

MICKAELA CARDOSO MARTINEZ SMITH

**Alterações lisossomais e indução de morte celular
programada em células leucêmicas tratadas com
paladaciclo**

CAMPINAS

2006

MICKAELA CARDOSO MARTINEZ SMITH

**Alterações lisossomais e indução de morte celular
programada em células leucêmicas tratadas com
paladaciclo**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Farmacologia.*

Orientadora: Prof^ª. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

CAMPINAS

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sm51a Smith, Mickaela Cardoso Martinez
Alterações lisossomais e indução de morte celular programa em
células leucêmicas tratadas com paladaciclo / Mickaela Cardoso
Martinez Smith. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Claudia Bincoletto Trindade
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Apoptose. 2. Células K562. I. Trindade, Claudia
Bincoletto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Lysosomal alterations and programmed cell death induction in
leukaemic cells treated with palladacycle**

Keywords: • Apoptosis
• K562 cell

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad
Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

Data da defesa: 28-08- 2006



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

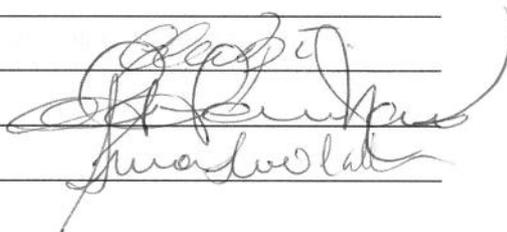
Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Membros:

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Three handwritten signatures in black ink are written over the lines corresponding to the names of the examiners. The signatures are cursive and appear to be those of the three professors listed: Claudia Bincoletto Trindade, Iseli Lourenço Nantes, and Sara Teresinha Olalla Saad.

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/08/2006

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figuras 1: Estrutura química do composto Paladaciclo Ferroceno 1:2	20
Figura 2: Formação da proteína oncogene Bcr/abl	22
Figura 3: Ativação do processo apoptótico via Bcl-2 e Bax	24
Figura 4: Visualização dos diferentes eventos ocorridos nos processos necróticos e apoptóticos	25
Figura 5: Papel do ATP e MPT na necrapoptose	28
Figura 6: Determinação do pK_a do composto paladaciclo ferroceno 1:2, o qual foi estimado em 5,1 – 6,5	30
Figura 7: Efeitos citotóxicos do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a linhagem de células leucêmicas K562.	46
Figura 8: Avaliação da apoptose celular através do aspecto morfológico em microscopia fluorescente e fragmentação nuclear das células leucêmicas tratadas com o paladaciclo ferroceno 1:2	48
Figura 9: Expressão de Bcl-2 em células Jurkat verificada através da técnica de imunocitoquímica	50
Figura 10: Expressão de Bcl-2 e Bax em células K562 verificada através da técnica de RT-PCR	52
Figura 11: Avaliação da permeabilidade da membrana lisossomal de	55

células K562 através de microscopia confocal a laser

Figura 12: Ativação de caspases efetoras 3 e 6 da morte celular 57
programa em células K562 tratadas com paladaciclo ferroceno

TABELAS

Tabela 1: . Avaliação qualitativa da intensidade de expressão do proto- 49
oncogene Bcl-2 em linhagem leucêmica Jurkat na presença do
composto paladaciclo ferroceno 1:2.

SUMÁRIO

Resumo	11
Summary	14
1. Introdução	16
2. Objetivos	31
3. Material e Métodos	33
3.1. Paladaciclo ferroceno 1:2	34
3.2. Manutenção de células de leucemia mielóide crônica K562.....	34
3.3.1. Teste de redução de MTT.....	34
3.3.2. Teste de exclusão por azul de trypan.....	35
3.4. Fragmentação de DNA e visualização celular através da microscopia fluorescente na presença de <i>acredine orange</i>	36
3.5. Expressão dos genes Bcl-2 e Bax pela técnica de RT-PCR.....	37
3.6. Avaliação da expressão do gene Bcl-2 através da técnica imunocitoquímica (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase – APAAP).....	40
3.7. Avaliação da permeabilização da membrana lisossomal através da microscopia confocal a <i>laser</i>	41
3.8. Avaliação da atividade das caspases –3 e –6.....	42
3.9. Análises estatísticas.....	43

4. Resultados.....	44
Teste de MTT e exclusão por azul de trypan.....	45
Fragmentação de DNA e visualização celular através da microscopia fluorescente na presença de <i>acredine orange</i>	47
Expressão do gene Bcl-2 através da técnica imunocitoquímica (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase – APAAP).....	49
Expressão dos genes Bcl-2 e Bax pela técnica de RT- PCR.....	51
Avaliação da permeabilização da membrana lisossomal através da microscopia confocal a <i>laser</i>	53
Avaliação da atividade das caspases –3 e –6.....	56
5. Discussões	58
6. Conclusões	65
7. Perspectivas futuras.....	68
8. Referências bibliográficas.....	70

Dedico este trabalho aos meus pais, Juan e Angela, pela oportunidade que me proporcionaram e por todo apoio nos momentos mais difíceis. Foram eles que me ensinaram a traçar objetivos e nunca desistir de um sonho, levando sempre a dignidade e o amor ao próximo. Sem eles, eu com certeza, não chegaria aqui. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por guiar o meu caminho com muita paz, alegria e prosperidade. É nele que penso nos momentos mais difíceis.

Agradeço novamente aos meus pais, Juan e Angela, por me apoiarem sempre, e em momento nenhum estarem ausentes. Muito obrigada por tudo, vocês são meus exemplos de vida!

Ás minhas irmãs, Karen e Nadime, por me acompanharem nesta trajetória. Obrigada pela alegria em nossa família.

Ao meu namorado, Marcus, por estar sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo seu amor, que me ajuda a superar muitos obstáculos!

À toda minha família, meus avós, meus tios, minhas primas...

À Prof^a. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade, orientadora deste trabalho, pela oportunidade e confiança que me foi dada. Ela sempre foi mais que uma orientadora, é um exemplo de dignidade, humildade e inteligência. Muito obrigada, Prof^a. Cláudia!

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Fávero Caires, pela síntese do composto.

Ao Prof. Dr. Ivarne L. S. Tersariol e ao amigo Fabio Nascimento, pelo auxílio na técnica de microscopia confocal *a laser*.

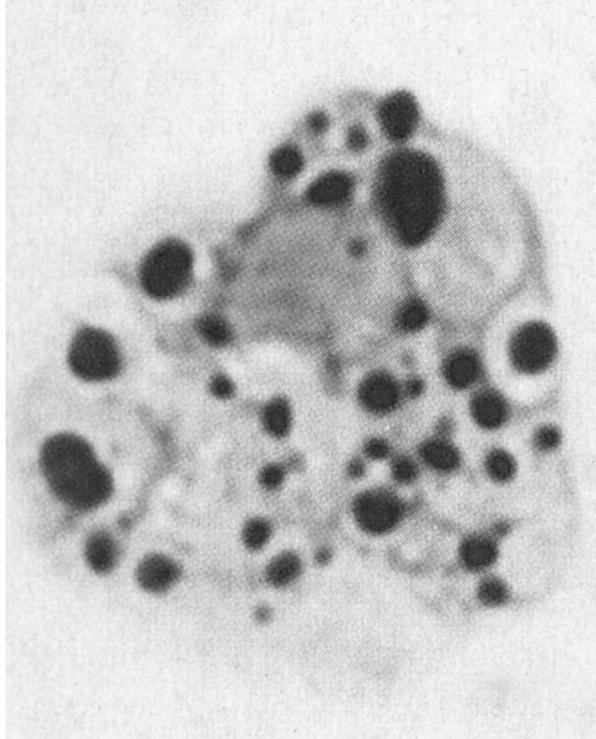
Ao Prof. Dr. Ronaldo C. Araújo, pela colaboração na técnica de RT-PCR.

Aos amigos do laboratório: Taíz, Camila, Marília, Flávia e Daniela, por todo apoio. Agradeço em especial, à dois amigos: Carlos e Christiano, que me ajudaram e colaboraram muito neste trabalho! Muito obrigada!

Agradeço à UMC e UNICAMP, por todo apoio teórico e estrutural.

Á FAPESP, pelo apoio financeiro e estrutural.

Enfim, agradeço à todos que fizeram parte deste trabalho.

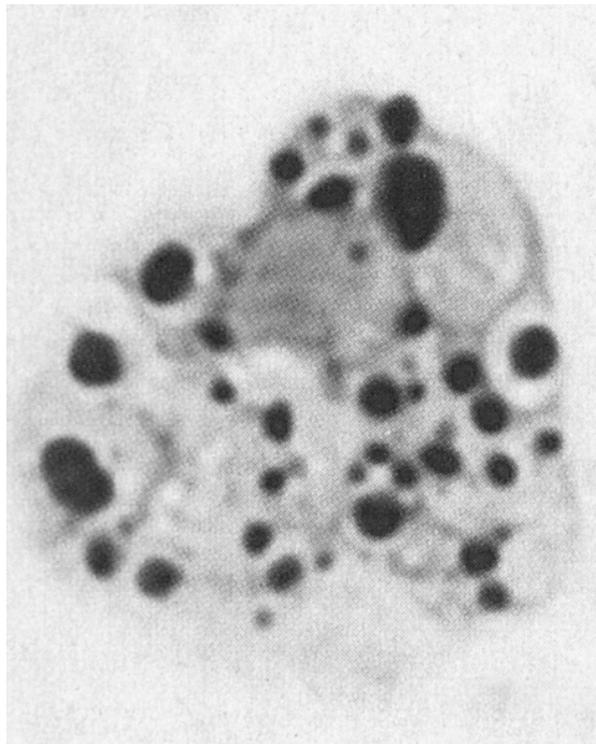


RESUMO

Estudos experimentais envolvendo a caracterização fármaco-toxicológica de novos fármacos são de grande importância na pesquisa inicial sobre drogas (ERDAL et al., 2005). Sendo assim, neste projeto um dos nossos objetivos iniciais foi avaliar os possíveis efeitos antineoplásicos de uma nova classe de drogas organometálicas contendo paládio como metal de transição, denominada paladaciclo ferroceno 1:2, utilizando para isto, a linhagem de células leucêmica K562 (leucemia mielóide crônica) e Jurkat (leucemia linfóide aguda) .

Os valores de $IC_{50\%}$ obtidos na linhagem K562 após 72 horas de tratamento com o composto paladaciclo foram 4,1 e 2,9 μM , nos testes de redução do MTT e exclusão por azul de trypan, respectivamente. Através da fragmentação de DNA observamos que o composto foi capaz de induzir apoptose nas células K562 e Jurkat. Aspectos morfológicos de apoptose nestas células também foram confirmados através da coloração de *acredine orange* visualizadas em microscopia de fluorescência nas células K562. Utilizando *acredine orange*, um corante que tem a característica de se acumular principalmente em lisossomas secundários de células tumorais, nós também analisamos o mecanismo bioquímico envolvido no processo de morte celular das células K562 induzidas pelo composto paladaciclo. Nossos resultados demonstraram que a expressão dos genes envolvidos no controle da apoptose (Bcl-2 e Bax) em ambas as linhagens celulares tratadas com o paladaciclo é similar ao controle sem tratamento. Por outro lado, o composto em estudo (6,0 μM) induziu a permeabilização da membrana lisossomal de células K562 após 5 horas de tratamento com ativação das caspases efetoras da apoptose 3 e 6. Este processo de ativação das caspases também foi observado após 72 horas de incubação com o paladaciclo. Como a cathepsina B está abundantemente presente nos lisossomas e sua liberação para o citosol é esperada após alterações da permeabilidade da membrana lisossomal, investigamos também a ativação de ambas as caspases, descritas acima, após a incubação das

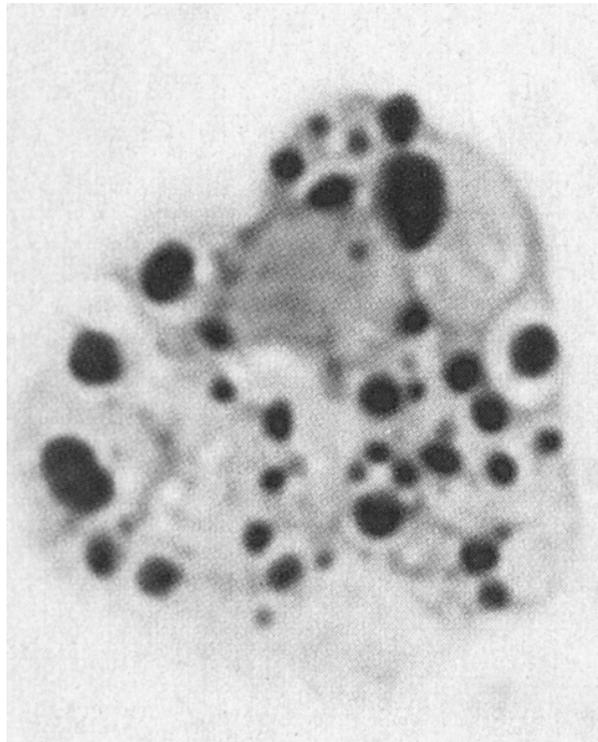
células K562 com um inibidor de catepsina B (CA074) por 2 horas antes da exposição ao paladaciclo (6,0 μ M). Este estudo forneceu um resultado bastante interessante, pois demonstrou que a ativação das caspases efetoras da morte celular programada foi prevenida, sugerindo assim que a catepsina B está fortemente associada ao processo apoptótico em células K562. Sendo assim, podemos sugerir que o composto paladaciclo apresenta potencial antileucêmico, merecendo estudos adicionais que comprovem sua eficácia terapêutica.



SUMMARY

Experimental studies involving the pharmaco-toxicological properties of new drugs are of very importance in its initial development (ERDAL et al., 2005). In this study it was evaluated the possible antileukemic effects of a new organometallic class of drugs called palladacycle ferrocene 1:2, using the K562 and Jurkat leukaemia cell lines.

The cell death mechanism of cytotoxicity induced by the Biphosphinic Palladacycle Complex (BPC) was studied using a K562 leukaemia cell line. The $IC_{50\%}$ values obtained for K562 cells post 72 h of BPC were less than 5.0 μ M by using MTT and trypan blue assays. Complex triggers apoptosis in K562 and Jurkat cells, inducing DNA fragmentation, as analysed through electrophoresis. Using the *Acridine Orange* (AO) vital staining combining fluorescence microscopy it was confirmed the presence these process in K562 cells. Lysosomal membrane permeabilization was also observed in K562 cells post 5 h of BPC, which suggests intralysosomal accumulation by proton-trapping, previous study, revealed that its pKa value ranged from 5.1 to 6.5. Caspase-3, and -6 activity induced by BPC in K562 cells was prevented by the cathepsin B inhibitor (CA-074). These events occurred in the presence of endogenous Bcl-2 and Bax expression. Taken together, these data suggest a novel lysosomal pathway for BPC-induced apoptosis, in which lysosomes are the primary target and cathepsin B acts as death mediator.



1. INTRODUÇÃO

A utilização da quimioterapia é uma das principais armas na luta contra o câncer, sendo, portanto, um campo muito explorado nos últimos 30 anos pela comunidade científica. Apesar disto, o envolvimento de compostos bioinorgânicos, principalmente aqueles contendo metais, foi muito limitado até a demonstração da atividade anticancerígena de complexos contendo platina, por Rosenberg e colaboradores no final dos anos 60 (ROSENBERG e VAN CAMP, 1970).

O sucesso na clínica do cis-[diamindicloroplatina (II)], cis-[PtCl₂(NH₃)₂], denominado cisplatina, inicialmente em pacientes terminais (HIGBY, WALLACE and HOLLAND, 1973) e, posteriormente em tumores localizados, como no caso de câncer testicular (WALLACE and HIGBY, 1974), ovariano (WILTSHAW and CARR, 1974) e em combinações terapêuticas para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço (KRAKOFF, 1988), bem como, o desenvolvimento de procedimentos clínicos (CVITKOVIC et al., 1977) e a síntese de novos compostos que diminuem a toxicidade renal (MARZANO et al., 2002), têm incentivado o interesse na química destes compostos e outros estreitamente relacionados.

