

CARLOS ROCHA OLIVEIRA

**RESPOSTA HEMATOPOIÉTICA EM ANIMAIS PORTADORES
DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich E TRATADOS COM
PALADACICLOS**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico – Carlos Rocha Oliveira.

Campinas, 27 de agosto de 2003.



*Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade
- Orientadora -*

CAMPINAS

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

CARLOS ROCHA OLIVEIRA

**RESPOSTA HEMATOPOIÉTICA EM ANIMAIS PORTADORES
DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH E TRATADOS COM
PALADACICLOS**

*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

2003

500 400 300 200 100 0

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
TUNICAMP	
OLAN	
V	EX
TOMBO BC/	56699
PROC	16/117109
C	☐
D	☒
PREÇO	11,10
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

BIBID. 309591

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

CM00192988-3

Ol 4r

Oliveira, Carlos Rocha

Resposta hematopoiética em animais portadores do tumor ascístico de elrich e tratados com paladaciclos / Carlos Rocha Oliveira.
Campinas, SP : [s.n.], 2003.

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

1. *Organometálicos. 2. *Tetrapeptides. 3. *Células-tronco hematopoiéticas. I. Claudia Bincoletto Trindade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Membros:

Profa. Dra. Claudia Bincoletto Trindade

Profa. Dra. Gíselle Zenker Justo

Prof. Dr. Marize Campos Valadares

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

Data: 27/08/2003

DEDICATÓRIA

À Minha Vida.

“Cada manhã se envolve a Terra de nova luz e cada dia experiências humanas são transfiguradas para melhor em todas as direções. A própria semente obscura e anônima é chamada a reconstituir-se e ressurgir na sombra do solo. Não nos faltarão trabalho, cooperação, solidariedade, esperança, e, em nosso favor, os créditos do equilíbrio, da paz e da felicidade íntima, no dever retamente cumprido, com o serviço em nossas mãos”.

BATUÍRA

AGRADECIMENTOS

À Minha Família sempre presente, vibrante e atuante.

À Professora Dra. Claudia Bincoletto Trindade, a quem agradeço por tudo que aprendi até aqui, mas principalmente, por me ensinar que vale sim, e muito, nos dedicarmos e agirmos de maneira correta frente aos nossos ideais.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos Fávero Caires, da Universidade de Mogi das Cruzes, pelo trabalho em equipe.

Ao Professor Dr. Ronaldo Carvalho de Araújo, da Universidade de Mogi das Cruzes, por tudo que me ensinou e por quem tenho imensa admiração e respeito.

Aos amigos dos laboratórios, que sempre estarão comigo.

Aos animais, que me permitiram realizar grande parte deste trabalho, e cujas centelhas de luz certamente estão caminhando na direção do progresso.

Ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP e à Universidade de Mogi das Cruzes, por todo aprendizado teórico e prático.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	PAG.
RESUMO.....	<i>xiv</i>
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Síntese dos composto $[PdS_{(C^2,N-dmpa)}(dppf)]Cl$ (Paladaciclo Ferroceno 1:2).....	28
3.2. Animais e tratamento com o composto Paladaciclo Ferroceno 1:2.....	29
3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich TAE).....	29
3.4. Manutenção da Linhagem Leucêmica HL60 (leucemia promielocítica humana).....	30
3.5. Teste de redução MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide].....	30
3.6. Viabilidade celular através do método de exclusão com Azul de Trypan.....	31
3.7. Cultura clonal de precursores hematopoiéticos a partir da medula óssea e baço de Camundongos (CFU-C).....	31
3.8. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	33
3.9. Cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoiéticos da medula óssea de camundongos.....	34
3.9.1. Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos (CFU-C) a partir das células progenitoras obtidas no meio de cultura líquida de longa duração.....	36
3.10. Detecção da expressão do bcl-2 (técnica de imunocitoquímica, método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase alcalina- APAAP) em linhagem leucêmica	

HL60 frente a diferentes concentrações do Paladaciclo Ferroceno	
1:2.....	36
3.11. Padronização da técnica de RT-PCR para estudo da expressão de bcl-2.....	37
3.11.1. Isolamento de RNA total	38
3.11.2. 1ª fita de cDNA... ..	38
3.11.3 RT-PCR quantitativo (Transcriptase Reversa- reação de polimerase em cadeia)... ..	38
3.12. Análises estatísticas.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Teste de redução MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide]:.....	41
4.2. Viabilidade celular em linhagem leucêmica HL60.....	41
4.3. Cultura Clonal <i>in vitro</i> dos precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais, frente a diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2.....	44
4.4. Cultura clonal <i>in vivo</i> dos precursores hematopoiéticos a partir de células progenitoras da medula óssea de animais normais, animais portadores do TAE, animais tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2 e animais portadores do TAE e tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2.....	46
4.5. Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos a partir de células progenitoras obtidas do baço de animais normais, animais portadores do TAE, animais tratados com Paladaciclo ferroceno 1:2 e animais portadores do TAE e tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2.....	48
4.6. Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o peso do baço.....	50
4.7 Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18µM) sobre a formação do estroma medular <i>in vitro</i> e número de colônias (CFU-C) obtido a partir das células progenitoras obtidas no meio de cultura líquida de longa duração.....	52

4.8. Expressão do proto-oncogene Bcl-2 em células leucêmicas HL60 tratadas com o Paladaciclo ferroceno 1:2.....	58
4.9.Avaliação da transcrição gênica do Bcl-2, em células leucêmicas HL60 pelo método de RT-PCR.....	60
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	70
7. ABSTRACT.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9. APÊNDICES.....	98

LISTA DE TABELAS

PÀG.

Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos Swiss (1×10^5 células/mL).....	34
Tabela 2 Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos Swiss inoculados com o TAE e tratados com $1,18 \mu\text{M}$ do Paladaciclo ferroceno 1:2 . Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.....	99
Tabela 3 Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos do baço de camundongos Swiss inoculados com o TAE e tratados com $1,18 \mu\text{M}$ do Paladaciclo ferroceno 1:2 . Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.....	100
Tabela 4 Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos Swiss normais incubadas com diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 no momento de realização das culturas. Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.....	101
Tabela 5 Variação do peso (g) do baço de camundongos Swiss inoculados com células do TAE e tratados com várias concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2.....	102
Tabela 6 Efeitos de várias concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a viabilidade celular da linhagem leucêmica HL60. Análise realizada pelo método de exclusão do azul de trypan.....	103
Tabela 7 Número de células viáveis, não-viáveis e de CFU-GM obtido do sobrenadante das culturas líquidas de longa duração da medula óssea de animais Swiss normais. As culturas foram repopuladas após a terceira semana de incubação. Resultados expressos em quantidade total de células e colônias obtidas por cultura realizada em dois experimentos independentes.....	104
Tabela 8: Número de células viáveis, não-viáveis e o número de CFU-GM obtido do sobrenadante da cultura líquida de longa duração tratada com $1,18\text{mM}$	

(concentração final) do Paladaciclo ferroceno 1:2 após a 5ª semana. As culturas foram repopuladas na 4ª semana de incubação.....	105
Tabela 9: Porcentagem de sobrevivência celular da linhagem HL60 incubada com diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2. Avaliação realizada pelo método de redução com o MTT à Formazan com leitura realizada através de ELISA em 570nm. Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.....	106

	PÁG.
Figura 1: Modelo tridimensional da estrutura do Paladaciclo Ferroceno 1:2 [Pd S ₍₋₎ (C ² ,N-dmpa)(dppf)] Cl.....	28
Figura 2: Aspecto microscópico de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas da medula óssea de camundongos normais na presença de concentrações supramáximas do meio condicionado de células esplênicas (SCM). (Aumento 400 x).....	33
Figura 3: Citotoxicidade do Paladaciclo ferroceno 1:2 em células da linhagem HL60 após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO ₂ . Avaliação realizada pelo método de redução do MTT a cristais de formazan em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Leitura realizada através de ELISA em 570nm.....	42
Figura 4: Número de células HL60 viáveis após a incubação com diferentes concentrações do composto Paladaciclo ferroceno 1:2. Esta avaliação foi realizada através do método de exclusão do azul de trypan, após a incubação das células leucêmicas com este composto por 72 horas, (*) significativo em relação ao controle. (P < 0,05, ANOVA, Tukey-Kramer).....	43
Figura 5. Atividade citotóxica de diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o número de progenitores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos normais. Avaliação realizada <i>in vitro</i> . A droga foi adicionada nas placas de cultura no momento de realização dos experimentos. * Significativo em relação ao controle. (P < 0,05, ANOVA, Tukey-Kramer).....	45
Figura 6: Número de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18µM do Paladaciclo ferroceno. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6 x 10 ⁶ células/animal) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o	

composto em estudo por via subcutânea durante 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foram realizados os ensaios de cultura clonal.* Significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).....	47
Figura 7: Colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 células/animal) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o composto em estudo por via subcutânea por 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foram realizados os ensaios de cultura clonal.* significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).....	49
Figura 8: Peso do baço de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 células/animal) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o composto em estudo por via subcutânea por 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foi realizada a mensuração do baço.* significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).....	51
Figura 9: Número de células não-aderentes (viáveis e não viáveis) obtido semanalmente no sobrenadante das culturas líquidas de longa duração tratadas com o composto Paladaciclo ferroceno 1:2. O meio saturado foi trocado semanalmente por meio RPMI contendo a droga em estudo (1,18 μ M – concentração final). * Significativo em relação ao controle ($P < 0,05$, Teste T - <i>Student</i>).....	53
Figura 10: Efeito do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) sobre as células aderentes do estroma obtido a partir da medula óssea de animais normais. Avaliação realizada no final da cultura (9ª semana). * Significativo em relação ao controle ($P < 0,02$; Teste T - <i>Student</i>).....	54
Figura 11: Efeito da incubação do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) sobre a formação de colônias de precursores hematopoiéticos pra granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas a partir das células não aderentes presentes no sobrenadante das culturas líquidas. Esta avaliação foi iniciada na 5ª semana de cultura,	

uma vez que as células aderentes formadoras do estroma medular já estavam em confluência.

