomendada nos casos com baixo número de células apoptóticas. Existem outras desvantagens para esta metodologia, como a fragmentação ocorrer em uma fase tardia da apoptose e a ausência do padrão em escada do DNA não eliminar o fato das células avaliadas estarem sofrendo apoptose em estágio inicial.

O método de TUNEL é usado para detectar os produtos da clivagem por endonucleases marcando o final dos fragmentos de DNA (Kressel & Groscurth, 1994). Uma transferase terminal é usada para adicionar dUTP marcados na extremidade 3' dos fragmentos de DNA. O dUTP pode ser marcado com uma variedade de sondas para permitir a detecção por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

Os ensaios estão disponíveis em kits específicos vendidos por diferentes empresas. O ensaio de TUNEL é bastante sensível, permitindo a detecção de uma única célula por meio de microscopia de fluorescência ou poucas células (cerca de 100 células) por meio de citometria de fluxo. Possui a vantagem de ser uma técnica rápida, podendo ser realizada dentro de, aproximadamente, 3 horas. As desvantagens são o alto custo dos kits e a falta de exatidão sobre quantas quebras no DNA são necessárias para a detecção por este método. O método de TUNEL também está sujeito a falsos positivos, pois se podem detectar células em necrose e/ou células que estão em processo de reparo de DNA ou em transcrição gênica.

## ANÁLISE DE CICLO CELULAR

A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo tem-se mostrado uma técnica seletiva para investigação do mecanismo de morte celu-

lar. Essa técnica permite identificar a distribuição das células durante as fases do ciclo celular. As fases são distinguidas, a partir do conteúdo do DNA, em fase G1, S (síntese) e G2/M. As fases G2 e M (mitose) do ciclo celular aparecem na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (Nunez, 2001). O iodeto de propídio (PI), que se intercala ao DNA, é utilizado como marcador fluorescente por ser estável e de baixo custo (Rieger et al., 2011).

Nos estágios tardios da apoptose o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. Durante o processamento das amostras para análise do ciclo celular as células são fixadas em etanol 70%, seguida da lavagem com tampão de extração. Este processo remove o DNA fragmentado e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (Gong et al., 1994). As células que aparecem nessa região podem ser consideradas em processo de apoptose. A principal desvantagem dessa técnica é que células em necrose também podem ser detectadas na região de sub-G1.

## DETECÇÃO DE CASPASES

Como mencionado anteriormente caspases correspondem a uma família de proteases sintetizadas na célula como precursores inativos ou pró-caspases, que após sofrerem clivagem proteolítica promovem a iniciação e regulação da via apoptótica.

Pelo menos 13 tipos de caspases são conhecidos e podem ser detectadas utilizando diferentes técnicas (Gurtu et al., 1997).

Vários kits contendo substratos para os diferentes tipos de caspases estão disponíveis no mercado e a ativação pode ser mensurada por espectrofotometria ou fluorimetria. Caspases podem também ser detectadas por Western Blot. Tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais podem ser usados para detecção de procaspases e/ou caspases ativadas.

Ambos os métodos para detecção da atividade de caspases requerem a lise celular

para liberação dessas enzimas no citoplasma. Esses ensaios requerem em média  $1 \times 10^5$  e permitem uma rápida e consistente quantificação de células em apoptose. No entanto, apesar de ser um forte indicativo do processo apoptótico, a ativação das caspases não indica necessariamente que a apoptose irá ocorrer. Isso porque existe uma grande sobreposição de substratos entre os diferentes tipos de caspases, o que acaba afetando a especificidade do ensaio.

## ENSAIOS MITOCONDRIAIS

Ensaio mitocondriais e a liberação de citocromo c permitem a detecção de mudanças na fase inicial da via intrínseca de apoptose. Dentre os principais estão a detecção do potencial de ação mitocondrial, que pode ser feito por microscopia com focal ou citometria de fluxo e avaliação da liberação de citocromo c realizado por ELISA.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser feita utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro- 1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que difunde livremente para o interior da célula.

Na mitocôndria, que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria.

Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência verde, assim, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre a formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (Smiley et al., 1991; Cossarizza et al., 1993).