Apesar do intenso trabalho desenvolvido ao longo destes anos (BARNARD et al., 1986), somente poucos análogos avançaram até os testes pré-clínicos e, além da cisplatina apenas mais um, a carboplatina (BARNARD, CLEARE and HYDES, 1989) {Pt [C₄H₆ (CO₂)₂] [NH₃]₂}, [Diamin (1, 1-ciclobutanodicarboxilato) platina (II)], recebeu inicialmente, a aprovação para sua comercialização

Deste modo, uma nova classe dos compostos organometálicos com capacidade de modificar algumas respostas biológicas, particularmente os paladaciclos estabilizados com ligantes bifosfínicos e aminoácidos, foram sintetizados e patenteados por pesquisadores da Universidade de Mogi das Cruzes (CAIRES, ALMEIDA e MAURO, 1999; CARES et al., 2002). Alguns destes compostos têm despertado grande interesse da comunidade científica, não só por

apresentarem estabilidade em meio biológico, mas por possuírem uma citotoxicidade consideravelmente menor que os compostos análogos de platina (NAVARRO-RANNINGER et al., 1993; ALVAREZ-VALDES et al., 2002). Segundo CAIRES et al., estes compostos são citotóxicos contra várias linhagens celulares, como HeLa (cólón do útero), Hep-2 (orofaringe), C6 (glioma cerebral).

Estudos anteriores realizados com um derivado paladaciclo estabilizado com os ligantes bifosfínicos e aminoácido, denominado Paladaciclo ferroceno 1:2, demonstrado na figura 1, mostraram que este novo composto organometálico apresenta alta citotoxicidade para as linhagens leucêmicas Jurkat (leucemia linfóide aguda) e HL60 (leucemia promielocítica humana), obtendo valores de $IC_{50\%}$ menores do que $3,0 \mu\text{M}$ (BINCOLETTTO et al., 2004). Por outro lado, este mesmo composto apresentou uma citotoxicidade significativamente menor ($IC_{50\%} 4,7 \mu\text{M}$) em células progenitoras da medula óssea de camundongos normais, demonstrando desta forma uma maior especificidade contra células leucêmicas (dados não publicados). Considerando o tempo de incubação com o composto, o qual foi de sete dias com as células normais e de 72 horas com as células leucêmicas, podemos sugerir uma maior citotoxicidade para as células malignas. Porém, as ações destes compostos sobre células normais precisam se melhor caracterizadas. Avaliamos também através da fragmentação de DNA o mecanismo de morte celular das células HL60, onde foi possível verificar que o composto paladaciclo é capaz de induzir a apoptose nesta linhagem celular.

Além destes resultados, BINCOLETTTO et al. (2005) também demonstraram que o paladaciclo ferroceno 1:2 apresenta um potencial antitumoral em animais portadores de tumor de Walker, onde foi observada uma maior sobrevida nos animais tratados, associada à diminuição da massa tumoral. Além disso, através da biópsia do fígado, rins e baço, foi verificado uma baixa

toxicidade sistêmica nestes animais, os quais foram tratados com uma dose única de 100 mg/kg por via intraperitoneal e avaliados 14 dias após este tratamento. Levando-se em consideração que o tumor de Walker é metastático e que a catepsina B está diretamente associada à degradação de componentes da matriz extracelular em processos metastáticos (PREMZL et al., 2001; FAN et al., 2002), podemos sugerir que o composto em estudo apresenta atividade inibitória sobre a Catepsina B. Estudos *in vitro*, demonstrando que o paladaciclo foi capaz de inibir a catepsina B extracelular, suportam a hipótese descrita acima (BINCOLETTO et al.; 2005). Entretanto, não podemos deixar de ressaltar que estudos recentes têm demonstrado que a Catepsina B não possui apenas o papel de contribuir para a formação de processos metastáticos (ALMEIDA et al., 1999; ALMEIDA et al., 2000), como descrito anteriormente, mas também é responsável por um importante papel na execução do programa apoptótico em vários tipos de linhagens tumorais (FOGHSGAARD et al., 2001). Esta enzima precisa ser translocada do lisossoma para o citosol, onde degrada proteínas envolvidas na apoptose.

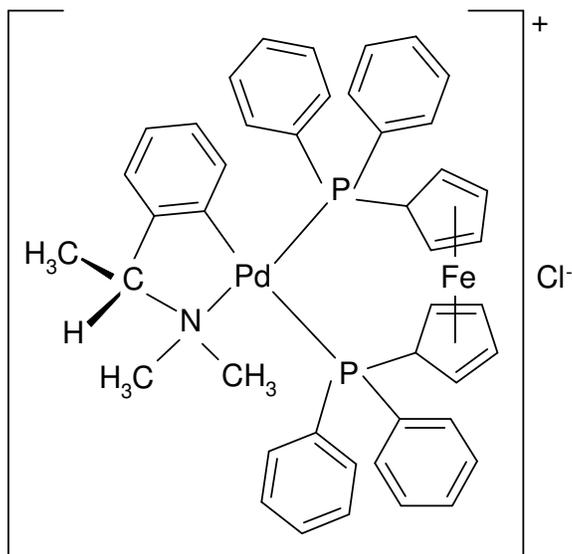


Figura 1. Estrutura química do composto Paladaciclo Ferroceno 1:2

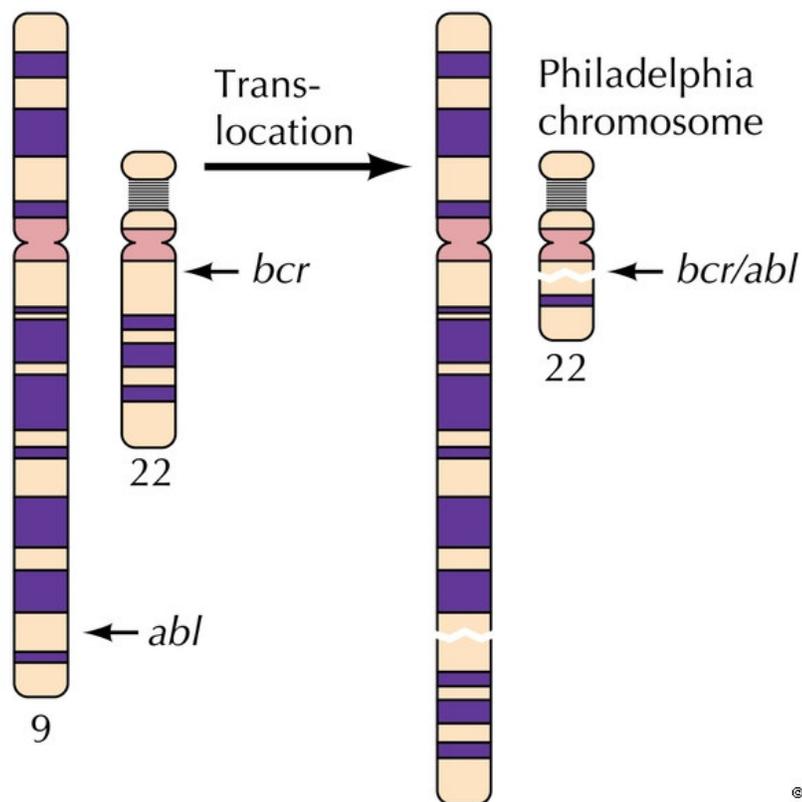
Utilizando modelo de cultura de células hematopoiéticas de longa duração de medula óssea (Sistema de Dexter), ROCHA et al. (2005), demonstraram que este mesmo composto foi capaz de inibir em concentrações mínimas (1,2 μM) a enzima conversora de angiotensina-I (ECA). Esta enzima integra o sistema renina-angiotensina, o qual está presente em vários tecidos, inclusive na medula óssea (HAZNEDAROGLU et al., 2000), sugerindo assim, que o compostos em estudo, em baixas concentrações, é capaz de modular outros sistemas biológicos, como por exemplo, a resposta hematopoiética,, através de suas ações inibitórias sobre a ECA.

Diante do exposto, torna-se claro a necessidade de estudos farmaco-toxicológicos adicionais envolvendo o mecanismo do paladaciclo ferroceno 1:2. Sendo assim, neste projeto um dos nossos objetivos iniciais foi avaliar os possíveis efeitos antineoplásicos deste composto, tão bem como investigar o mecanismo de morte celular envolvido, sobre a linhagem de células

leucêmicas K562 (leucemia mielóide crônica), a qual foi estabelecida de um paciente com leucemia mielóide crônica em fase blástica (KLEIN et al., 1976) e Jurkat (leucemia linfóide aguda), a qual foi estabelecida do sangue periférico de um paciente de 14 anos (SCHNEIDER et al., 1977).

A linhagem celular K562 se torna muito interessante como modelo de estudo por expressar a proteína oncogene Bcr/abl, a qual é responsável em grande parte, pela resistência destas células aos protocolos de quimioterapia antineoplásica (COOPER, 2001; MARTINS et al., 1997). Geralmente células K562 são resistentes a todos os quimioterápicos convencionais nas primeiras 24 horas, em estudos *in vitro* (MARTINS et al., 1997)

A proteína oncogene Bcr/abl origina-se da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, resultando em um cromossomo 22 encurtado, denominado cromossomo Philadelphia (NOWELL et al., 1960; ROWLEY, 1973; MES-MASSON et al., 1986), como mostra a figura 2. Nessa translocação os primeiros exons do gene c-bcr, localizado no cromossomo 22, são fundidos aos exons 2-11 do gene c-abl, oriundo do cromossomo 9. Assim como as outras translocações envolvendo c-abl, a proteína Bcr-abl, apresenta intensa atividade de tirosina-quinase, limitando desta forma, a eficácia de muitos quimioterápicos que tentam induzir a apoptose nos tratamentos da leucemia mielóide crônica (BEDI et al., 1995). Além disso, a expressão de Bcr-Abl é suficiente para transformar células hematopoiéticas em células leucêmicas (DALEY et al., 1988).



© 2000 ASM Press and
Sinauer Associates, Inc.

Figura 2. O oncogene *abl* é translocado do cromossomo 9 para o cromossomo 22, formando o cromossomo Philadelphia nas leucemias mielogênicas crônicas. O mRNA *Bcr/abl* é traduzido para produzir uma proteína de fusão recombinante *Bcr/Abl* (COOPER, G., *A célula*, 2^o ed., Artmed® Editora LTDA, 2001).

Utilizando inicialmente esta linhagem celular é que muitos alvos foram identificados e novas drogas foram desenvolvidas, a exemplo do mesilato de imitanibe (Gleevec®), o qual atua especificamente sobre a proteína oncogene *Bcr/abl*, revolucionando assim, o tratamento da leucemia mielóide crônica (COOPER, 2001; ZHELEV et al., 2004).

Sendo assim, o estudo da participação de modulação de expressão gênica tem merecido bastante atenção da comunidade científica, uma vez que está bem documentado na literatura que

os oncogenes participam ativamente no desenvolvimento tumoral, pois suas moléculas protéicas participam diretamente no controle da proliferação, diferenciação e/ou morte celular. Desta forma, um aspecto importante que avaliamos nas linhagens K562 e Jurkat, foram os efeitos do composto paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a expressão de genes que controlam a morte celular programada (apoptose) como Bcl-2, o qual inibe este processo, impedindo a liberação do citocromo *c*, quando altamente expresso (KOSHIDA et al., 1997; KLUCK et al., 1997), e Bax, cuja elevada expressão facilita a liberação do citocromo *c* com ativação das caspases efetoras da apoptose (PASTORINO et al., 1998). O citocromo *c*, uma proteína que está presente no espaço intramembranoso, quando deslocado para o citosol, ativa uma protease apoptótica denominada fator 1. O novo complexo, chamado apoptosoma (ACEHAN et al., 2002), pode então ativar a caspase 9, a qual é responsável pela execução da apoptose (CHANDRA, SAMAMLI and ORRENIUS, 2000; CAI, YANG and JONES, 1998; ZOU et al., 1997; LI et al., 1997). A figura 3 demonstra resumidamente este processo.

O estudo da apoptose celular dentro da área oncológica é de grande importância, pois alterações neste processo programado de morte celular estão relacionadas à resistência à quimioterapia.

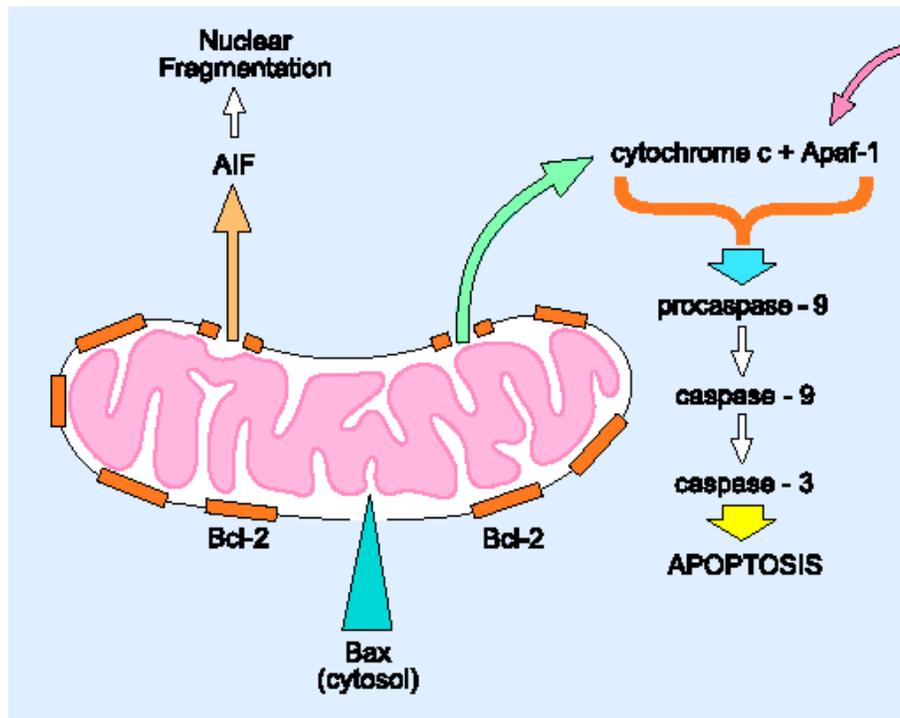


Figura 3. O balanço Bcl-2/Bax está diretamente relacionado com o processo apoptótico. A diminuição da expressão de Bcl-2 com aumento da expressão de Bax facilita a liberação do citocromo *c* para o citosol onde ocorre então a ativação da cascata de ativação das caspases e finalmente a execução da apoptose celular (COOPER, G., *A célula*, 2º ed., Artmed® Editora LTDA, 2001

A apoptose é um processo muito bem controlado e programado que pode ser induzido tanto em condições fisiológicas quanto patofisiológicas, e é caracterizado por fenômenos específicos como, por exemplo, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e morte celular (SQUIER, SEHNERT and COHEN, 1995; HAIDARA et al., 2002). Já, a necrose é um processo acidental com resultados de lesões sérias ou agudas incluindo anóxia, hipóxia, isquemia, exposição a metabólitos tóxicos, trauma direto na célula e ou desintegração da membrana

citoplasmática (SCHWARTZMAN et al., 1993; KROEMER et al., 1998). Estes eventos podem ser rapidamente visualizadas na figura 4.