* Significativo em relação ao controle ($P < 0,01$, Test T - *Student*)..... 55

Figura 12: Aspecto microscópico do estroma medular na 5ª semana de cultura. A- cultura não tratada com o Paladaciclo (controle) e B – cultura tratada com 1,18µM do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (B). O meio de cultura foi renovado semanalmente. Aumento 200 x. Note a presença de áreas de concentração de células progenitoras nas culturas tratadas..... 56

Figura 13: Aspecto microscópico do estroma medular na 5ª semana de cultura. A – cultura não tratada com o Paladaciclo ferroceno 1:2 (controle) e B – cultura tratada com 1,18µM do Paladaciclo ferroceno 1:2. O meio de ambas as culturas foi renovado semanalmente. Aumento 400 x. Note a presença de áreas de concentração de células progenitoras nas culturas tratadas..... 57

Figura 14: Expressão do proto-oncogene *Bcl-2* método APAAP: (fosfatase alcalina-anti-fosfatase) em células HL60 não incubadas. Note a intensidade de expressão de *Bcl-2* em células HL60. (Aumento 400 x)..... 59

Figura 15: Análise por RT-PCR da expressão de genes envolvidos no processo apoptótico em células leucêmicas HL60 na presença de concentrações crescente do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18µM, 3,55µM e 5,92µM)..... 60



RESUMO

Neste trabalho avaliamos o potencial farmacológico e toxicológico de um novo composto organometálico contendo paládio como metal de transição e estabilizado com ligantes bifosfínico e aminoácido, denominado neste estudo Paladaciclo ferroceno 1:2. Portanto, para avaliar o potencial antitumoral *in vivo*, analisamos o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) num modelo experimental de implantação tumoral, com células do tumor ascítico de Erhlich. Nesta análise, verificamos que o Paladaciclo ferroceno 1:2 não foi capaz de reverter a mielossupressão induzida pelo TAE e também não preveniu a hematopoiése extramedular (esplênica), que é uma característica marcante do desenvolvimento tumoral. A hematopoiése esplênica não foi observada nos animais que receberam apenas o Paladaciclo ferroceno 1:2, sugerindo uma baixa toxicidade sistêmica para este composto.

Os estudos *in vitro*, utilizando a técnica de cultura clonal de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), demonstraram uma mielotoxicidade dose-dependente, sendo que a menor concentração testada nesta metodologia (1,18 μ M) não alterou o número de CFU-GM em relação ao controle. Essa mesma concentração (1,18 μ M), quando adicionada ao meio de cultura líquida de longa duração, para avaliar os efeitos do composto em estudo 1: sobre o estroma medular, demonstrou um efeito hematoprotetor do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a medula óssea. Nesta cultura observamos um aumento significativo no número de células aderentes do estroma medular quando as células foram incubadas com o Paladaciclo ferroceno 1:2 em relação ao controle sem tratamento. Este aumento no número de células aderentes nas culturas tratadas com o composto foi acompanhado por um maior número de áreas denominadas *cobblestone*, locais de alojamento de células jovens em culturas de longa duração.

A avaliação da citotoxicidade deste composto pelos testes de exclusão do Azul de Trypan e redução do MTT demonstraram um IC de 2,5 μ M e 5,3

μM , respectivamente. A diferença obtida nas concentrações inibitórias descritas acima poderia ser explicada, pelo menos em parte, através dos diferentes princípios dos métodos, pois o teste de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial de reduzir o MTT a cristais de formazan enquanto que o teste de exclusão do azul de Trypan avalia a integridade da membrana plasmática pela sua capacidade de excretar o corante tóxico para a célula.

Ao avaliarmos a expressão da proteína Bcl-2, que está intimamente ligada ao controle da morte celular programada e/ou à resistência das células malignas aos quimioterápicos, verificamos que a expressão desta proteína não se alterou na presença de diferentes concentrações do Paladaciclo Ferroceno 1:2. Esta ausência de efeitos sobre a expressão deste gene foi verificada pela metodologia de imunocitoquímica, (método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase alcalina- APAAP) e pela técnica de RT-PCR, sugerindo que o processo apoptótico em células HL60 tratadas com o composto em questão envolve outras vias de indução da apoptose celular .

Levando todos os nossos dados em consideração, podemos sugerir que este composto, em baixas concentrações, possui um potencial modulador da resposta hematopoiética e também apresenta uma maior citotoxicidade as células leucêmicas HL60 (células de leucemia mielóide aguda). Estudos *in vivo* estão em andamento para melhor caracterizarmos o mecanismo de ação desta droga sobre a resposta hematopoiética.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de quimioterapia no tratamento do câncer tem sido objeto de estudo nas últimas três ou quatro décadas. Apesar disto, o envolvimento de compostos inorgânicos, 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; ROSENBERG et al., 1973). Antes destes relatos, a maior parte das pesquisas estava centrada no possível potencial carcinogênico destes compostos e não em qualquer propriedade anticancerígena.

A quimioterapia moderna do câncer iniciou-se após a Primeira Guerra Mundial, em decorrência de observações sobre a exposição de indivíduos ao gás mostarda, que causava leucemia e aplasia medular (KRUMBHAR E KRUMBHAR, 1919; KOPF-MAIER, 1994).