O citômetro de fluxo quantifica as células que possuem mitocôndria normal e com potencial de membrana alterado por meio do detector FL1 que capta luz na região do verde

(510-527 nm) e do detector FL2 que capta luz na região do laranja (585-590 nm). O potencial de membrana mitocondrial também pode ser avaliado utilizando o corante fluorescente Rodaminda 123. Este marcador acumula-se seletivamente nas mitocôndrias funcionais de uma maneira dependente do potencial transmembrana. A análise pode ser feita por citometria de fluxo, em um processo similar ao utilizado para o marcador JC-1 ou através da microscopia confocal (Bedner et al., 1999;).

A perda do potencial de membrana mitocondrial é um evento inicial do processo de apoptose que culmina com a liberação de citocromo c no citoplasma. Por isso, torna-se importante determinar se esta ocorrendo essa liberação durante o processo apoptótico. Vários kits de ELISA disponíveis no mercado são suficientes para detecção de citocromo c nas frações mitocondrial e citoplasmática (Waterhouse et al., 2001). Apesar de ser uma metodologia rápida e sensível possui a desvantagem do elevado custo dos kits.

A apoptose é um dos mais complexos processos celulares que possui características morfológicas e bioquímicas específicas e bem definidas. É um processo ativo, bioquimicamente controlado, responsável pelo equilíbrio entre proliferação celular e morte celular, importante para a homeostasia do organismo. A constatação do mecanismo de morte celular por apoptose é crucial para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais e o conhecimento das vias de sinalização da apoptose tem permitido o planejamento racional de novos fármacos anti-cancerígenos. Senso assim, como algumas características da apoptose e necrose acabam se sobrepondo, o uso de várias técnicas independentes somam resultados importantes para a confirmação do mecanismo de morte induzido por compostos com atividade antineoplásica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade biológica disponível nas floras brasileira destaca-se com um elevado potencial fornecedor de moléculas bioativas, dentre eles as que apresentam atividades sobre o câncer.

Nesse contexto, as plantas já proporcionaram ao homem vários fármacos ativos no combate ao câncer, e, possivelmente, outros serão descobertos em screening fitoquímico de plantas nativas das florestas brasileiras. A identificação, extração, isolamento e caracterização de princípios ativos vegetais com propriedades citotóxicos a células tumorais, mantidas em cultura, é de grande interesse clínico e farmacológico. Desta forma, estudos químicos, biológicos e farmacológicos que certifiquem a eficácia terapêutica, indicações e contra-indicações, toxicidade de espécies vegetais da flora brasileira devem ser incentivados pelas autoridades governamentais.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, A.G; VALERIANO, D. M; BATISTA, G.T. Caracterização de fisionomias vegetais na Amazônia oriental através de videografia aerotransportada e imagens derivadas do Modelo Linear de Mistura Espectral do sensor ETM+ do Landsat 7. Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 16-21. 2005.
- ALBRECHT, H., BRODBECK-HUMMEL, D., HOEVER, M., NICKEL, B., REGENASS, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: DINGERMANN, T., STEINHILBER, D., FOLKERS, G. Molecular Biology in Medicinal Chemistry, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39, 2004.
- AMARAL, I.L. 1996. Diversidade Florística em Floresta de Terra Firme, na região do rio Urucu – AM. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/universidade Federal do Amazonas, Manaus. 160pp.
- ANTHONY JF GRIFFITHS, SUSAN R WESSLER, RICHARD C LEWONTIN, WILLIAM M GELBART, DAVID T SUZUKI. Introdução à Genética - 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Grupo GEN), 2008.
- OLIVEIRA, A.N. AMARAL I.L., RAMOS, M.B.P. NOBRE, A.D. COUTO, L.B. SAHDO. R.M. Composição e diversidade florístico-estrutural de um hectare de floresta densa de terra firme na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. vol. 38(4) 2008: 627 - 642.
- BAAK, J.P.A., PATH, F.R.C., HERMSEN, M.A.J.A., MEIJER, G., SCHMIDT, J., JANSSEN, E.A.M. Genomics and proteomics in cancer. European Journal of Cancer, v.39, p.1199-1215, 2003.
- BALDUINO, A.P.C; SOUZA, A.L; NETO, J.A.M; SILVA, A.F; JÚNIOR, M.C.S. Fitosociologia e análise comparativa da composição florística do cerrado da flora de Paraopeba-MG. Árvore, Viçosa-MG, v.29, n.1, p.25-34, 2005.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e antitrombóticos. Química Nova. Vol.25 (1), 129-148, 2002.
- BEDNER, E., LI, X., GORCZYCA, W., MELAMED, M.R., DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry. V. 35:181-95, 1999.
- BOLD, R.J; TERMULEN, P.M; MACCONEY, D.J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surgical Oncology., v.6, n.3, p.133-142, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
- CALIXTO, J.B; Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). The medicinal use of herbal drugs. 2000. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 179-189.