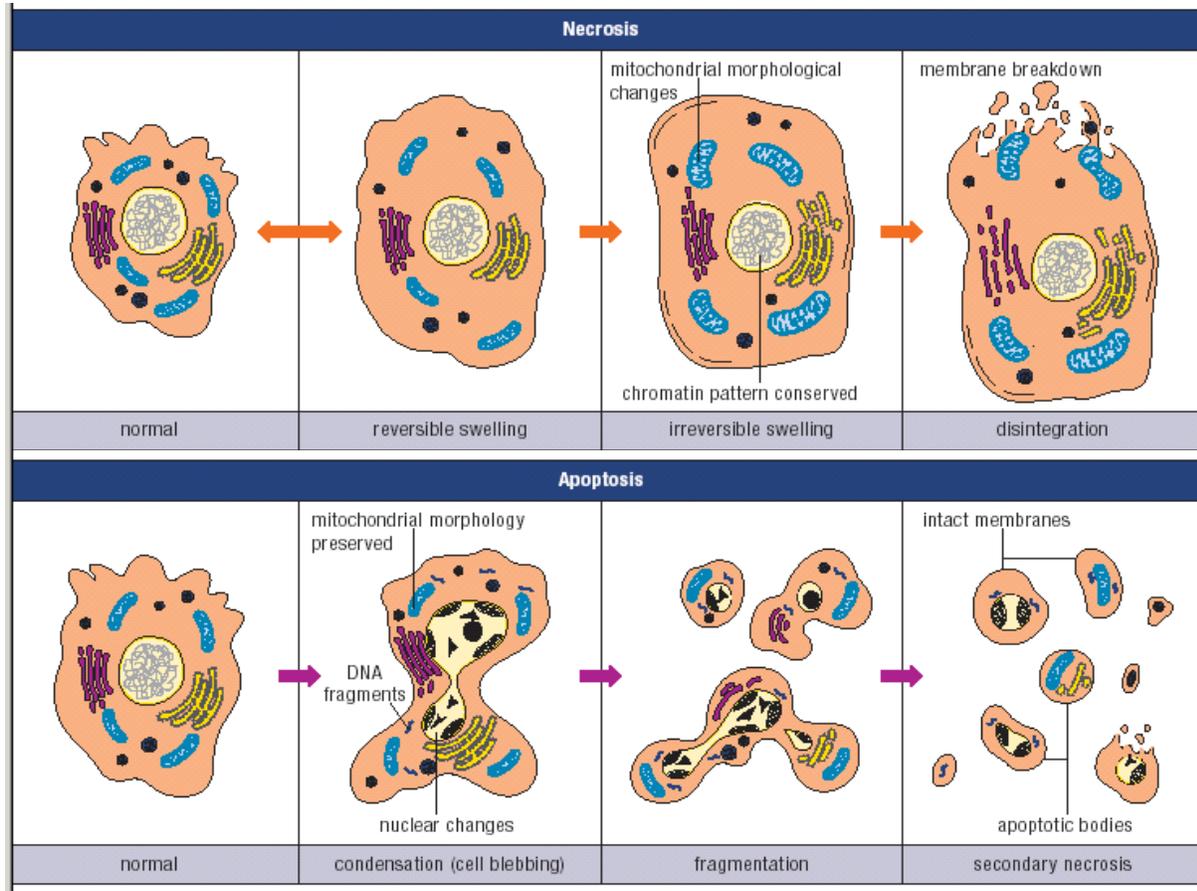


Figura 4. Verifique que no processo de necrose ocorre a degradação da membrana celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte celular. Por outro lado, a apoptose é um processo gradual onde há conservação da membrana plasmática com fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, os quais são removidos silenciosamente por células fagocíticas (www.bioagency.com.br, capturado em 10/07/06)

As alterações celulares ocorridas no processo apoptótico são controladas em parte, por proto-oncogenes e genes supressores de tumor (COOPER et al., 2001). No caso do proto-

oncogene *Bcl-2*, uma proteína da membrana mitocondrial que tem como principal função a inibição da apoptose celular (HOCKENBERY et al., 1991; KORSMEYER, 1992 e KROEMER, 1997), seu estudo torna-se fundamental, uma vez que sua contínua ativação parece exercer um papel direto na patogênese das leucemias agudas (MAUNG et al., 1994, BINCOLETTO et al., 1998). Neste sentido, BINCOLETTO et al. 1998 demonstraram que a elevada expressão do proto-oncogene *Bcl-2* e a presença de autoproliferação celular estão associados a uma menor sobrevida de pacientes leucêmicos, indicando que a avaliação da expressão do *Bcl-2* em células indiferenciadas constitui um marcador de morte celular. Vários estudos evidenciam diversas maneiras de *Bcl-2* em bloquear a apoptose, incluindo inibição da mobilização de cálcio, ação antioxidante através de alterações nos níveis de glutathione e ativação de caspases efetoras e executoras da apoptose (VOEHRINGER, 1999; REED, 1998). Recentemente, DAI et al., (2004) reportou que *Bcl-2* quando colabora com *bcr/abl* promove um tumor mais agressivo. Entretanto, um aumento na expressão de *Bcl-2* foi observado em células K562 resistentes ao mesilato de imatinibe com uma diminuição da expressão de *Bcr/Abl* (DONATO et al., 2001), porém, este fenômeno ainda está sendo investigado.

A apoptose ainda pode ser mediada também pelos membros da família de receptores de morte, como fator de necrose tumoral, Fas e TRAIL. Estes receptores uma vez ativados por seus ligantes naturais TNF α , FasL e TRAIL, respectivamente, ativam as caspases efetoras e executoras, induzindo assim a apoptose (SPRICK et al., 2000).

Outro fenômeno importante, a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), foi caracterizada por HUNTER et al., 1976 como uma permeabilização reversível da membrana mitocondrial induzida pelo cálcio (Ca²⁺) (BERNARDI, 1996; ZORATTI and SZABO, 1995). A lista de agentes que promovem o início da MPT é longa (GUNTER and PFEIFFER, 1990).

Notavelmente, o Ca^{2+} , quando transportado para o interior da mitocôndria; fosfato inorgânico, espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma variedade de substâncias oxidantes, induzem o início da MPT e subsequente morte celular. Com a MPT, há a liberação do citocromo *c*, ativação da caspase 9 e 3, e conseqüente apoptose, conforme descrito anteriormente. Entretanto, o MPT causa ambos os processos, apoptose e necrose, com um único fator determinante para o tipo de morte celular. A apoptose requer adenosina tri-fosfato (ATP) (EGUCHI, SHIMIZU and TSUJIMOTO, 1997; LEIST, et al., 1997), porém com a diminuição dos níveis de ATP durante o processo, há formação de necrose secundária, freqüentemente associada com apoptose, conforme demonstrado na figura 5. O fenômeno envolvido na transição da permeabilidade mitocondrial, o qual pode resultar em apoptose ou necrose pode ser chamado de necrapoptose. O novo termo necrapoptose, parece um processo que se inicia com comuns sinais de morte ou estresse tóxico, porém culmina em lise celular (morte celular por necrose) ou morte celular programada (apoptose), dependendo de fatores modificantes (LEMASTERS et al, 1999). Com a MPT, muitas proteínas mitocondriais, incluindo o citocromo *c*, podem desencadear a apoptose. A MPT pode ainda ser acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GREEN and REED, 1998).

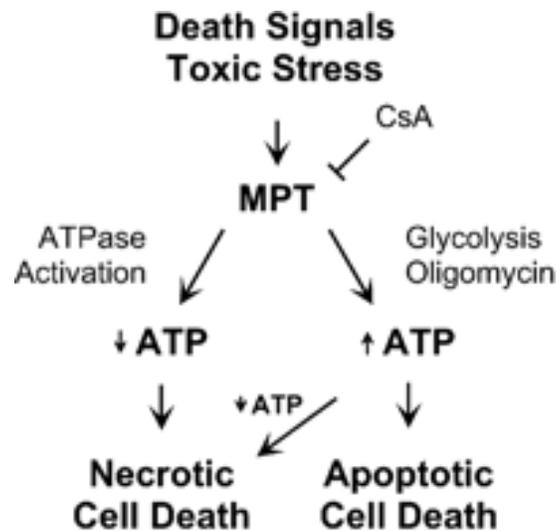


Figura 5. Papel do ATP na determinação da morte celular apoptótica ou necrótica (LEMASTERS, J., 1999)

ROS incluem moléculas como oxigênio, radicais livres, superóxidos, e peróxidos hidrogenados. ROS são continuamente produzidos como produtos da cadeia respiratória mitocondrial em células saudáveis. Estima-se que 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria são convertidos à ROS (YU et al., 2006). A geração de ROS tem sido demonstrada como causa de vários tipos de morte celular (LAURENT et al., 2005; VALENCIA et al., 2004), entretanto seu papel na morte celular autofágica ainda não foi bem determinado.

Recentemente, importância crescente está sendo atribuída à participação dos lisossomas no processo de morte celular programada. Por muitos anos, a literatura científica mencionava os lisossomas apenas como importantes organelas envolvidas na morte celular autofágica e necrótica, tendo como único papel na apoptose a digestão dos corpos apoptóticos (FERRI and KROEMER, 2001; LEIST and JAATTELA, 2001). Atualmente sua participação na indução da apoptose é já um fato confirmado cientificamente (GUICCIARDI et al., 2004). Na verdade, a

ruptura ou a parcial permeabilização da membrana lisossomal com subsequente liberação de enzimas proteolíticas para o citosol, tem uma ativa contribuição para a iniciação e execução do programa apoptótico, têm sido recentemente descrito em vários modelos de apoptose. Este fenômeno está sendo largamente reconhecido, e a “apoptose via lisossomal” é agora seguramente aceita. O principal fator para determinação do tipo de morte celular (necrose ou apoptose) mediada pelas enzimas lisossomais parece estar relacionado com a permeabilização lisossomal, e conseqüentemente, a quantidade de enzimas proteolíticas lançadas para o citosol (LI te al., 2000). A completa ruptura desta organela e a liberação de uma alta concentração de enzimas lisossomais para o citosol resultam em necrose, já uma parcial permeabilização da membrana lisossomal pode levar a apoptose (BURSCH, 2001; TURK et al., 2002). Uma grande variedade de estímulos de morte pode desencadear uma parcial permeabilização da membrana lisossomal (FEHRENBACHER and JÄÄTTELÄ, 2005; GUICCIARDI et al., 2005).

Segundo GIUCCIARDI et al (2004), a permeabilização da membrana lisossomal com conseqüente indução de apoptose, pode ser desencadeada por drogas com características lisossomotrópicas. Estudos realizados em paralelo ao desenvolvimento deste projeto demonstraram que o paladaciclo ferroceno 1:2 possui uma constante de dissociação (pK_a) de aproximadamente 5,1 – 6,5 (BARBOSA et al.; 2006), conforme figura 6, e quando em contato com pH ácido, ele adquire caráter básico por ser capaz de receber prótons, sugerindo que estas características estão presentes na molécula deste composto. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual o lisossoma está envolvido na apoptose ainda é vastamente desconhecido, e atualmente está sendo intensamente investigado.

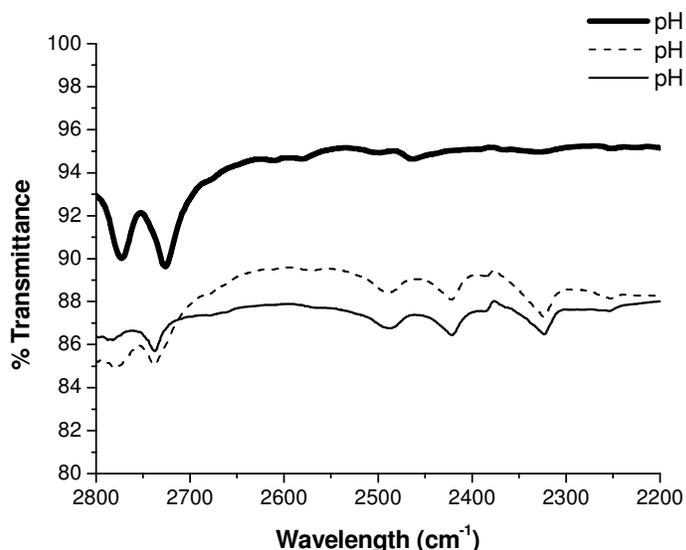
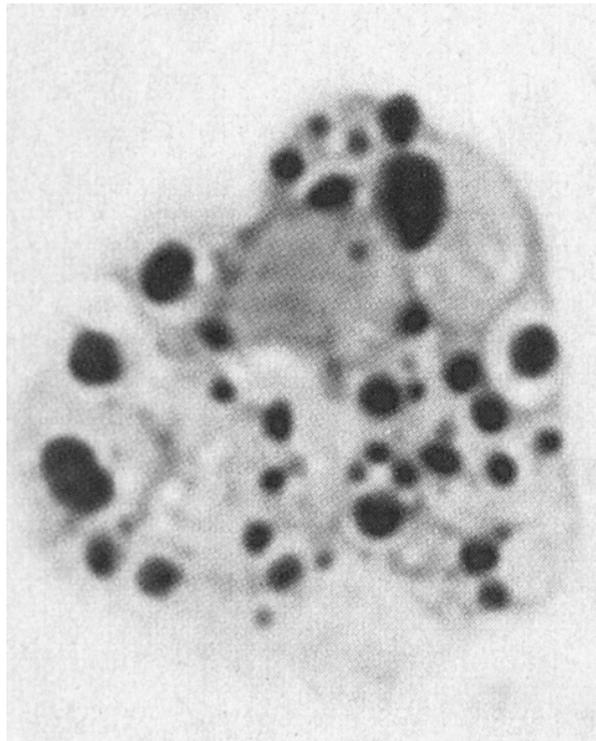


Figura 6. Determinação do pK_a do composto paladaciclo ferroceno 1:2, o qual foi estimado em 5,1 – 6,5, sugerindo características lisossomotrópicas com conseqüente aprisionamento iônico (BAROBOSA et. al., 2006).

Diante do exposto, este trabalho teve como enfoque central avaliar o potencial antileucêmico do composto citado acima e identificar os possíveis mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos neste processo. Para a realização deste estudo foi utilizada a linhagem de leucemia mielogênica crônica K562, a qual expressa a proteína oncogene Bcr/abl e a linhagem de leucemia linfóide aguda Jurkat. A linhagem leucêmica K562 foi escolhida, como citado anteriormente, uma vez que estas células apresentam grande resistência aos quimioterápicos convencionais e, além disso, a leucemia mielódica crônica acomete mais de 4.500 mil pessoas anualmente só nos Estados Unidos da América (MOW et al., 2001), deixando claro a necessidade de desenvolvimento de novas drogas para o seu tratamento.



2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Neste trabalho, um dos nossos objetivos iniciais foi avaliar os possíveis efeitos antineoplásicos do composto paladacilo ferroceno 1:2, através do estudo do mecanismo de morte celular envolvida, sobre as linhagens de células leucêmicas K562 (leucemia mielóide crônica) e Jurkat (leucemia linfóide aguda).

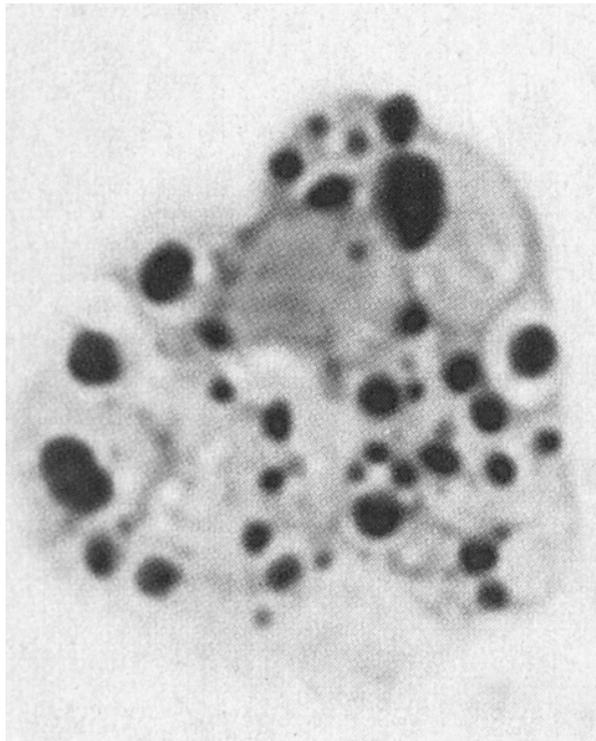
Objetivos específicos:

Em células de leucemia mielóide crônica (K562)

- Citotoxicidade através da técnica de exclusão por Azul de Trypan e teste de redução do MTT a cristais de formazan .
- Expressão dos proto-oncogenes Bcl-2 e Bax pela técnica de Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR).
- Capacidade de indução de apoptose através da técnica de fragmentação de DNA e coloração nuclear e citoplasmática com *acridine orange* e revelação por microscopia de fluorescência,
- Ativação das caspases 3 e 6 utilizando kits de proteases colorimétricos (R & D Biosystems).
- Permeabilização da membrana lisossomal com conseqüente liberação das catepsinas para o citoplasma através de microscopia *confocal a laser*.

Em células de leucemia linfóide aguda (Jurkat)

- Expressão do proto-oncogene Bcl-2 através da técnica de imunocitoquímica (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase – APAAP)
- Capacidade de indução de apoptose através da técnica de fragmentação de DNA



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Paladacilo ferroceno 1:2:

O complexo paladacilo ferroceno 1:2 foi sintetizado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Fávero Caires do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB) da Universidade de Mogi das Cruzes (Brazilian Patent – PI 0204160) (CAIRES et al.; 2002; BINCOLETTO et al.; 2005).