O sucesso na clínica do cis-[diaminodicloroplatina (II)], cis-[PtCl₂(NH₃)₂], denominado cisplatina, inicialmente em pacientes terminais (HIGBY et al., 1973) e posteriormente em tumores localizados, como no caso de câncer testicular (WALLACE e HIGBY, 1974), ovariano (WILTSHAW e 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 pela química destes compostos e outros estreitamente relacionados. Recentemente, foi demonstrado que complexos inorgânicos ou organometálicos, contendo outros metais de transição como titânio, vanádio, ouro, ródio e paládio também apresentam elevada atividade antitumoral em tumores experimentais, especialmente o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (KOPF e KOPF-MAIER, 1979; KOPF-MAIER, 1980; KOPF-MAIER et al., 1981; KOPF-MAIER et al., 1983; KOPF-MAIER et al., 1986; KOPF-MAIER et al., 1987, KOPF-MAIER et al., 1990, KOPF-MAIER et al., 1992; KOPF-MAIER, 1994; KOPF-MAIER, 1996; KOVALA-DEMERTIZI et al., 1997; KOPF-MAIER, 1999;

CARUSO et al., 2003; WANG et al., 2003). Estes complexos em sua maioria são monometálicos: o átomo metálico central é circundado por ligantes da família dos halogênios, em adição a um ou mais ligantes puramente orgânicos (KOPF-MAIER, 1980; KOPF-MAIER et al., 1981).

Uma das estratégias no desenvolvimento de novas drogas antitumorais contendo metais de transição consiste na síntese de complexos que, mesmo possuindo características estruturais semelhantes aos complexos de platina, sejam capazes de induzir uma resposta celular apropriada ou modular esta resposta, sem agirem necessariamente sobre o DNA, aumentando, ou restabelecendo os mecanismos de defesa próprios do hospedeiro para agirem mais seletivamente contra as células malignas. Neste caso, a descoberta de novos agentes, e drogas alternativas com propriedades diferenciadas, como por exemplo as substâncias imuomoduladoras, vêm sendo alvo de grande interesse científico (MIRANDOLA et al., 2002).

Assim sendo, uma nova classe dos compostos organometálicos com capacidade de modificar algumas respostas biológicas, particularmente os paladacilos estabilizados com ligantes bifosfínicos e aminoácidos, foram sintetizados e patenteados por pesquisadores da Universidade de Mogi das Cruzes (CAIRES 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. (1999), estas substâncias são citotóxicas para várias linhagens celulares, como HeLa (cólon do útero), Hep-2 (orofaringe) e C6 (glioma cerebral). Aliado a este potencial, alguns compostos ciclopaladados também são eficientes inibidores enzimáticos e catalisadores da hidrólise de alguns açúcares insaturados, produzindo substratos inibidores de glicosidases (SCHULTZ et al., 1995).

Estudos recentes com um derivado paladacilo estabilizado com os ligantes bifosfínicos e aminoácidos, denominado neste estudo, Paladacilo

ferroceno 1:2, demonstraram que este composto possui elevada atividade inibitória sobre algumas enzimas, como por exemplo, a enzima Catepsina B, a qual participa da degradação de componentes da matriz extracelular em processos metastáticos (PREMZL et al., 2001; FAN et al., 2002). Em estudos *in vivo* verificou-se que este composto, quando administrado por via subcutânea em animais portadores do tumor de Walker, inibiu o desenvolvimento tumoral em algumas cobaias e diminuiu a massa tumoral, nos casos onde o tumor progrediu, quando comparado ao respectivo controle sem tratamento (CAIRES et al., submetido). Estes efeitos possivelmente estão associados à inibição da Catepsina B pela droga em estudo, uma vez que o tumor de Walker é um tumor metastático com expressão acentuada de Catepsina B (QUIAN et al., 1991).

Além da inibição desta enzima, o composto Paladaciclo ferroceno 1:2 também foi capaz de inibir a enzima conversora de angiotensina-I (ECA) (BINCOLETTO et al., 2003). Esta enzima integra o sistema renina-angiotensina, o qual está presente em vários tecidos, inclusive na medula óssea (HAZNEDAROGLU et al., 2000). Recentemente, o papel da ECA no controle da resposta hematopoiética tem sido amplamente investigado (RODGERS et al., 2000; AZIZI et al., 2001; JUNOT et al., 2001).

Portanto, para dar continuidade a estes estudos, neste trabalho avaliamos o potencial farmacológico e toxicológico deste novo composto Paladaciclo. Para alcançar estes objetivos, análises *in vitro* com linhagem celular e cultura primária de células da medula óssea de camundongos foram realizadas. Além destas análises, um modelo experimental de implantação tumoral com células do tumor ascítico de Ehrlich (EHRlich e APOLANT, 1905) também foi utilizado.

A tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tem sido amplamente empregado em estudos envolvendo a resposta hematopoiética frente ao desenvolvimento tumoral (QUEIROZ et al., 2001; MIRANDOLA et al., 2002). A influência do crescimento tumoral na proliferação das células pluripotentes do baço ou da medula óssea, tem sido relatada também por