- CAMPBELL, D.C. 1994. scale and patterns of community structure in Amazonian forests. In: P.J. edwards.; r.m. may.; N.r. Webb. (eds.). Large-scale Ecology and Conservation Biology. Blackwell scientific Publications, Oxford. pp. 179-198.
- CHABNER, B A. et.al. Antineoplásicos, in: HARDMAN, Joel G; LIMBIRD, Lee E. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill. cap.52, p.1042-1093, 2005.
- CONSERVATION INTERNATIONAL. 2006. Biodiversity hotspots. On line [http://www.biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots/atlantic\\_forest/](http://www.biodiversityhotspots.org/xp/Hotspots/atlantic_forest/) consulta em 19/07/2012.
- COSSARIZZA, A., BACCARANI-CONTRI, M., KALASHNIKOVA, G., FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). Biochemical Biophysical Research Communications., v. 197, p. 40-45, 1993.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. Patologia Estrutural e Funcional. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 233-293, 2000.
- CRAGG, G.M, GROTHAUS, P.G, NEWMAN, D.J. 2009. Impact of natural products on developing new anticancer agents. Chem Rev. (7):3012-43.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. V.35(4): 495-516, 2007.
- FAO. 1993. Summary of the final report of the forest resource assessment 1990 for the tropical world. FAO, Rome.
- FERREIRA, L.V.; PRANCE, G.T. 1998. Species richness and floristic composition in four hectares in the Jaú National Park in upland forests in Central Amazonia. Biodiversity and Conservation, 7:1349-1364.
- FISCHER, U., SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. Pharmacological Reviews, v. 57, p. 187-215, 2005.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. 2003. <http://www.sosmatatlantica.org.br/consultado> em 03/07/2012.
- GERSCHENSON, L.E., ROTELLO, R.J. Apoptosis: A different type of cell death. The FASEB Journal, v. 6, p.2450-2455, 1992.
- GONG, J., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. Analytical Biochemistry. v.218, p.314-319, 1994.
- GUEDES-BRUNI, R.R., PESSOA, S.V.A. & KURTZ, B.C. 1997. Florística e estrutura do componente arbustivo-arbóreo de um trecho preservado de floresta montana na Reserva Ecológica de Macaé de Cima. In Serra de Macaé de Cima: diversidade florística e conservação em Mata Atlântica (H.C. Lima & R.R. Guedes-Bruni, eds.). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.127-146.
- GURTU, V., KAIN, S.R., ZHANG, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. Anal Biochem. V.251:98-102, 1997.
- HANNUM, Y.A., Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. Blood, v.. 86, p. 1845-1853, 1997.
- HARRISON, TINSLEY RANDOLPH; FAUCI, ANTHONY S. Harrison medicina interna. 17. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2008.
- IBAMA. 2004. Projeto de Integração do

- Rio São Francisco com Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional. *Consolidação dos Estudos Ambientais*. 71p
- IBGE. 2004. IBGE lança o Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil, em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acessado em: 10/07/2012.
- IVANAUSKAS, N.M., MONTEIRO, R. & RODRIGUES, R.R. 2001. Levantamento florístico de trecho de floresta Atlântica em Pariquerapuçu, São Paulo, Brasil. *Naturalia* 26: 97-129.
- KRESSEL, M. Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* V. 278:549-56, 1994.
- LEHN, C.R.; ALVES, F.M; JUNIOR, G.A.D. Florística e fitossociologia de uma área de cerrado sensu stricto na região da borda oeste do Pantanal, Corumbá, MS, Brasil. *Pesquisas, Botânica*. nº 59: 129-142. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2008.
- LEITÃO FILHO, H.F. 1994. Diversity of arboreal species in Atlantic rain forest. *An. Acad. Bras. Cienc.* 66: 91-96.
- LIMA FILHO, D.A.; MATOS, F.D.A.; AMARAL, I.L.; REVILLA, J.; COELHO, L.S.; RAMOS, J.F.; SANTOS, J.L. 2001. Inventário florístico de floresta ombrófila densa de terra firme, na região do rio urucu Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 31:565-579.
- LIMA HC AND Guedes-Bruni, RR. 1997. Serra de Macaé de Cima: Diversidade Florística e Conservação em Mata Atlântica. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 345p.
- MADÉLAINE. J; ZALCMAN. G. Biology of bronchial cancers. *EMC-Pneumologie*. 2 9-31, 2005.
- MANTOVANI, W. 1990. A dinâmica das florestas de encosta Atlântica. In *Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira*, São Paulo, p.304-313.
- MANTOVANI, W. 1998. Dinâmica da Floresta Pluvial Atlântica. In *Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros*. ACIESP Águas de Lindóia, p.1-20.
- MELO, J.G., SANTOS, A.G., AMORIM, E.L.C., NASCIMENTO, S.C., ALBUQUERQUE, U.P., *Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol.2011, 14 páginas, 2011.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, secretaria de biodiversidade e floresta. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=111> consultado em: 20 de Julho de 2012.
- MITTERMEIER, R. A. et al. Hotspots: Earth's biologically richest and endangered terrestrial ecoregions. México: CEMEX, 1999. 431p.
- MYERS N, Mittermeier R. A., Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853 - 858.
- NAFISI, S., SABOURY, A. A., KERAMAT, N., NEAULT, J-C, TAJMIR-RIAAHI, HA. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, v. 827. P. 35-43, 2007.
- NAGATA, S. Apoptosis regulated by a death factor and its Receptor: Fas ligand and Fas. *Philosophical Transactions Royal Society: Biological Sciences*, v 345, p. 281-287, 1994.
- NEWMAN, D.J, CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years