3.2. Manutenção das células K562 e Jurkat

As células K-562 e Jurkat foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, sob coordenação do Prof. Dr. Radovan Borojevic e foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). Semanalmente estas células foram expandidas para a realização de experimentos e congelamento.

3.3. Avaliação da citotoxicidade basal através dos métodos de redução do MTT e técnica de exclusão por Azul de trypan.

- Teste de redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] a cristais de Formazan:

O teste de redução MTT [3-(4,5, dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em um “screening” inicial

para novas drogas (TRUTER, SANTOS and ELS, 2001). Este teste é amplamente usado para avaliar a proliferação e viabilidade celular. Sua interpretação serve de indicativo da atividade metabólica celular, e o local de ocorrência das reações redox inclui tanto mitocôndrias como o citosol (TAKAHASHI et al.; 2002). A redução do sal de MTT a cristais de formazan pela enzima succinato-desidrogenase resulta em cristais azuis insolúveis. A intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (SCUDIERO, SHOEMAKER and PAULL, 1988).

Protocolo: Células da linhagem K562 foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640, contadas em câmara hemacitométrica e a concentração de células ajustadas para 3×10^5 células/well. A seguir, concentrações seriadas do Paladacilo ferroceno 1:2 foram adicionadas em cada well. A placa foi então incubada em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Após 72 horas, 10 µL da solução MTT (5 mg/ml) foram adicionados em cada well. Após 4 horas, o *pellet* formado pelos cristais de formazan no fundo da placa foi dissolvido com 100 µL de isopropanol ácido. A densidade óptica foi medida através do leitor de microplaca (Biotek) em 630 nm. Foram realizados três testes independentes em triplicata. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por well (com droga)}}{\text{Absorbância do controle (sem droga)}} \times 100$$

- *Viabilidade celular através do método de exclusão com Azul de Trypan:*

O Azul de Trypan é amplamente empregado em pesquisas para avaliar a viabilidade celular (BOSCHERT et al.; 2002; PINSKI et al.; 2002). Em células normais, este corante é capaz

de atravessar suas membranas, sendo expulso em seguida para o meio extracelular. Porém, células em processo de morte celular programada não conseguem expulsar o corante para o meio extracelular, mantendo assim a cor azul. Portanto, as células que apresentarem coloração azul após a incubação com compostos paladaciclos, podem ser consideradas inviáveis (GAIL et al; 2000).

Protocolo: Após incubação das células K562 (1×10^5 células/mL) com várias concentrações do Paladacilo ferroceno 1:2 por 72 horas, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI 1640. Após isso, as células foram diluídas (1:10) em corante de Azul de Trypan e a contagem das células inviáveis foi realizada em câmara hemocitométrica utilizando microscópio óptico 400 X (Zeiss).

3.4. Avaliação da apoptose celular através do aspecto morfológico em microscopia de fluorescência após marcação com *acridine orange* e fragmentação de DNA.

3.4.1. Fragmentação de DNA

Protocolo: Após a incubação das células K562 e Jurkat com diferentes concentrações do Paladacilo ferroceno 1:2 por 72 horas a 37°C, em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar, estas foram removidas e lavadas 3 vezes em meio RPMI. Após isto, as células foram incubadas *overnight* em banho-maria a 65°C, com tampão STE, SDS e proteinase K. No dia seguinte foram incubadas com RNase em banho-maria a 37°C por 1 hora. Para purificação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13400rpm com fenol e clorofórmio isoamílico. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e esta reação foi repetida. A seguir, foi adicionado acetato de sódio e etanol 100% gelado e deixado em freezer -70°C por meia hora. Após isto, a

reação foi centrifugada enxaguada com etanol 70%. Após 2 dias em geladeira com Tris EDTA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Após coloração com brometo etídeo o DNA foi visualizado sob luz ultra-violeta.

3.4.2. Avaliação da apoptose celular através do aspecto morfológico em microscopia de fluorescência após marcação com *acridine orange* em células leucêmicas K562

O corante *acredine orange* associado à microscopia de fluorescência também foi utilizado para visualizarmos as características das células apoptóticas. *Acaredine orange* é um intercalante específico de ácidos nucleicos, fluorocromo, cujo emite fluorescência verde quando se encontra incorporado do DNA (MISHEL et al., 1980; MPOKE and WOLFE, 1977). Visualizando por microscopia fluorescente, células viáveis apresentam seu núcleo verde fluorescente com sua estrutura intacta, enquanto as células apoptóticos apresentam seu núcleo verde fluorescente intenso devido a condensação da cromatina com conseqüente maior incorporação co corante. Para este experimento, 1µL da solução estoque contendo 100µg/mL do corante *acredine orange* foi adicionada em 25µL de células K562 (3×10^5 células/mL) em suspensão e em seguida visualizadas em microscopia fluorescente (520nm – 560nm).

3.5. Expressão de Bcl-2 e Bax através da reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR):

Protocolo: A linhagem leucêmica K562 foi mantida em meio RPMI- 1640 (Cultilab) e repicada semanalmente para congelamento e avaliação da expressão e transcrição de *Bcl-2* e *Bax*. Para a realização dos experimentos, as células K562 foram centrifugadas (10 min. – 1500 rpm) e

a seguir incubadas com diferentes concentrações do composto Paladaciclo ferroceno 1:2. Após 72 horas de incubação, as células foram removidas da estufa, lavadas (3x) em meio RPMI 1640, e por fim ressuspendidas em 1mL de Trizol™ Gibco BRL.

3.5.1. Purificação de RNA

Em seguida, adicionamos 200µL de clorofórmio, agitamos vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 2-3 minutos para separar a fase aquosa que contém o RNA. Em seguida, centrifugamos por 15 minutos a 14000g, recolhemos a fase aquosa, transferimos para outro tubo, adicionamos 500µL de álcool isopropílico e deixamos em repouso por 10 minutos para precipitação do RNA, e após este tempo, centrifugamos por 10 minutos a 14000g, descartamos o sobrenadante e lavamos o *pellet* em 1mL de etanol 75%. Por fim, centrifugamos por 10min. a 14000g, descartamos o sobrenadante, deixamos secar bem o *pellet* e, finalmente ressuspendemos em água DEPEC. Por espectrofotometria, a 260nm, foi quantificado o RNA total.

3.5.2. Síntese de cDNA

Os cDNAs foram preparados a partir da metodologia descrita por EHLERS & SMITH (1991) e, para tal finalidade, utilizamos 1µg de RNA total. Resumidamente, realizamos a reação em tampão Tris-HCL (50mM; pH 8,3), 40mM KCl, 6mM MgCl₂, 1mM dNTP, 60g random primer, 40U inibidor de RNase, 400U de MLV (transcriptase reversa) (Invitrogen) e água DEPEC. O anelamento com o primer foi realizado a 65°C por 10 minutos e, a síntese

propriamente dita, ocorreu a 37°C por 60 minutos. Ao final, elevamos a temperatura até 95°C, por 5 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.5.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

A reação de amplificação de fragmentos específicos de c-DNA foi feita pela metodologia do PCR. Foram utilizados primers murinos para β -actina, Bcl-2 e Bax. A reação de PCR consistiu em: tampão de PCR 10x, 1,5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 200nM primers, 2,5 μ L da amostra de cDNA e 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídeo por 10 minutos, em seguida, colocado em água corrente por 5 minutos para remover o excesso de brometo e finalmente analisado por transluminação (ultravioleta).

Condições do PCR:

Bcl-2 – 319 pb: 5 min. 94°C para denaturação; 30 ciclos: 94°C 1 min; 56°C 1min; 72°C 1 min e final de 72°C por 10 min.

Bcl-2 primer 5'- 5'- GGACAACATCGCCCTGTG – 3'

Bcl-2 primer 3'- 5'- AGTCTT+CAGAGACAGCCAGGA – 3' (OSORIO et al., 1997)

Bax – 488 pb: 5 min. 94°C para denaturação; 30 ciclos: 94°C 1 min; 55°C 2 min; 72°C 3 min. e final de 72°C por 10 min.

Bax primer 5'- 5'- TCTGGATCACCTTCTGCTGG-3'

Bax primer 3' - 5' - GATTGCTCAGGACATTTCTG - 3' (OSORIO et al., 1997)

Beta-actina - 540 pb: 5 min. 94°C para denaturação; 30 ciclos: 94°C 1 min; 65°C 1 min; 72°C 1 min e final de 72°C por 10 min.

Beta-actina primer - 5' - GTGGGCCGCTCTAGGCACCA - 3'

Beta-actina primer - 5'CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC - 3' (ALONSO et al., 1986)

3.6. Avaliação da expressão do gene Bcl-2 através da técnica imunocitoquímica (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase – APAAP) em células Jurkat

O princípio de todos os métodos imunocitoquímicos ou imunohistoquímicos é a identificação de antígenos celulares ou teciduais por uma reação antígeno-anticorpo “in situ”, visualizadas por moléculas reveladoras, tais como fluorocromos, enzimas e partículas de ouro coloidal ou pelos vários sistemas de detecção.

Protocolo: Incubamos as células Jurkat com várias concentrações do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,1; 2,3; 3,5; 4,7 e 5,9 µM) por 72 horas a 37° C, em estufa úmida com 5% de Co₂ no ar. As células foram incubadas com 80% de meio RPMI e 20% de soro fetal bovino.

Após este período, as células foram centrifugadas a uma temperatura de 20°C, 1500rpm por 10 min; e ressuspendidas em meio RPMI. Logo a seguir, as células foram diluídas (1/10) em Azul de Trypan e a contagem das células viáveis e inviáveis foram realizadas em câmara hemocitométrica.

Após isto, o citospin foi realizado colocando-se 90L em cada suporte de filtro citológico e centrifugando-se (5min – 800rpm). No dia seguinte, as lâminas foram fixadas em acetona gelada

por 10 min e hidratadas com tampão TBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro suíno por 20min. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (Bcl-2) por 2 horas, anticorpo biotilado por 45min e complexo ABC por 45min. Logo após, foi realizada a coloração com substrato cromógeno fast red. A contracoloração foi efetuada com Hematoxicilia de Mayer e água amoniacal por alguns segundos. As lâminas foram montadas com glicerol para leitura em microscopia óptica. Foi determinada a intensidade da expressão do proto-oncogene Bcl-2 através da comparação entre controle e células tratadas (MAUNG et al., 1994).

3.7. Avaliação da permeabilidade da membrana lisossomal através de microscopia confocal a laser em células K562

A presença de grupos hidrofóbicos tão bem como o grupo amina na estrutura do composto Paladacilo ferroceno 1:2 (figura 1), sugere que esta molécula tem propriedades lisossomotrópicas. A molécula deste composto, em pH ácido lisossomal , pode se acumular no interior do lisossoma, induzindo uma ruptura da membrana lisossomal e apoptose. Para observar as propriedades lisossomotrópicas no novo composto Paladacilo ferroceno 12, utilizamos o corante *acridine orange* e para isto nos baseamos em métodos já demonstrados na literatura (OLSSON et al., 1989; RUNDQUIST. et al., 1984; ZDOLZEK et al., 1999). *Acridine orange* apresenta a característica de se acumular em aparatus vacuolares ácidos, principalmente nos lisossomas secundários. *Acridine orange* é um corante metacromático, que quando excitado com luz azul de 488 nm, apresenta emissão de cor vermelha nos lisossomos, em elevada concentração, e também emite na cor verde, em baixa concentração, (no citosol e núcleo celular). A ruptura

inicial do lisossoma pode ser monitorada pelo aumento da emissão da fluorescência verde, e a diminuição da fluorescência vermelha (BRUNK and SVENSSON, 1999; ANTUNES et al., 2001)

Para a realização dos experimentos, as células K562 foram incubadas com 5µg/mL de AO, por 15min a 37°C e 5% de CO₂ no ar. Após isto, as células foram lavadas com meio RPMI 1640 e incubadas com 6.0 µM do composto Paladaciclo por 5 horas a 37°C com 5% de CO₂ no ar. Os sinais fluorescentes do corante *acredine orange* foram analisados em microscopia confocal a laser (510nm), modelo Zeiss LSM (Jena, Germany).

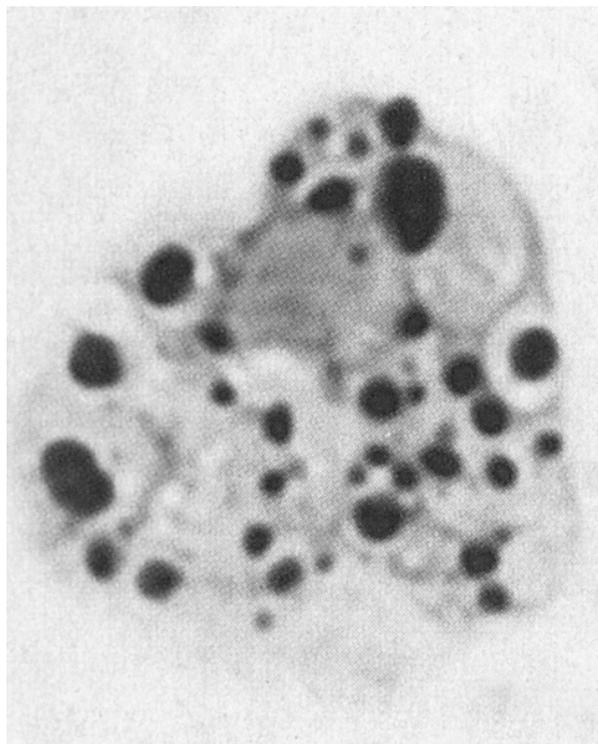
3.8. Determinação da ativação das caspases 3 e 6 através de kits de proteases colorimétricos (R & D Biosystems) em células K562.

As medidas da atividade de caspase foram realizadas usando kits colorimétricos de protease (R&D Systems, USA) de acordo com as especificações do fabricante. O experimento de atividade da caspase é baseado na detecção do cromóforo p-nitroanilina (pNA) liberado após hidrólise dos substratos cromogênicos X-pNA. Onde X, DEVD e VEID, é a sequência de aminoácidos reconhecida pela caspase-3 e -6, respectivamente. Para os experimentos, as células K562 foram incubadas com o paladaciclo por 5 e 72 horas nas concentrações de 1,2, 3,6, e 6,0 µM. Cerca de 2x10⁶ células foram coletadas por centrifugação e lisadas por congelamento e descongelamento. A concentração de proteína do lisado celular foi determinada por kits de dosagem de proteína da Bio-Rad (método de Bradford). Foram incubadas 200µg de proteína do lisado celular com o substrato cromogênico X-pNA 4 mM a 37°C em microplacas num volume final de 150µL. O aumento na atividade de caspase foi determinado por medida de absorvância a 405 nm, comparando os resultados com os níveis do controle não tratado com paladaciclo.

Em paralelo, avaliamos também a atividade das caspases 3 e 6 após a incubação das células com o inibidor de catepsina B (CA-074), uma vez que esta enzima representa 80% de todas as catepsinas existentes no lisossoma. Desta forma, fizemos uma pré-incubação das células K562 com o inibidor da Catepsina B, o CA-074 (5,0 μM) por 2 horas antes de adicionarmos o composto paladaciclo (6,0 μM). A seguir a este procedimento, a atividade das caspases 3 e 6 foi novamente avaliada conforme descrito acima.

3.9. Análises estatísticas

Para cada ensaio foram realizados experimentos em triplicata. Utilizamos o modelo de Análise de Variância (ANOVA). As múltiplas comparações entre os grupos foram avaliadas pelo teste posterior de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. O programa que foi utilizado para determinarmos o valor do $\text{IC}_{50\%}$ (concentração que inibiu 50% da viabilidade) foi o “Origin”.



4. RESULTADOS

Avaliação da citotoxicidade do composto paladaciclo ferroceno 1:2 em células leucêmicas K-562, pelo teste de exclusão com azul de trypan e através do método de redução do MTT-tetrazolium [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)]:

A avaliação do número de células viáveis para o estudo da atividade citotóxica de novas drogas é freqüentemente aplicada no ensaio preliminar envolvendo a caracterização da atividade anticancerígena de novas drogas. A diminuição do número de células pode ocorrer devido à inibição da proliferação celular ou ainda em decorrência do processo de morte celular (indução de apoptose ou necrose) (ERDAL et al., 2005).