inúmeros autores (VALADAREZ et al., 1998; JUSTO et al., 2000; QUEIROZ et al., 2001). O tumor de Ehrlich produz alterações severas no sistema hematológico do hospedeiro, sendo freqüentemente associado com imunossupressão, anemia, trombocitopenia e leucocitose granulócito-dependente (DELMONT e LIEBELT, 1966; CLERICI et al., 1971; LALA et al., 1977; KEEB e LALA, 1978; WHITNEY et al., 1978; PESSINA et al., 1982 ; SUBIZA et al., 1989; LALA et al., 1990; SEGURA et al., 1997; RUIZ DE MORALES et al., 1999; KUSMARTSEV et al., 1999). PESSINA et al. (1982), observaram que o tratamento *in vitro* de células de medula óssea normal com fluído ascítico de Ehrlich acelular, produz uma redução severa no número de colônias formadas a partir de células precursoras da medula óssea (CFU-C) e das células pluripotentes do baço. Além disso, vários trabalhos na literatura relatam o emprego do tumor de Ehrlich como modelo experimental para o estudo da atividade antineoplásica e imunorreguladora de diversos compostos (ABOUL, 1986; KITA et al., 1989; VALADARES et al., 1998; JUSTO et al., 2000; GOSWAMI et al., 2001). Neste sentido, VALADARES et al. (1999), demonstraram um efeito imunoprotetor ao nível dos precursores da medula óssea para o composto organometálico diciclopentadienildiclorotitânio IV em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. Inúmeros trabalhos relatam uma mielossupressão, expressa através de uma redução no número de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), formadas a partir de precursores hematopoiéticos da medula óssea em animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich (VALADAREZ et al., 1998 ; JUSTO et al., 2000; JUSTO et al., 2001).

Estudos envolvendo compostos de origem vegetal, como por exemplo, diferentes frações do extrato de *Acanthospermum australe* e também o extrato bruto da *Caesalpinia ferree*, quando administrados por via oral, também protegem a medula óssea da mielossupressão induzida pelo desenvolvimento do TAE, aumentando a sobrevida destes animais (QUEIROZ et al., 2001; MIRANDOLA et al., 2002), deixando claro que

este modelo experimental de inoculação tumoral é uma valiosa ferramenta dentro da fase pré-clínica do desenvolvimento de novas drogas.

A presença da hematopoiése esplênica, induzida pelo desenvolvimento do TAE, também tem despertado grande interesse da comunidade científica, pois ainda não foi possível definir se o baço é capaz de realizar hematopoiése extramedular ou se as células progenitoras verificadas neste órgão migram da medula óssea. Portanto, o estudo de neoplasias em modelos animais facilita a avaliação e melhor compreensão da fisiologia dos tumores, ao mesmo tempo em que constitui instrumento apropriado para a investigação de efeitos imunomoduladores de substâncias com potencial antineoplásico.

Diante do exposto e das evidências de que a resposta hematopoiética é de fundamental importância para a sobrevivência de animais portadores do TAE, neste trabalho avaliamos os efeitos do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o sistema hematopoiético de animais portadores deste tumor. Para isto, estudamos o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea e do baço (CFU-C). Esta avaliação foi realizada através da técnica de cultura clonal, descrita por METCALF (1984), pois estes ensaios clonogênicos em meio semi-sólido em agar ou metilcelulose permitem avaliar o grau de diferenciação de cada célula progenitora e a identificação da morfologia das células pertencentes a cada colônia.

Perante o fato de que os testes clonogênicos em meio semi-sólido (CFU-C) não avaliam diretamente os efeitos provocados por uma substância química sobre as células estromais, avaliamos também os efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a formação do estroma medular, através da técnica de cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (DEXTER, et al., 1977; DEXTER, 1982; ALLEN e DEXTER, 1984). As células do estroma medular consistem em pelo menos quatro tipos celulares distintos (células endoteliais, células acumuladoras de lipídeos, macrófagos e células fibroblastóides) (GUERRIERO et al., 1997). Estas células

participam diretamente da maturação e diferenciação das células tronco hematopoiéticas. Esta regulação é mediada pelo contato direto entre as células hematopoiéticas e células estromais, envolvendo moléculas de adesão, predominantemente colágeno e proteoglicanos, ou indiretamente, através da produção de moléculas sinalizadoras (EAVES et al., 1991; FIBBE et al., 1988; HERMAN et al., 1998; BOROJEVIC et al., 2003). Estes elementos surgem ao longo do cultivo de células totais da medula óssea, onde as células acumuladoras de lipídeos sinalizam o amadurecimento e competência deste sistema. No sistema de cultivo de longa duração, a hematopoiése é mantida *in vitro* sem a adição de fatores de crescimento exógenos. Portanto, esta cultura é totalmente dependente da síntese e liberação de fatores de crescimento hematopoiéticos endógenos. Deste modo, durante todo período da manutenção da cultura, é possível avaliar a produção de células diferenciadas ou dos progenitores que se renovam durante o cultivo.

Os mecanismos envolvidos na regulação da resposta hematopoiética são complexos e ainda não estão totalmente esclarecidos, principalmente, no que diz respeito à função das células estromais e moléculas de adesão, descritas anteriormente. Como exemplo da complexidade deste sistema, podemos citar a descoberta do sistema renina-angiotensina (SRA) na medula óssea na última década (ABALI et al., 2002). Assim sendo, a enzima conversora de angiotensina-I, integrante do SRA, participa intensamente dos processos de regulação hematopoiética, tanto na formação de angiotensina-II, um regulador positivo da hematopoiése (MRUG et al., 1997), como na degradação do tetrapeptídio N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP), que quando se mantém íntegro, regula a hematopoiése negativamente, impedindo que os progenitores mielóides entrem na fase S do ciclo celular (HAZNEDAROGLU et al., 2003). Estudos recentes sugerem que a inibição da ECA pode contribuir na terapêutica antineoplásica visando a redução da mielotoxicidade induzida por drogas antitumorais (CHISI et al., 1999).