- over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 311-335, 2012.
- NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Current Is*
- OLIVEIRA FILHO, A.T. & FONTES, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- PAN, L., HEEBYUNG, C., KINGHORN, A.D. 2009. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett.* 1-8.
- QUINET, A.; CALLADO, C. H.; BARROS, C. F.; LIMA, H. C.; BRAGA, J. M.; LIMA, M. P. M.; GUEDES-BRUNI, R. R.; DRUMOND, R. M. A. P.; SILVA NETO, S. J.; PESSOA, S. V. A., 2000. Mata Atlantica, 500 anos. CD-ROM. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- REMOIZE, C., BIOLA, A., PALLARDY, M., BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biology and Toxicology*, v. 14, p. 111-120, 1998.
- RIEGER, A. J., NELSON, K. L., KONOW-ALCHUK, J. D., BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, v. 50, p. 1-4, 2011.
- RIZZINI, C. T.; 1997. Tratado de fitogeografia do Brasil. Âmbito Cultural Edições. Rio de Janeiro.
- ROCHA, A. B., LOPES, R. M., SCHWARTS, G. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1(4) : 364-369, 2001.
- SCARANO, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian atlantic rainforest. *Ann. of Bot.* 90: 517-524.
- SCHULZE-OSTHOFF, K.; Ferrari, D.; Los, M.; Wesselborg, S.; Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochemistry.* Vol. 254, 439-459, 1998.
- SCUDELLER, V.V., MARTINS, F.R. & SHEPHERD, G.J. 2001. Distribution and abundance of arboreal species in the atlantic ombrophilous dense forest in Southeastern Brazil. *Plant Ecol.* 152:185-199.
- SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2004.
- SMILEY, S. T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T. W., STEELE, G. D., CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, p. 3671-3675, 1991.
- SMITH, C. A., FARRAH, T., GOODWIN, R.G. The TNF receptor super family of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell*, v. 76, p.959-962, 1994.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal.* 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- VALENCIA, R.; BALSLEV, H.; PAZ Y MINO, G.C. 1994. high tree alpha diversity in Amazonian ecuador. *Biodiversity and Conservation*, 3:21-28.
- WATERHOUSE, N.J., GOLDSTEIN, J.C., VON AHSEN, O., SCHULER, M., NEWMAYER, D.D. AND GREEN, D.R. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol.*, 153, 319-328, 2001.
- WCMC, 1992. *Global biodiversity: status of the Earth's living resources.* London. Chapman & Hall. 418p.
- WEINBERG, R. A. *A Biologia do*

Câncer. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION  
- CANCER CONTROL SERIES. 2006.

YU, J.; Zhang. Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol*. Vol. 16, 19-24, 2003.

ZIPPARRO, V. B., GUILHERME, F. A. G., ALMEIDA-SCABBIA, R. J.E MORELLATO L. P. C. Levantamento Florístico de Floresta Atlântica no Sul do Estado de São Paulo, Parque Estadual Intervales, Base Saibadela 2005 *Biota Neotropica* v5 (n1)- <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n1/pt/abstract?inventory+BN02605012005>.