Os testes de redução do MTT à formazan e exclusão por azul de trypan nos permitiram observar a citotoxicidade do composto Paladaciclo na linhagem celular leucêmica K562. Podemos observar através da figura 7, que o composto foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular nas concentrações de 4,1 e 2,9 μM , respectivamente. Desta forma, este composto demonstrou ser ativo em doses mínimas para esta linhagem celular. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle.

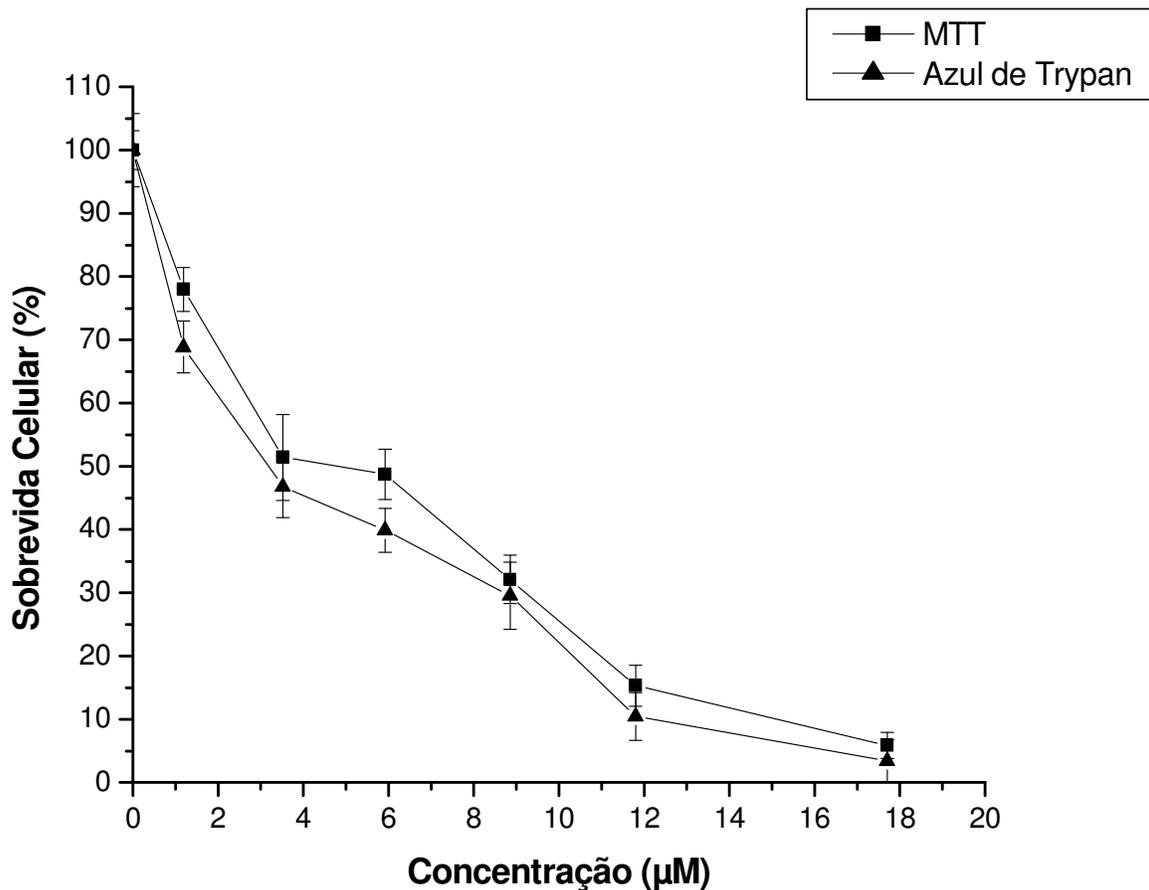


Figura 7 : Efeitos citotóxicos do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a linhagem de células leucêmicas K562. As células K562 foram incubadas por 72 horas com diferentes concentrações do composto Paladaciclo (1,18; 3,52; 5,92; 8,85; 11,8 e 17,7 µM). Os experimentos foram realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão. Foram obtidos IC₅₀% 2,9 e 4,1 µM no teste de exclusão por Azul de Trypan e método de redução do MTT, respectivamente.

Avaliação da apoptose celular através do aspecto morfológico em microscopia fluorescente e fragmentação nuclear das células leucêmicas tratadas com o paladaciclo ferroceno 1:2

Por meio do teste de fragmentação de DNA observamos que em doses mínimas, este composto foi capaz de induzir a apoptose nas células K562 e Jurkat. Conforme verificamos na figura 8 A, em todas as concentrações testadas (1,2; 3,6 e 6 μM) nas células K562, ocorreu a clássica característica de fragmentação de DNA, após 72 horas de tratamento. Nas células Jurkat o resultado foi similar, ocorrendo a fragmentação de DNA já na concentração de 3,6 μM , conforme podemos observar através da figura 8 B.

Nas células K562, a ocorrência de apoptose foi também confirmada através da avaliação morfológica após incubação com o corante *acredine orange*, onde podemos observar claramente a presença de características específicas do processo de apoptose, como condensação da cromatina, a qual está expressa pelas áreas de fluorescência verde intensa. Além disso, ainda há formação de corpos apoptóticos, específicos do processo (figura 8 C).

Estes resultados sugerem que a citotoxicidade induzida pelo composto paladaciclo nas células leucêmicas K562 e Jurkat é mediada por um processo apoptótico. A diminuição da viabilidade celular demonstrada no teste de exclusão por azul de trypan também sugere fortemente que a morte celular observada nestas linhagens não é por necrose.

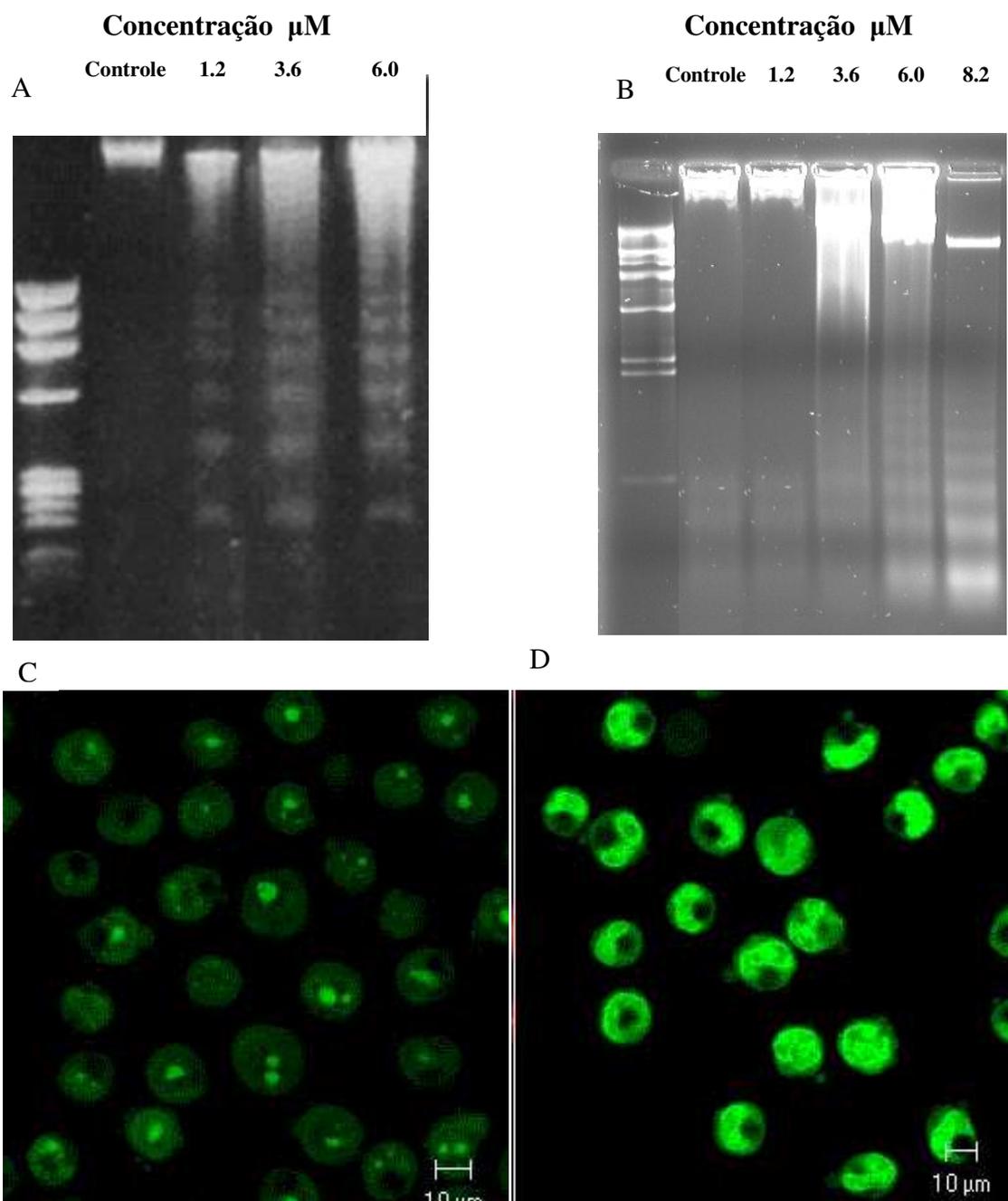


Figura 8. Fragmentação de DNA de células K562 (A), e de células Jurkat (B), ambas tratadas com paladacyclo por 72 horas, o que indica indução de morte celular programada. Confirmação da ocorrência deste processo em células K562 através de avaliação do aspecto morfológico nas primeiras 5 horas após incubação com a droga (D). Note que todas as células apresentam característica de apoptose como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. C – controle sem tratamento.

Avaliação da expressão do gene Bcl-2 através da técnica imunocitoquímica (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase – APAAP) em células Jurkat

Após contagem das lâminas, determinamos a porcentagem de células positivas presentes e intensidade da coloração por meio de escala de 5 pontos. Por meio deste experimento, podemos observar que não houve diferença estatística na intensidade de coloração entre as células controle (figura 9 A) e células tratadas com 1,18; 2,36; 3,55; 4,73 e 5,92 μM (figura 9 B) (média de pontuação =3), conforme tabela 1, indicando que o composto não foi capaz de modular a expressão da proteína oncogene Bcl-2 em células Jurkat.

Tabela 1. Avaliação qualitativa da intensidade de expressão do proto-oncogene Bcl-2 em linhagem leucêmica Jurkat na presença do composto paladaciclo ferroceno 1:2.

Paladaciclo	Concentração (μM)	Intensidade da expressão	Controle
Paladaciclo Ferroceno 1:2	5,92	+ + +	+ + +
	4,73	+ + +	
	3,55	+ + +	
	2,36	+ + +	
	1,18	+ + +	

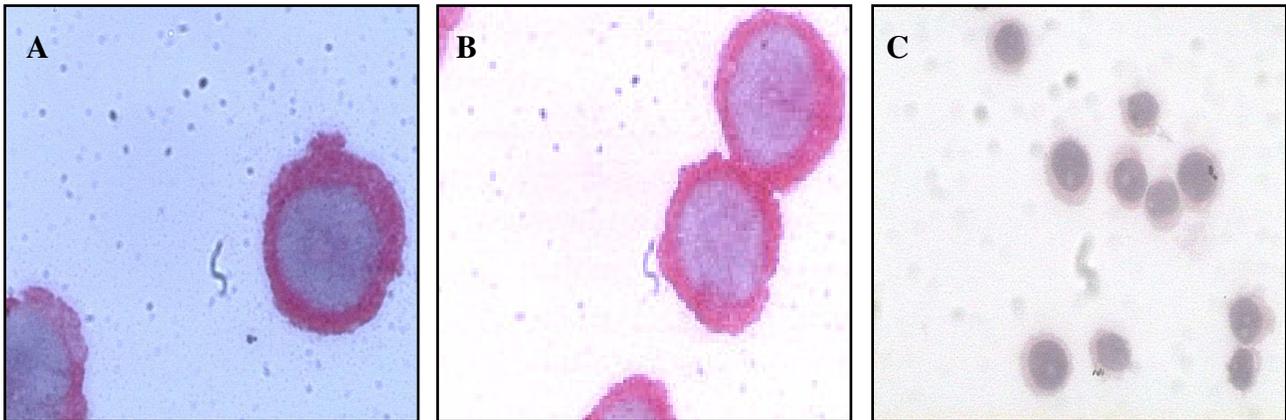


Figura 9. Expressão de Bcl-2 em células Jurkat verificada através da técnica de imunocitoquímica. Células controle (A), células após 72 h de tratamento com o composto (6.0 μM) (B) e controle positivo (C). Através deste método podemos observar que o composto não foi capaz de modular a expressão do gene Bcl-2 nestas células. Foram realizados experimentos em triplicata.

Avaliação da capacidade do composto paladaciclo em modular a expressão dos genes Bcl-2 e Bax em células K562

Sabe-se que o regulador apoptótico Bcl-2 exerce importantes efeitos anti-apoptóticos nos eventos que resultam a ativação das caspases efetoras (KLUCK et al., 1997; CHINNIYAN et al., 1996). Para avaliar capacidade do composto paladaciclo em modular a expressão dos genes Bcl-2 e Bax, células K562 foram tratadas com 1,2; 3,6 e 6 μM do composto por 72 horas.

Nossos resultados demonstraram que o composto não foi capaz de modular a expressão de Bcl-2 e Bax, uma vez que os resultados obtidos com células tratadas foram similares as amostras das células K562 não-tratadas, conforme figura 10 A. Confirmamos estes resultados através das análises densitométricas das amostras, onde podemos observar similaridade entre os resultados das amostras das células tratadas e não-tratadas (figura 10 B). Estes resultados sugerem que o composto paladaciclo ferroceno 1:2 não modula esta via de morte celular programada em células K562.

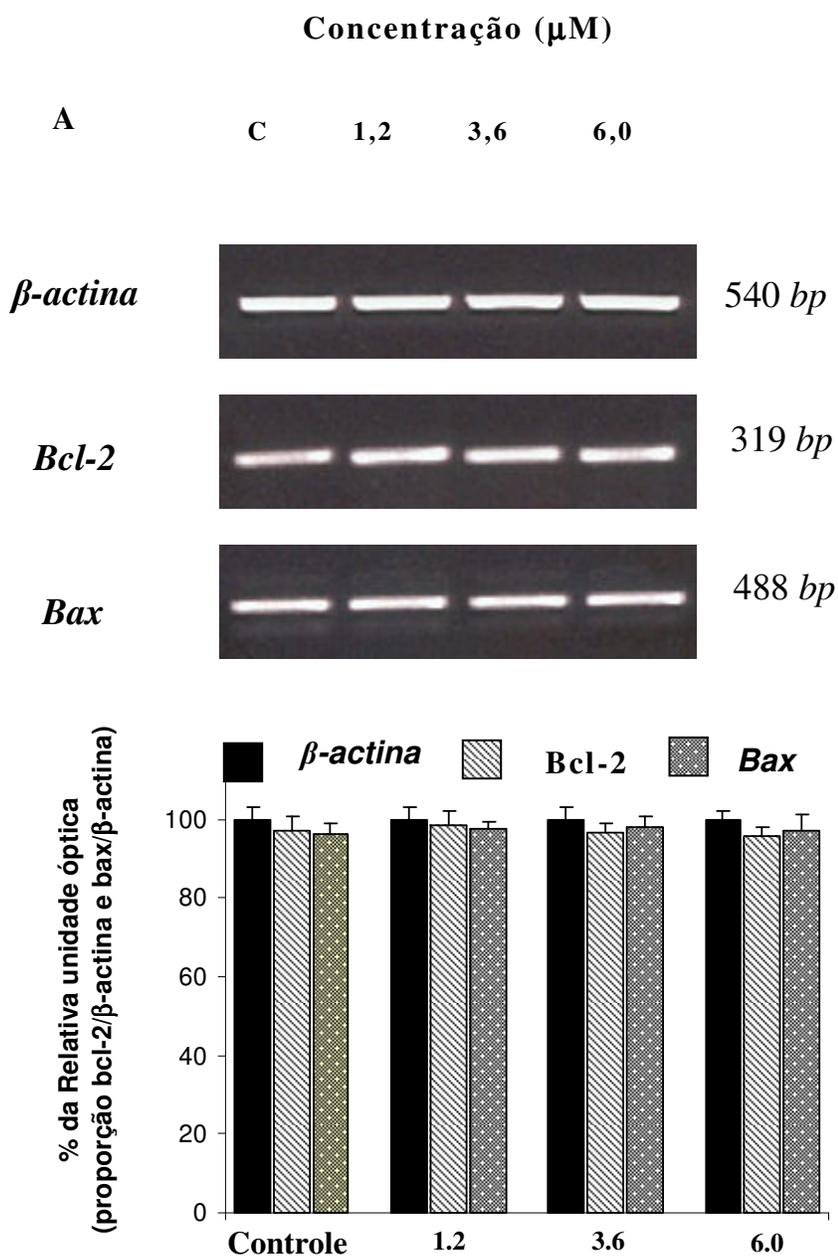


Figura 10. A . Técnica de RT-PCR demonstrando a expressão dos genes Bcl-2 e Bax nas células K562. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações do composto Paladaciclo por 72 horas. Foram realizados experimentos em triplicata, e o nosso controle interno foi a β -actina. **B.** Análises densitométricas. Os resultados representam a proporção entre bcl-2, bax e β -actina. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle não-tratado.