Além da aplicação de cultura primária na caracterização do potencial farmacológico e toxicológico de novas substâncias, a utilização de linhagens celulares também é outra ferramenta valiosa. Assim sendo, a utilização da linhagem celular HL60, originada a partir de células de leucemia pró-mielocítica aguda e caracterizada por uma translocação específica no cromossomo t(15;17) (LAVAU et al., 1994), foi fundamental para a caracterização do potencial citotóxico do Paladaciclo ferroceno 1:2. Entre os mecanismos envolvidos na citotoxicidade de um novo composto, podemos citar a apoptose celular. A apoptose é um mecanismo regulador biológico que controla a morte celular induzida por estímulos fisiológicos endógenos ou exógenos como, por exemplo, o estresse oxidativo ou agentes quimioterápicos (MOFFATT et al., 2000). As principais características morfológicas deste evento são a fragmentação de DNA, condensação nuclear e formação de núcleos picnóticos (THORNBERRY et al., 1998). O papel de proto-oncogenes no controle deste processo tem sido amplamente investigado na última década, como a família Bcl-2 e Bax. A super expressão de membros anti-apoptóticos como Bcl-2, está implicada na resistência a quimioterapia, enquanto altos níveis de expressão de membros pró-apoptóticos, como Bax, promovem a apoptose e sensibilizam células tumorais a varias terapias anti-câncer (TALIERI et al., 2003). Desta forma, a caracterização de mecanismos moleculares envolvidos no processo citotóxico de um novo composto também auxilia no desenvolvimento de novas drogas antitumorais.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a caracterização do potencial antitumoral e citotoxicidade de um novo composto organometálico contendo paládio como metal de transição. Portanto, avaliamos os seguintes parâmetros em presença deste composto:

Estudos *in vivo*:

- Avaliação do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea e baço de camundongos inoculados com células do TAE e tratados com o composto Paladaciclo ferroceno 1:2.

Estudos *in vitro*:

- Avaliação dos efeitos do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a formação do estroma medular de animais normais.
- Estudo da citotoxicidade sobre os progenitores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais normais.
- Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular em linhagem de células promielocíticas humanas HL60.
- Estudo da capacidade modulatória da expressão do proto-oncogene Bcl-2 em linhagem leucêmica HL60.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese dos composto $[PdS_{(-)}(C^2,N-dmpa)(dppf)]Cl$ (Paladaciclo Ferroceno 1:2) estabilizado com ligantes bifosfínicos e aminoácidos.

Os trabalhos de síntese e purificação do composto Paladaciclo Ferroceno 1:2 foram realizados pelo Prof. Antonio Carlos Fávero Caires, do Núcleo de Pesquisas Interdisciplinares da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) (CAIRES et al.; 2002). A figura a seguir, mostra a tridimensional da molécula, cuja atividade biológica foi analisada neste estudo.

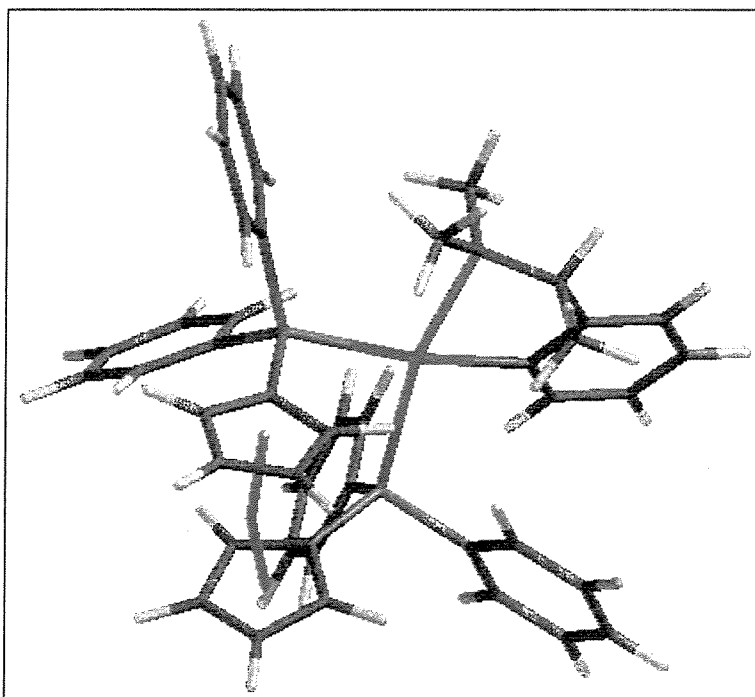


Figura 1: Modelo tridimensional da estrutura do Paladaciclo Ferroceno 1:2 $[Pd S_{(-)}(C^2,N-dmpa)(dppf)] Cl$.

3.2. Animais e tratamento com o composto Paladaciclo Ferroceno 1:2:

Para a realização deste estudo, assim como para a manutenção das células tumorais de Ehrlich, foram utilizados camundongos Swiss, com idade aproximada entre 6 a 8 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão. Os experimentos foram realizados em grupos de animais submetidos aos seguintes tratamentos: a) animais controle (animais que receberam apenas o diluente); b) animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com veículo durante 4 dias consecutivos por via subcutânea; c) animais portadores do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com $1,18 \mu\text{M}$ do Paladaciclo Ferroceno 1:2 durante 4 dias consecutivos por via subcutânea e d) animais apenas tratados com $1,18 \mu\text{M}$ do Paladaciclo durante 4 dias consecutivos por via subcutânea. Em todos os casos, a droga foi diluída em solução salina contendo 1% de DMSO e.