Avaliação da permeabilidade da membrana lisossomal através de microscopia confocal a laser

A presença de grupos hidrofóbicos tão bem como o grupo amina na estrutura do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (figura 1), sugere que esta molécula tem propriedades lisossomotrópicas (DE DUVE et al., 1974). Em consequência disto, devido ao pH ácido lisossomal, a molécula deste composto se acumula altamente no interior desta organela por aprisionamento iônico, induzindo uma ruptura da membrana lisossomal. Nós investigamos esta possibilidade através do monitoramento da fluorescência do corante *acredine orange*, uma substância que tem a característica de se acumular principalmente em organelas ácidas liberando uma fluorescência vermelha quando excitado por um feixe de luz a 488 nm, e uma fluorescência verde quando está presente em organelas com pH neutro (ROBBINS and MARKUS, 1963).

Através deste experimento, observamos que quando as células K562 tratadas com o composto Paladaciclo foram excitadas pelo feixe de luz, ocorreu uma fluorescência citoplasmática verde, indicando a liberação do AO do lisossoma para o citosol (figura 11E), o qual foi expresso pela intensa fluorescência verde 5 horas após a incubação do composto Paladaciclo. Podemos observar através da figura 11D, a ausência de delineamento, note que a emissão de fluorescência vermelha é nítida em toda a célula. Além disso, a sobreposição entre as emissões verde e vermelha foi observada nas células leucêmicas K562 tratadas, originando uma coloração amarela, conforme figura 11F, sugerindo fortemente desestabilização da membrana ou ruptura lisossomal.

Nas células leucêmicas K562 não-tratadas, quando excitadas pelo feixe de luz, uma fluorescência vermelha foi detectada somente nas vesículas lisossomais (figura 11A). Por outro

lado, quando estas células foram excitadas pelo feixe de luz, a emissão da fluorescência verde da *acridine orange* foi localizada nos compartimentos nucleares e citoplasmáticos, indicando a não-ruptura da membrana lisossomal (figura 11B). Podemos também observar que há ausência de sobreposição entre as fluorescências verde e vermelha, indicando a integridade da membrana lisossomal destas células não-tratadas (figura 11C).

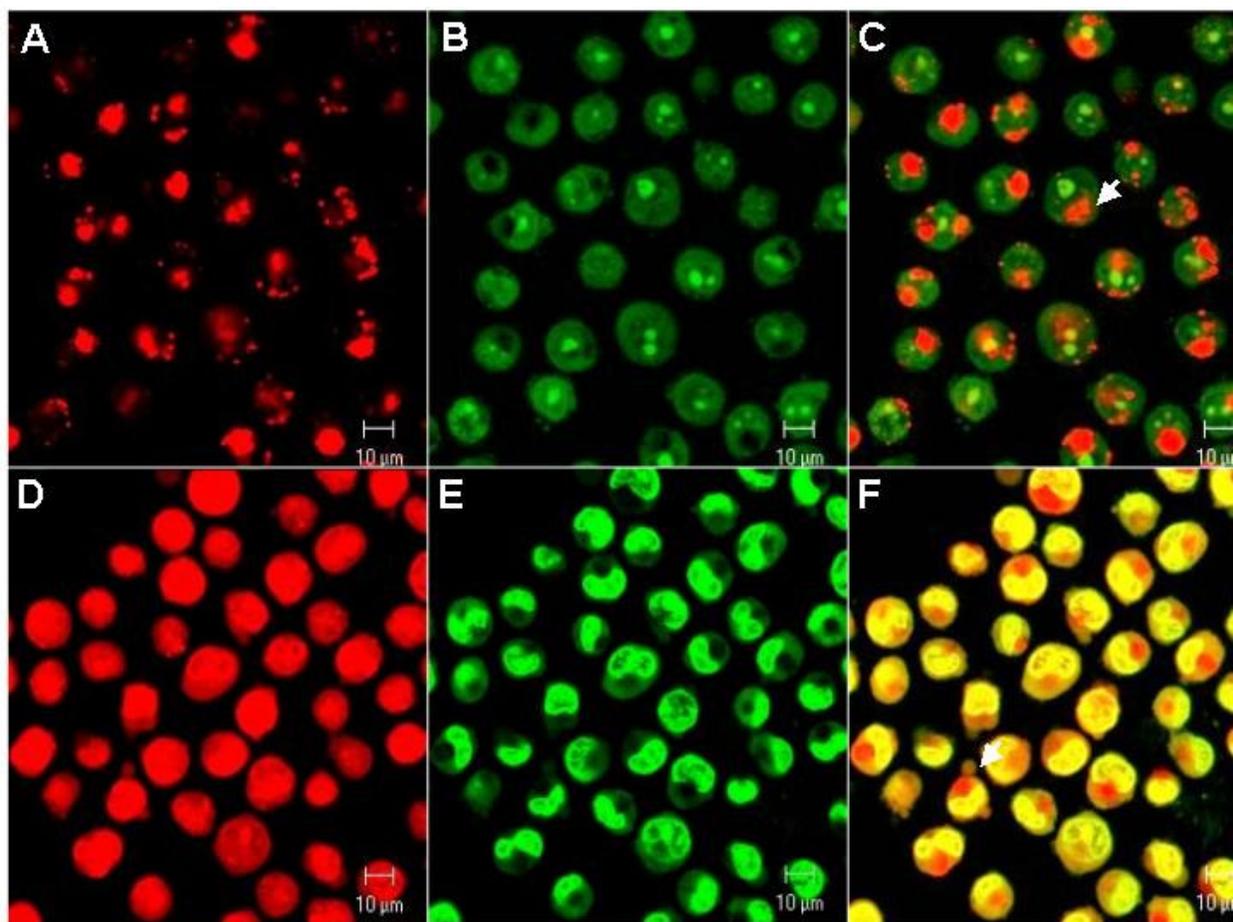


Figura 11 . Avaliação da integridade da membrana lisossomal em células K562 submetidas ao tratamento com 6.0 μM do paladaciclo e incubadas com o corante metacromático (AO). **A, B e C** (controle - células K562 incubadas apenas com AO); **D, E e F** (células K562 tratadas previamente com paladaciclo). **A.** lisossomas bem definidos, íntegros e delineados, **B.** citosol levemente corado devido à baixa concentração de enzimas lisossomais e **C.** Ausência de co-localização entre emissão de fluorescência vermelha e verde. **D.** Ruptura de lisossomos e ausência de delineamento, note que a emissão de fluorescência vermelha é nítida em toda a célula. **E.** Aumento na emissão de fluorescência verde devido a relocação de enzimas lisossomais para o citoplasma e **F.** Demonstra claramente a co-localização entre as fluorescências verde e vermelha, o que indica ruptura lisossomal.

Determinação da ativação das caspases 3 e 6

Estudos anteriores têm indicado que a ativação das caspases tem um papel fundamental na iniciação da fase ativa da apoptose (MARTIN and GREEN, 1995; CHINNAIYAN et al., 1996; LIU et al., 1997). Através deste experimento, foi avaliado neste estudo a ativação das caspases efetoras da apoptose 3 e 6 nas células leucêmicas K562.

Ambas as caspases estudadas tiveram suas atividades aumentadas após 5 e 72 horas de tratamento com o composto paladaciclo (6,0 μM). É interessante observarmos que quando as células K562 foram incubadas previamente com o inibidor de Catepsina B (CA-074) por 2 horas, que a ativação das caspases 3 e 6 foi prevenida (figura 12), sugerindo que esta protease está fortemente ligada a apoptose induzida pelo composto paladaciclo.

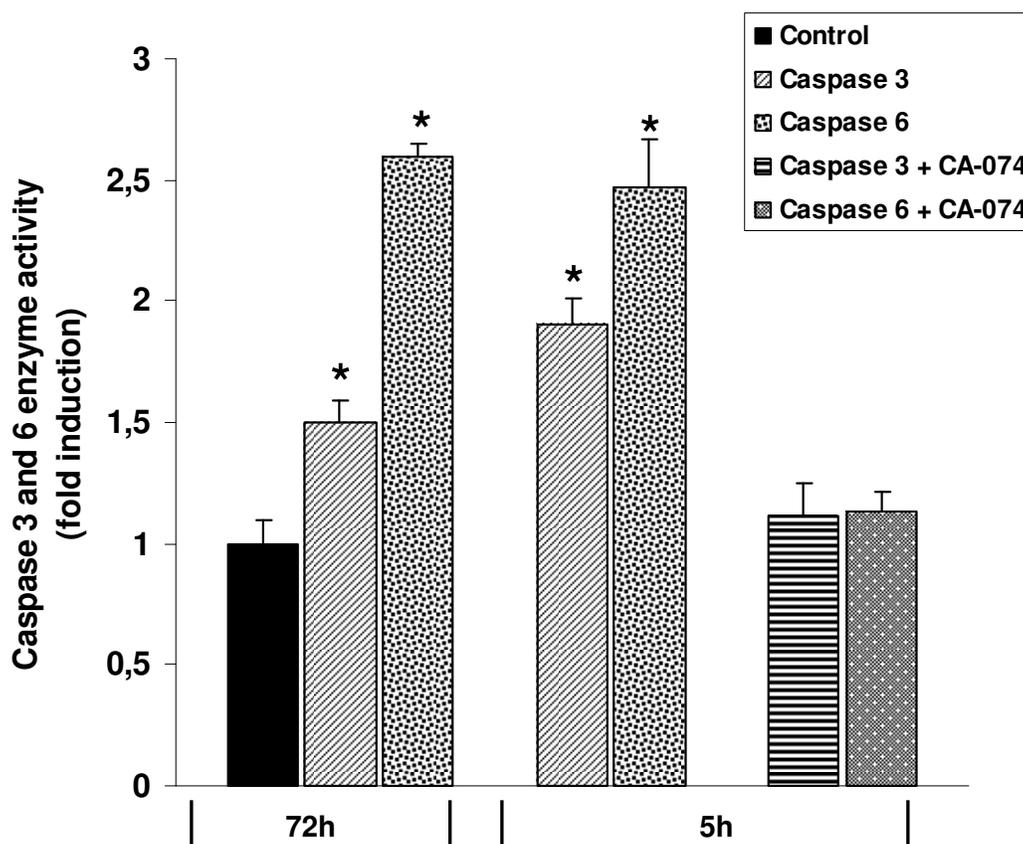
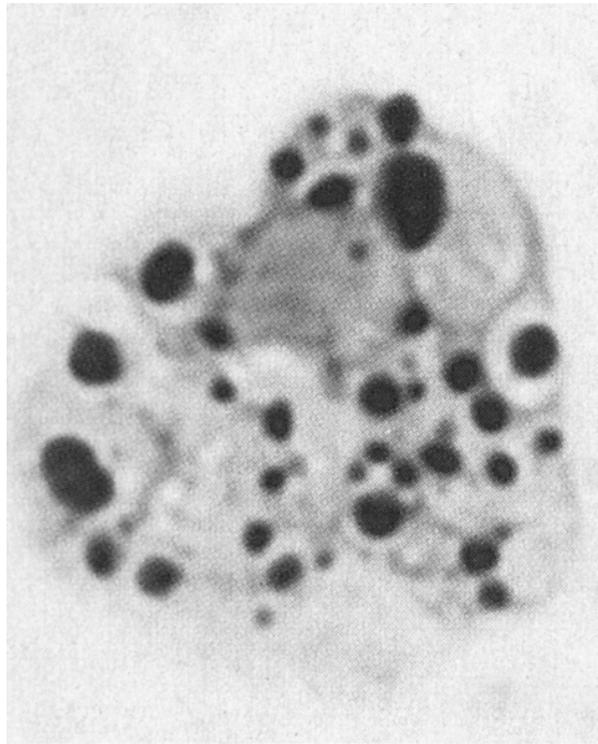


Figura 12 . Ativação de caspases efetoras 3 e 6 da morte celular programa em células K562 tratadas por 5 e 72 horas com a concentração de 6,0 uM do paladaciclo ferroceno. Quando estas células foram incubadas previamente por 2 horas com o inibidor da catepsina B (CA074), a ativação de ambas caspases foi inibida, deixando evidente a participação desta protease no processo apoptótico induzido pela droga em estudo. (* $P < 0.05$, ANOVA, Tukey-Kramer).



5. DISCUSSÃO

Muitas drogas utilizadas na quimioterapia induzem o processo apoptótico em células tumorais, motivo este pelo qual este processo tem sido extensivamente estudado (Piwocka et al.; 2001). Por muito tempo, as caspases foram tidas como principais agentes responsáveis pela indução da morte celular programada. Atualmente, a participação das catepsinas lisossomais também merece destaque, pois estas proteases estão presentes em várias condições fisiológicas, assim como estados patológicos (GUICCIARDI ET AL.; 2004, KROEMER AND JÄÄTTELÄ, 2005). Uma vez que os lisossomas em tumores avançados apresentam alterações em seu conteúdo, localização celular e função, seu estudo no desenvolvimento tumoral e sua participação na indução da apoptose devem ser considerados quando se tem como objetivo a erradicação de tumores (KROEMER AND JÄÄTTELÄ, 2005).

Devido às propriedades lisossomotrópicas do paladaciclo ferroceno 1:2 (BARBOSA et al.; 2006), parte dos objetivos deste estudo foi elucidar as vias envolvidas no mecanismo de morte celular deste complexo, utilizando as linhagens de células leucêmicas Jurkat e K562, a qual super expressa a proteína oncogene Bcr/abl (células de leucemia humana mielogênica K-562) (MARTINS et al.; 1997), a qual dificilmente entra em apoptose nas primeiras 24 horas após vários estímulos de morte (MARTINS et al.; 1997).

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que o composto paladaciclo ferroceno 1:2 é uma droga altamente citotóxica em concentrações inferiores a 5 μ M para estas células, os quais foram observados nos testes de redução de MTT a cristais de formazan e exclusão por azul de trypan. Utilizando dois métodos para identificar a apoptose, observamos que o paladaciclo induz o processo de morte celular programada nas células K562 e Jurkat, o qual foi identificado através da fragmentação nuclear, e confirmado através da presença de alterações morfológicas, tais como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos em células K562. O mais

interessante foi que verificamos estas alterações já nas primeiras 5 horas após tratamento destas células com o paladaciclo ferroceno 1:2.

Recentemente, muitos estudos têm descrito o papel das enzimas lisossomais na indução da apoptose (ROBERG AND OLLINGER, 1998, ISHISAKA et al.; 1999, GUICCIARDI et al.; 2000). Catepsina B, a qual é a mais abundante nos lisossomas em termos quantitativos (TURK et al.; 2002), tem um papel dominante na indução da apoptose em muitas linhagens de células tumorais (FOGHSGAARD et al.; 2001). Entretanto, a Catepsina B parece ter dois papéis importantes sobre a apoptose em processos neoplásicos: ela pode iniciar e executar o processo apoptótico, bem como mediar invasões tumorais (GUICCIARDI et al., 2004). As enzimas lisossomais precisam ser translocadas para o citosol onde degradam proteínas envolvidas na apoptose. Portanto, devido as suas propriedades lisossomotrópicas, o paladaciclo ferroceno se acumula nos lisossomas permeabilizando suas membranas, com conseqüente liberação de catepsinas para o citosol. Esta permeabilização de membrana lisossomal foi verificada através dos ensaios de microscopia confocal a *laser* na presença do corante *acridine orange*. Esse evento precedeu a ativação das caspases 3 e 6, a qual foi prevenida quando as células K562 foram previamente tratadas com um inibidor da catepsina B (CA074) por 2 horas. Estes resultados sugerem que a catepsina B está fortemente envolvida no mecanismo de morte celular do ferroceno. Entretanto, BINCOLETTO et al.; 2005, demonstraram que o composto paladaciclo ferroceno 1:2 foi capaz de inibir esta enzima em meio extracelular, mostrando um duplo efeito do composto sobre esta enzima. Este composto foi capaz de inibir a catepsina B em meio extracelular quando foi incubada diretamente com a mesma, porém demonstramos neste trabalho que o composto também foi capaz de permeabilizar a membrana lisossomal, com conseqüente liberação das catepsinas lisossomais para o citosol, induzindo as células tratadas ao processo

apoptótico. Após o composto se acumular nos lisossomas, ele sofre aprisionamento iônico, não tendo mais a capacidade de se desprender da membrana. Há também uma dificuldade do composto em se desprender da membrana lisossomal, devido a sua estrutura ser bastante volumosa, e uma vez na forma iônica, esta dificuldade aumenta. Após a permeabilização das membranas, as catepsinas são lançadas para o citosol, iniciando seu papel no processo apoptótico, como descrito anteriormente. Além deste fator, é importante lembrarmos que a concentração de enzimas lisossomal é muito alta, sendo necessária para a inibição das mesmas uma concentração do composto muito superior a mesma que induziu a permeabilização da membrana lisossomal, porém mais testes deverão ser realizados para investigarmos estas hipóteses.

Um achado interessante sobre o papel das catepsinas na apoptose também foi descrito nos estudos de WERNEBURG et al., (2002), onde os autores demonstraram que a catepsina B aumenta a resistência para a permeabilização da membrana lisossomal em hepatócitos, sugerindo que enzimas lisossomais não são apenas lançadas para o citosol, como podem também participar na desestabilização da membrana lisossomal.

A apoptose, induzida através da catepsina B, promove a liberação do citocromo *c* para o citosol através da quebra de um ou mais substratos citosólicos ainda não totalmente identificados. A liberação de citocromo *c* resulta em clivagem das caspases 9 e 3, seguida pelas alterações apoptóticas (GIUCCIARDI et al; 2004). Embora este trabalho não tenha investigado a liberação do citocromo *c* em células K562 tratadas com o paladaciclo, não podemos descartar um possível envolvimento desta organela no mecanismo de morte celular induzida pelo paladaciclo ferroceno, pois ela parece exercer um papel central na ativação das caspases efetoras (GIUCCIARDI et al., 2004).

Está bem documentado na literatura que a proteína oncogene Bcr/abl inibe a apoptose

induzida por vários estímulos vindos dos antineoplásicos convencionais (MCGHON et al.; 1994, SKORSKI, 2002). Esta resistência tem sido atribuída, ao menos em parte, ao bloqueio na liberação de citocromo *c* pela mitocôndria, através de uma regulação de membros da família de Bcl-2 (SKORSKI et al.; 2002). Os resultados aqui apresentados sugerem uma não modulação da expressão de membros da família Bcl-2 pelo paladaciclo, uma vez que nossos resultados demonstraram que os membros desta família estão expressos em células tratadas com o paladaciclo ferroceno de forma semelhante à expressão obtida no controle sem tratamento. Estes resultados claramente demonstram que o paladaciclo induz apoptose em células K562 e Jurkat de forma independente da modulação da expressão de membros da família de Bcl-2. Portanto, estes resultados sugerem que alterações nesses genes não estão diretamente associadas ao processo de apoptose induzido pelo Paladaciclo ferroceno. Sendo assim, a relação deste resultado com a permeabilização da membrana lisossomal necessita de investigações adicionais e mais esclarecedoras. Porém, não podemos excluir a possibilidade do composto em afetar a proteína Bcl-2 após a transcrição, através da alteração da fosforilação (MAY et al., 1993), ou ainda através de alterações na expressão de outros genes relacionados com o controle da apoptose e que indiretamente regulam a expressão de Bcl-2.

Está sendo demonstrado que as catepsinas citosólicas podem também processar e ativar Bid, uma proteína pró-apoptótico da família de Bcl-2. A ativação de Bid induz a permeabilização da membrana mitocondrial com morte celular (CIRMAN et al., 2004). A permeabilização da membrana lisossomal com conseqüente liberação das catepsinas do lisossoma para o citosol não está limitado exclusivamente à ativação intrínseca do processo de apoptose via caspases (KRÖEMER and JÄÄTELÄ , 2005). Em câncer pulmonar (BROKER et al., 2004) e em células de fibrosarcomas de camundongos (FOGHSGAARD et al., 2001), catepsinas induzem apoptose

de maneira independente de caspases.

Outro aspecto interessante que também devemos considerar é que o ferroceno apresenta átomos de ferro e paládio em sua estrutura. Portanto, além de suas características lisossomotrópicas, o complexo de paládio em estudo pode também estar envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos lisossomas e induzir a permeabilização da membrana lisossomal por esta via, já que o estado de oxidação do ferro é 0, e desta forma ele pode ser facilmente oxidado em meio biológico, porém mais testes devem ser realizados para sabermos ao certo o envolvimento do ferro na indução de apoptose por esta via.

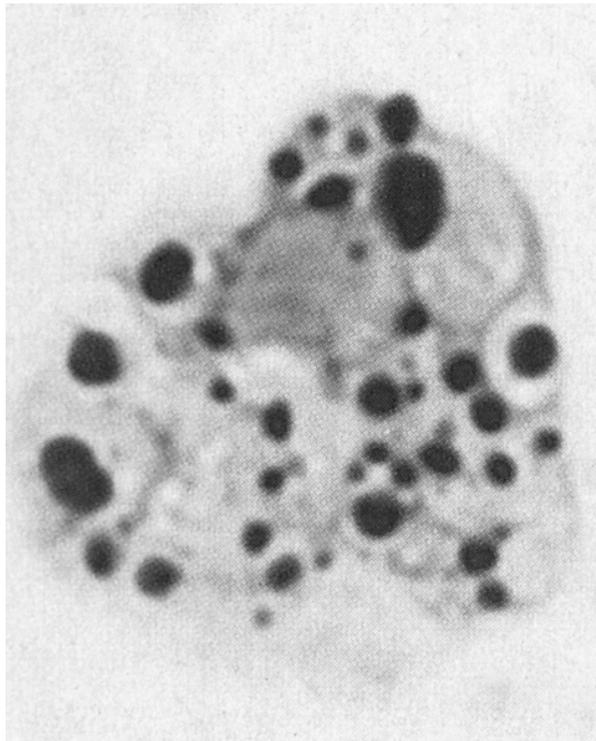
Um outro aspecto que devemos considerar é que a linhagem K562 não expressa o gene supressor de tumor p53. Portanto, a pesquisa de drogas buscando identificar uma molécula que induz permeabilização da membrana lisossomal e morte celular de maneira independente de p53 pode melhorar a efetividade de tratamentos em câncer, já que a frequência de mutações de p53 em tumores humanos é muito alta, podendo contribuir na diminuição da resistência de agentes que já são utilizados na quimioterapia anticancerígena (ERDAL et al., 2005).

Diante destes resultados, podemos sugerir que devido as suas propriedades lisossomotrópicas, o paladaciclo pode ser mais ativo contra células tumorais, uma vez que segundo a literatura citada anteriormente (KRÖEMER and JÄÄTELÄ , 2005), lisossomas em células tumorais apresentam alterações em seu conteúdo, localização celular e função.

É importante ressaltarmos que já estão sendo realizados em nosso laboratório, os mesmos experimentos para avaliação da capacidade do composto paladaciclo ferroceno 1:2 em induzir a permeabilização da membrana lisossomal e conseqüente liberação da catepsinas para o citosol em células Jurkat, já que não foram demonstrados neste trabalho, e nossos resultados iniciais são muito promissores, demonstrando que o composto paladaciclo manteve o mesmo mecanismo de

ação verificado nas células K562, confirmando mais uma vez a via de indução de apoptose deste composto.

Finalmente, este estudo introduz uma nova droga organometálica capaz de induzir apoptose em uma linhagem celular leucêmica com importantes características de resistência ao processo de morte celular programada. Diante disto, é importante que novos estudos sejam conduzidos, principalmente em células de indivíduos leucêmicos para verificarmos se este padrão de indução de apoptose é mantido em células obtidas diretamente de pacientes doentes. Além disso, estudos adicionais com células normais também devem ser realizados com o objetivo de se verificar se este composto apresenta seletividade para células transformadas, característica esta extremamente desejada nos tratamentos anticancerígenos.



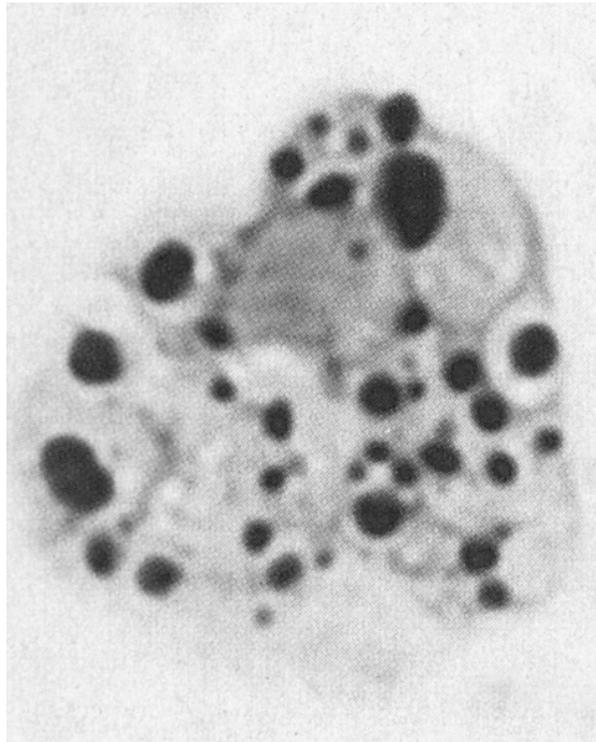
6. CONCLUSÕES

O presente trabalho sobre o potencial antileucêmico do novo composto paladaciclo ferroceno 1:2 em células de leucemia mielóide crônica K562 e células de leucemia linfóide aguda Jurkat, nos permitiu concluir que:

- Através dos ensaios de redução do MTT e de exclusão por azul de trypan, o composto mostrou-se citotóxico após 72 horas nas células K562 e Jurkat, tendo um IC_{50%} inferior a 5µM
- Indução de apoptose através da fragmentação de DNA em células Kr562 e Jurkat tratadas com o composto paladaciclo
- Confirmação da indução de apoptose em células K562 observadas através das alterações morfológicas, tais como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos
- Devido as suas propriedades lisossomotrópicas (BARBOSA et al., 2006), o ferroceno se acumula nos lisossomas permeabilizando suas membranas, com conseqüente liberação das catepsinas para o citosol. Esta permeabilização das membrana foi verificada através da microscopia confocal a *laser* na presença do AO em células K562.
- A permeabilização da membrana lisossomal precedeu a ativação das caspases -3 e -6, a qual foi prevenida quando as células K562 foram

previamente tratadas com o inibidor da catepsina B (CA074). Portanto a catepsina é um importante mediador na ativação das caspases estudadas

- Nossos resultados também demonstraram que o paladaciclo induz apoptose em células K562 e Jurkat de forma independente da modulação da expressão dos membros da família Bcl-2.
- Diante destes resultados, podemos sugerir que o paladaciclo pode ser mais ativo contra células tumorais, uma vez que estas células apresentam alteração em seu conteúdo, localização celular e função (KRÖEMER and JÄÄTELÄ , 2005).



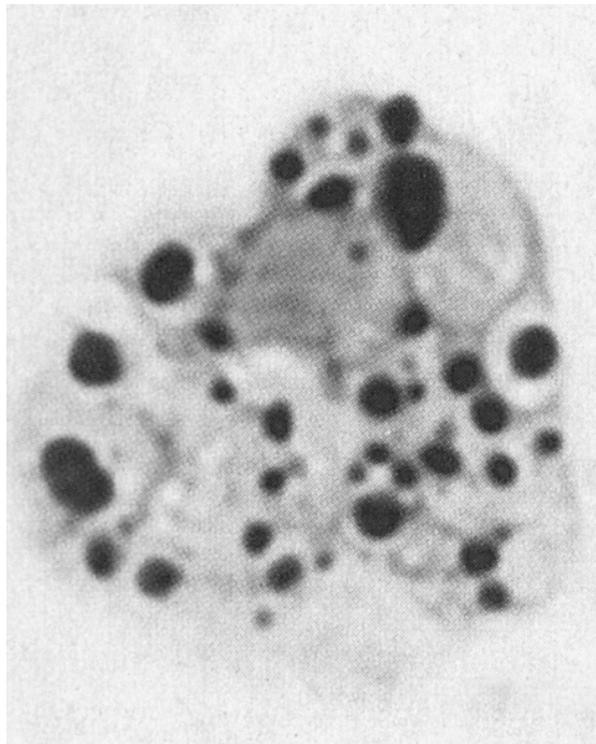
7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O composto paladaciclo ferroceno 1:2 mostrou-se altamente citotóxico para as células leucêmicas K562 e Jurkat, sendo capaz de induzir ambas as linhagens ao processo apoptótico.

Após este trabalho, seria muito importante a avaliação de alguns fatores determinantes no mecanismo de morte celular, como a capacidade do composto em modular a expressão do gene *Bcr-abl*, já que sua superexpressão nas células K562 é uma das principais causas de resistência aos quimioterápicos. Outra avaliação muito importante seria a capacidade do composto em permeabilizar a membrana mitocondrial, com subsequente liberação da proteína mitocondrial citocromo *c*, já que esta via de indução de apoptose é bem caracterizada.

O composto em estudo, apresenta átomos de ferro e paládio em sua estrutura, portanto, é de suma importância a investigação do envolvimento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), já que esta via é a causa de morte celular em várias linhagens leucêmicas. Além disso, é possível também a participação dos ROS no processo de permeabilidade da membrana lisossomal.

Estudos adicionais com células normais também devem ser realizados com o objetivo de se verificar se este composto apresenta seletividade para células transformadas, característica esta extremamente desejada nos tratamentos anticancerígenos.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACEHAN, D. A . JIANG, X, MORGAN, D.G., HEUSER, J.E., WANG, X and AKEY, C.W . Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation, *Mol. Cell* **9**, pp. 423–432, 2002.
2. ALVAREZ-VALDES, A.; PEREZ, J.M.; LOPEZ-SOLERA, I; LANNEGRAND, R.; CONTINENTE, J.M.; AMO-OCHOA, P. et al. Preparation and characterization of platinum (II) and (IV) complexes of 1,3-diaminepropane and 1,4-diaminebutane: circumvention of cisplatin resistance and DNA interstrand cross-link formation in CH1cisR ovarian tumor cells. *J Med Chem*, 45:1835-44, 2002.
3. ANTUNES, F., CADENAS, E., BRUNK, U.T. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 356, (Pt 2): 549-555, 2001.
4. BARBOSA, M.V., OLIVEIRA, C. R. NASCIMENTO, F.D., SMITH, M.C.M., FAUSTO, D.M., SOUFEN, M.^a, SENA. E., ARAÚJO, R.C., RESARIOL, I.L.S., BINCOLETTO, C. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. *Eur J of Pharmacology*, 542: 37-47, 2006.
5. BARNARD, C. J. F.; CLEARE, M. J.; HYDES, P. C. 2nd Generation Anticancer Platinum Compounds. *Chem. Brit.*, Berks, 22, 11:1001-1004, 1986.
6. BEDI, A., BARBER, J.P., BEDI, G.C., EL-DEIRY, W.S., SIDRANSKY, D., VALA, M.S., AKHTAR, A.J., HILTON, J., JONES, R.J. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G₂/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86, 1148-1158, 1995.
7. BERNARDI, P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275: 5-9,

1996

8. BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; OLIVEIRA, C.R.; DREHER, S.; FAUSTO, D.M.; SOUFEN, M.A.; NASCIMENTO, F.D.; CAIRES, A.C.F. Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. *Bio Med Chem*, 13:3047-55, 2005.
9. BINCOLETTO, C., SMITH, M.C.M., ROCHA, C.O., JUSTO, G.Z., MATSUMOTO, C.K., CAIRES, A.C.F., ARAÚJO, R.C. Bifosfinic palladacycle complex derived from N-N – dimethyl-1-phenethylamine and the ligand 1,1’bis (diphenylphosphine) ferrocene induces apoptosis in HL60 and Jurkat cell lines in the presence of normal Bcl-2 expression, *The Hematol J* , 526, 2004.
10. BINCOLETTO, C.; SAAD, S.T. ; SILVA, E.S. ; QUEIROZ, M.L.S. heamatopoietic response and Bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J of Haematol*, 62: 38, 1998.
11. BOSCHERT, M.T., BECKERT, B.W., PUCKETT, C.L., COCANNON, M.J. Analisis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconst Surg*, 109:761-5, discussion, 766-7, 2002.
12. BROKER, L.E., HUISMAN, C., SPAN, S.W., RODRIGUEZ, J.A., KRUYT, F.A., GIACCONE, G. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 64, 27-30, 2004.
13. BRUNK, U.T., SVENSSON, I. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep* 4, 3-11, 1999.