3.3. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

A linhagem tumoral de Ehrlich foi mantida através de passagens sucessivas entre camundongos. Para o desenvolvimento do TAE, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 0,1 mL de uma suspensão de células tumorais contendo 6×10^6 células tumorais, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos portadores. Após a retirada do líquido ascítico do peritônio dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich, o número e a viabilidade das células foram determinados através da utilização do corante azul de trypan, em câmara hemocitométrica.

3.4. Manutenção da Linhagem Leucêmica HL60 (leucemia promielocítica humana):

As células HL60 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab) e 2 mM de L-glutamina. Semanalmente estas células são expandidas para a realização de experimentos e congelamento.

3.5. Teste de redução do MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

O teste de redução do MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em uma seleção inicial de drogas (TRUTER et al.; 2001). Este teste é amplamente empregado para avaliar a proliferação e viabilidade celulares. 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 formazan pela enzima succinato-desidrogenase resulta em cristais azuis insolúveis. A intensidade da coloração é utilizada para medir a integridade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular (SCUDIERO et al., 1988)

Protocolo: Células das linhagens HL60 mantidas conforme descrito no item 3.4 foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640, contadas em câmara hemocitométrica e a concentração de células foi ajustada para 5×10^5 células/poço. As células foram tratadas com diferentes concentrações do Paladacilo Ferroceno 1:2 (0,5 μ M; 1,18 μ M; 2,36 μ M; 3,55 μ M; 4,73 μ M; 5,92 μ M; 11,8 μ M e 17,7 μ M). A placa foi então incubada em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Após este período, 10 μ L da solução de MTT (concentração final = 5mg/mL) foram adicionados em cada poço. Após 4 horas, os cristais de formazan foram dissolvidos com 100 μ L de isopropanol ácido. A densidade óptica foi medida através do leitor de ELISA em 570 nm. Foram realizados 3

experimentos independentes com cada concentração do composto realizada em triplicata. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Absorbância por poço tratado}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

3.6. Viabilidade celular através do método de exclusão do 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). O teste de exclusão do azul de Trypan avalia a capacidade da célula de permitir a entrada do corante através da membrana plasmática e em seguida, conseguir expulsá-lo para o meio extracelular.

Protocolo: Após incubação das células da linhagem HL60 com várias concentrações do Paladaciclo Ferroceno 1:2 (1,18µM; 2,36µM; 3,55µM; 4,73µM; 5,92µM; 14,8µM e 29,6µM), as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640. Após este procedimento, as células foram diluídas (1:10) no Azul de Trypan e a contagem das células inviáveis foi realizada em câmara hemocitométrica.

3.7. Cultura clonal de precursores hematopoiéticos a partir da medula óssea e do baço de camundongos (CFU-C):

Os ensaios clonogênicos em soft-agar são utilizados para quantificar progenitores que proliferam formando colônias incluídas no gel. Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam induzidas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas, para se evitar um número exagerado de colônias em cada placa de Petri com conseqüente superposição das mesmas, de modo a permitir a identificação de cada colônia. Também é importante que o fator estimulador de crescimento (CFS) seja utilizado em concentrações supramáximas. Utilizamos o meio condicionado de células

esplênicas (SCM), conforme descrito no item 3.8 a seguir. Além disso, a escolha do soro fetal bovino foi feita cuidadosamente devido à variação encontrada para a atividade dos vários lotes e marcas.

Protocolo: Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool iodado. Após exposição do fêmur removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). O baço foi removido em condições assépticas e colocado em um tubo estéril contendo meio de cultura RPMI. A seguir, o baço foi macerado cuidadosamente para liberação das células esplênicas. O número de células (medula óssea e baço) nas suspensões foi contado em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 em azul de Trypan. Logo após, foi preparado o meio mais ágar (Bacto-ágar, Difco), o qual consiste de 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Difco) 2 x concentrado, 20% de soro fetal bovino e 50% de ágar (concentração final de 0,3%). A seguir, adicionou-se o volume apropriado de células, (1×10^5 células/mL e 2×10^5 células/mL para a avaliação da mielopoiese medular e extramedular, respectivamente) em meio mais ágar (37°C). Estas suspensões (meio mais células) foram distribuídas em volumes de 2,0 mL em cada placa de Petri (35mm), as quais já continham 100µL do estímulo apropriado (SCM). Distribuiu-se o conteúdo por toda a superfície da placa e deixou-se geleificar. Incubou-se por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir foi contado o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40 x (METCALF, 1984).

Os estudos *in vitro* foram realizados pela da incubação das células da medula óssea obtidas de um animal normal nas mesmas condições descritas acima com diferentes concentrações do composto Paladaciclo Ferroceno 1:2 (1,18µM; 2,36µM; 3,55µM; 4,73µM; 5,92µM; 7,10µM; 8,29µM e 14,8µM) diretamente na placa de cultura. Para os estudos *in vivo*, os animais foram

Para estudo morfológico as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5 % (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/hematoxilina, conforme a figura 2, a seguir.