14. BURSCH, W. *Cell Death Differ*, 8, 569-581, 2001.
15. CAI, J.; YANG, J.; JONES, D. P. *Biochim Biophys Acta*. 1366:139-149, 1998.
16. CAIRES, A. C. F., ALMEIDA, E. T., MAURO, ^a E. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladadoc estabilizados com ligantes bifosfínicos. *Quím Nova*, 22:329-34, 1999.
17. CAIRES, A.C.F.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S. Brazilian Patent – PI 0204160. *Industrial Property Magazine RPI*, 1666, December, 2002.
18. CHANDRA, J., SAMAMLI, A., ORRENIUS, S. *Free Medical Biol Méd*, 29:323-333, 2000
19. CHINNAIYAN, A.M., ORTH, K., O'ROURKE, K., DUAN, H., POIRIER, G.G., DIXIT, V.M. Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 271, 4573-4576, 1996.
20. CIRMAN, T., ORESIC, K., MAZOVEC, G.D., TURK, V., REED, J.C., MYERS, R.M., SALVESEN, G.S., TURK, B. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* 279, 3578-3587, 2004.
21. COOPER, G.M., *A célula*, 2^o ed., Artmed® Editora LTDA, Porto Alegre, 712, 2001
22. CVITKOVIC, E.; SPAULIND, J.; BETHUNE, V.; MARTIN, J.; WHITMORE, W.F. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer*, 39:1357-61, 1977.
23. DAI, Y., RAHMANI, M., COREY, S.J., DENT, P., GRANT, S.A. Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem* 279, 34227-34239, 2004.

24. DALEY, G. Q. and D. BALTIMORE. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210 bcr/abl protein. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:9312-9316, 1988.
25. DE DUVE, C., DE BARSY, T., POOLE, B., TROUET, A., TULKENS, P., VAN HOOFF, F. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochem Pharmacol* 15, 2495-2531, 1974.
26. DONATO, N.J., WU, J.Y., ZHANG, L., KANTARJIAN, H., TALPAZ, M. Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+) human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition. *Blood* 97, 2846-2853, 2001.
27. EGUCHI, Y., S. SHIMIZU, and Y. TSUJIMOTO. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57: 1835-1840, 1997
28. ERDAL, H., BERNDTSSON, M., CASTRO, J., BRUNK, U., SHOSHAN, M.C., LINDER, S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 192-197, 2005.
29. FAN, X.; KOPITAR-JERALA, N.; PREMZL, A.; BESTAGNO, M.; BURRONE, O.; KOS, J. Molecular cloning and chimerisation of an inhibitory anti-cathepsin B antibody and its expression in Chinese hamster ovary cells. *Biol Chem*, 383:1817-20, 2002.
30. FERRI, K.F. and KROEMER, G., *Nat. Cell. Biol.*, 2, E63-E64, 2001
31. FOGHSGAARD, L., WISSING, D., MAUCH, D., LADEMANN, U., BASTHOLM, L., BOES, M., ELLING, F., LEIST, M., JAATTELA, M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153, 999-1010, 2001.

32. GAIL, M. S., LOIS, C., ANNA, P. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. *Mol Vis*, 6:157-63, 2000.
33. GREEN, D.R. and J.C. REED, Mitochondria and apoptosis, *Science* **281**, pp. 1309–1311, 1998.
34. GUICCIARDI, M.E., DEUSSING, J., MIYOSHI, H., BRONK, S.F., SVINGEN, P.A., PETERS, C., KAUFMANN, S.H., GORES, G.J. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106, 1127-1137. 2000.
35. GUICCIARDI, M.E., LEIST, M., GORES, G.J. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23, 2881-2890, 2004.
36. HAIDARA, K., MOREL, I., ABALÉA, V., BARRÉ, M. G., DENIZEAU, F. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochimic et Biophysic Acta*. 14829:1-13, 2002.
37. HAZNEDAROGLU, I.C.; ARICI, M.; BUYUKASIK, Y. A unifying hypothesis for the renin-angiotensin system and hematopoiesis: sticking the pieces together with the JAK-STAT pathway. *Med Hypotheses*, 54:80-3, 2000.
38. HIGBY, D. J.; WALLACE, H. G.; HOLLAND, J., F. Cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): a phase I study. *Cancer Chemother Rep*, 57:459-63, 1973.
39. HOCKENBERY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKLEY, W.; NAHM, M. & KORSMEYER, S.J. - *Bcl-2* protein is topographically restricted in tissues characterised by apoptotic cell death. *Proceedings National Academy Sci USA*, 88: 6961, 1991
40. ISHISAKA, R., UTSUMI, T., KANNO, T., ARITA, K., KATUNUMA, N., AKIYAMA,

- J., UTSUMI, K. Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Func* 24, 465-470, 1999
41. KLEIN, E., BEN-BASSAT, H., NEUMANN, H., RALPH, P., ZEUTHEN, J., POLLIACK, A., VANKY., F. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukaemia. *Int. J. Cancer*. 15;18(4):421-31, 1976.
42. KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN R, NEWMAYER D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132, 1997.
43. KORSMEYER, S. - *Bcl-2* initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80: 879, 1992.
44. KOSHIDA Y, SAEGUSA M and OKAYASY I. Apoptosis, cell proliferation and expression of *Bcl-2* and Bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer*, 75: 367, 1997.
45. KRAKOFF, I.H. Platinum and other metal co-ordination compounds in cancer chemotherapy In: Nicolo, M. Clinical applications of Platinum Complexes, Boston: Ed. Martinus Nijhoff Publishing, 355, 1988.
46. KROEMER, G., JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5, 886-897, 2005.
47. KROEMER G. The proto-oncogene *Bcl-2* and its role in regulating apoptosis. *New Eng J Med*, 6: 614, 1997
48. LAURENT A., NICCO C., CHEREAU C., GOULVESTRE C., ALEXANDRE J., ALVES A., LEVY E., GOLDWASSER F., PANIS Y., SOUBRANE O., et al. *Cancer Res*. 2005; **65**:948–956

49. LEIST, M., B. SINGLE, A. F. CASTOLDI, S. KUHNLE, and P. NICOTERA. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1481-1486, 1997
50. LEMASTERS, J. J. Mechanisms of Hepatic Toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276: G1-G6, 1999 - Review
51. LEIST, M. and JAATTELA, M. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 589-598, 2001.
52. LI, W., YUAN, X., NORDGREN, G., DALEN, H., DUBOWCHIK, G. M., FIRESTONE, R. A., BRUNK, U. T. *FEBS Lett.*, 470, 35-39, 2000.
53. LI, P. et al. *Cell*.91:479-489, 1997.
54. LIU, X., ZOU, H., SLAUGHTER, C., WANG, X. DFF a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184, 1997.
55. MARTIN, S.J., GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82, 349-352, 1995
56. MARTINS, L.M., KOTTKE, T., MESNER, P.W., BASI, G.S., SINHA, S., FRIGON, N. JR., TATAR, E., TUNG, J.S., BRYANT, K., TAKAHASHI, A., SVINGEN, P.A., MADDEN, B.J., MCCORMICK, D.J., EARNSHAW, W.C., KAUFMANN, S.H. Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 7421-7430, 1997.
57. MARZANO, C.; TREVISAN, A. ; GIOVAGNINI, L.; FREGONA, D. Synthesis of a new

- platinum (II) complex: anticancer activity and nephrotoxicity “in vitro”. *Toxicol in vitro*, 16:413-19, 2002.
58. MAUNG, Z.T.; MACLEAN, F.R.; REID, M.M.; PEARSON, A.D.J.; PROCTOR, S.J.; HAMILTON, P.J. et al. The relationship between Bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *Br J of Haematol*, 88: 105, 1994.
59. MAY, W.S., TYLER, P.G., ARMSTRONG, D.K., DAVIDSON, N.E. Role for serine phosphorylation of bcl-2 in an antiapoptotic signalling pathway triggered by IL3. *Blood* 82 (Abstr): 438B, 1993.
60. MCGAHON, A., BISSONNETTE, R., SCHMITT, M., COTTER, K.M., GREEN, D.R., COTTER, T.G. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to popptotic cell death. *Blood* 83,1179-1187. 1994.
61. MES-MASSON, A.M., MCLAUGHLIN, J., DALEY, G.Q., PASKIND, M., WITTE, O.N. Overlapping cDNA clones define the complete coding region for the P210c-abl gene product associated with chronic myelogenous leukaemia cells containing the Philadelphia chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9768-9772, 1986.
62. MISHELL, B.B., SHIIQ, S.M., HENRY, C., CHEN, E.L., NORTH, J., GALLILY, R., SLOMICH, M., MILLER, K., MARBROOK, J., PARKS, D., GOOD, A.H. Selected methods in cellular immunology (B.B. Mishell and S.M. Shiqi, eds.), 21-22, 1980.
63. MOW BM, BLAJESKI AL, CHANDRA J, KAUFMANN SH. Apoptosis and the response to anticancer therapy. *Curr Opin Oncol.*, 13:453-, 2001.
64. MPOKE S.S., WOLFE, J. Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: Application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *J Histochem Cytochem* 45, 675-683, 1997.

65. NAVARRO-RANNINGER, C.; LÓPEZ-SOLERA, I.; PÉREZ, J.M.; RODRIGUES, J.; GARCIA-RUANO, J.L.; RAITHBY, P.R. et al. Analysis of two cycloplatinated compounds derived from N- (4-methoxyphenyl)-alpha-benzoylbenzylideneamine. Comparison of the activity of these compounds with other isostructural cyclopalladated compounds. *J Med Chem*, 36:3795-801, 1993.
66. NIEMINEN, A.-L., A. K. SAYLOR, B. HERMAN, and J. J. LEMASTERS. ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am. J. Physiol.* 267 (*Cell Physiol.* 36): C67-C74, 1994
67. NOWELL, P.C. & D.A. HUNGERFORD. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.*, 25, 85-109, 1960.
68. OLSSON, G.M., BRUNMARK, A., BRUNK, U.T., Acridine orange-mediated photodamage of microsomal- and lysosomal fractions. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 56, 247-257, 1989.
69. PASTORINO JG, CHEN ST, TAFANI M, SNYDER W, FARBER JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *The J Biol Chem*, 273: 7770, 1998.
70. PINSKI, J., WEERARATNA, A., UZGARE, A.R., ARNOLD, J.T., DENMEADE, S.R., ISAACS, J.T. Trk receptor inhibition induces apoptosis of proliferating but not quiescent human osteoblast. *Cancer Res*, 15:986-89, 2002.
71. PIWOCKA, K., JARUGA, E., SKIERSKI, J., GRADZKA, I., SIKORA, E. Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in Jurkat cells. *Free Rad Biol Med* 31, 670-678, 2001.
72. PREMZL, A., PUIZDAR, V.; ZAVASNIK-BERGANT, V.; KOPITAR-JERALA, N.;

- LAH, T.T. et al. Invasion of ras-transformed breast epithelial cells depends on the proteolytic activity of cysteine and aspartic proteinases. *Biol Chem*, 382:853-7, 2001.
73. REED, J. C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 17: 3225-3236; 1998.
74. ROBBINS, E., MARCUS, P.I. Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *J Cell Biol* 18, 237-250, 1963.
75. ROBERG, K., OLLINGER, K. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol* 152, 1151-1156, 1998.
76. ROCHA, C. R.; BARBOSA, C.M.V.; CARMONA, ^aK. ARAÚJO, R.C.; TERSARIOL, I.L.S.; BINCOLETTO, C. Angiotensin-I converting enzyme activity in murine long-term bone marrow cultures. XXXIV Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, Águas de Lindóia, SP, livro de resumos, 2005.
77. ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compound. *Cancer Res*, 30: 1799 – 802, 1970.
78. ROWLEY, J.D. Chromosomal patterns in myelocytic leukaemia. *N Engl J Med.*, 289, 200-1, 1973.
79. RUNDQUIST, I., OLSSON, M., BRUNK, U. Cytofluorometric quantitation of acridine orange uptake by cultured cells. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 92, 303-309, 1984.
80. SCHNEIDER, U. et al. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, 19: 621, 1977.

81. SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K.D. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48:4827-33, 1988.
82. SKORSKI, T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 21, 8591-8604, 2002.
83. SPRIK, M.R., WEIGAND, M. A., RIESER, E., RAUCH, C.T., JUO, P., BLENIS, J., KRAMER, P.H., WALCZAK, H. FADD/MORT I and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors I and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, 12:599-609, 2000.
84. SQUIER, M. K., SEHNERT, A. J., COHEN, J. J. Apoptosis in leukocytes. *J leukoc Biol*, 57:2-10, 1995. Review.
85. TAKASCHI, S., ABE, T., GOTOH, J., FUKUUCHI, Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int*, 40:441-48, 2002.
86. TRUTER, E.J., SANTOS, A.S., ELS, W.J. assessment of the antitumour activity of targeted immunospecific albumin microspheres loaded with cisplatin and 5-fluorouracil: toxicity against a rodent ovarian carcinoma "in vitro". *Cell Biol Int*, 25:51-9, 2001.
87. TURK, B., STOKA, V., ROZMAN-PUNGERCAR, J., CIRMAN, T., DROGA-MAZOVEC, G., ORESIK K, TURK V. Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem* 383, 1035-1044, 2002.
88. VALENCIA A., MORAN J. *Free Radical Biol. Med.* 2004
89. VOERINGER, D. W. Bcl-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 945, 1999.

90. WALLACE, H. J.; HIGBY, D.J. Recent Results in Cancer Research In: CONNORS, T.A .; ROBERTS, j.j. Platinum Co-ordination Complexes in Cancer Chemotherapy. New York: Ed. Springer-Verlag. 167 , 1974.
91. WEISS, A .; et al. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol*, 133: 123, 1984.
92. WERNEBURG, N.W., GUICCIARDI, M.E., BRONK, S.F., GORES, G.J. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G947-G956, 2002.
93. WILTSHAW, E. and CARR, B. Recent results in Cancer Research. In: CONNORS, T. A .; ROBERTS, J.J. Platinum Co-ordination Complexes in Cancer Chemoterapy. New York: Ed. Springer-Verlag, 167, 1974.
94. www.bioagency.com.br
95. YU, L, WAN, F., DUTTA, S., WELSH, S., LIU, Z., FREUNDT, E., BAEHRECKE, E. H. and LENARDO, M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Cell Biology*. 28; 103(13): 4952–4957, 2006 - Review
96. ZDOLSEK, J.M., OLSSON, G.M., BRUNK, U.T. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem Photobiol* 51, 67-76, 1999.
97. ZHELEV, Z., BAKALOVA, R., OHBA, H., EWIS, A., ISHIKAWA, M., SHINOHARA, Y., BABA, Y. Suppression of bcr-abl synthesis by siRNAs or tyrosine kinase activity by Glivec alters different oncogenes, apoptotic/antiapoptotic genes and cell proliferation

- factors (microarray study). *FEBS Letters*, 570: 195, 2004.
98. ZORATTI, M., and I. SZABO. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 139-176, 1995.
99. ZOU, H. HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A . WANG, X. Apaf-1, a human protein homologous to *c. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90:405-413, 1997.