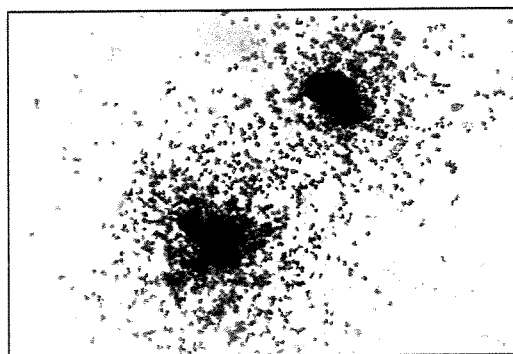


Figura 2: Aspecto microscópico de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas da medula óssea de camundongos normais na presença de concentrações supramáximas do meio condicionado de células esplênicas (SCM). (Aumento 400 x)

3.8. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM):

Baços de camundongos Swiss foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Cultilab) contendo 20% de soro fetal bovino. Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 0,05 mL de “pokeweed mitogen” por mL de meio com concentração final de 1,65 $\mu\text{g/mL}$ e incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. A seguir, centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtro milipore (0,0,45 μm).

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas de animais normais em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 fornece resultados que estão dentro dos níveis de resposta supermáxima. Os resultados, em

duplicata, da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1: Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM) em presença de células de medula óssea de camundongos Swiss (1×10^5 células/mL):

DILUIÇÃO SCM	CFU-C $\times 10^4$
1:1	109,2 $\pm$ 4,2
1:2	102 $\pm$ 3,5
1:4	105,6 $\pm$ 5,1
1:8	75,6 $\pm$ 4,2
1:16	57,6 $\pm$ 4,0
1:32	34,8 $\pm$ 3,0
1:64	7,2 $\pm$ 1,2
1:168	0

Número total de células da medula óssea
Resultados obtidos em duplicata.

3.9. Cultura líquida de longa duração de células precursoras hematopoiéticos da medula óssea de camundongos.

Esta cultura é totalmente dependente da formação de uma camada de células aderentes, derivadas de células estromais da medula óssea. Estas células estromais mantêm então a hematopoiese, promovendo um ambiente apropriado para proliferação, sobrevivência, diferenciação e auto-renovação das células progenitoras. A formação desta camada de células aderentes ocorre através da síntese e secreção de fatores de crescimento hematopoiéticos, os quais são responsáveis pela formação da matriz extracelular de células estromais. Sendo assim, as células mais imaturas

hematopoiéticos, os quais são responsáveis pela formação da matriz extracelular de células estromais. Sendo assim, as células mais imaturas permanecem dentro desta camada de células aderentes e são liberadas para o meio de cultura, com o objetivo de manter a hematopoiese. Desta forma, o número de células progenitoras presentes no meio de cultura líquida é quantificado após a realização da cultura clonal na presença de fatores de crescimento hematopoiéticos exógenos (DEXTER et al., 1997).

Após sacrificar os animais (aproximadamente 8) através de deslocamento cervical, limpou-se a pele com álcool iodado. Após exposição do fêmur removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e corta-se o osso na junção superior. A medula óssea e as células do estroma medular (aproximadamente 10^7 células/mL) são transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio de cultura. Esse meio foi composto por meio RPMI (Sigma) suplementado com L-glutamina, soro eqüino e hidrocortisona (concentração final 10^{-2}). O volume de células mais meio foi distribuído em frascos de cultura T25 (10 mL do meio mais células em cada frasco) para a formação do grupo controle. Para formar o grupo tratado com Paladaciclo Ferroceno 1:2, outros frascos T25 receberam 10 mL do meio mais células, além de $1,18 \mu\text{M}$ (concentração final) do Paladaciclo Ferroceno 1:2. Os frascos de cultura foram colocados em estufa com 5% de CO_2 a 37°C para a formação da camada de células aderentes. No intervalo de 7 dias fez-se a reposição do meio de cultura saturado, com o intuito de evitar a morte celular. Na 4ª semana foi realizada a repopulação de células, pois o estroma já formado serviu de suporte para as células jovens. Após a estabilização da hematopoiese (aproximadamente 5 semanas), a cultura clonal (CFU-C) foi realizada semanalmente, com o objetivo de quantificar o número de precursores hematopoiéticos derivados das células aderentes formadoras do estroma medular. Na última semana de incubação (9ª semana) o estroma formado foi removido com solução de tripsina (0,25%) contendo EDTA (0,2%), e as células aderentes foram contadas com azul de trypan.

3.9.1. Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos (CFU-C) a partir das células progenitoras obtidas no meio de cultura líquida de longa duração.

A partir da quinta semana de cultivo e a cada sete dias, foram coletados 5 mL das culturas descritas acima. A seguir, este meio mais células foi centrifugado (10 minutos a 1.500 rpm), e o botão celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI. A seguir estas células foram submetidas ao protocolo de cultura clonal (CFU-C) descrito anteriormente (item 3.7) utilizando-se o meio condicionado de células esplênicas (SCM) como fator estimulador do crescimento e diferenciação celulares, cuja obtenção foi descrita no item 3.8. Este fator estimulador foi utilizado na cultura de longa duração, uma vez que estimula as células jovens em diferentes estágios de diferenciação.

3.10. Detecção da expressão do Bcl-2 (técnica de imunocitoquímica, método de fosfatase alcalina, anti-fosfatase alcalina- APAAP) em linhagem leucêmica HL60 frente a diferentes concentrações do Paladacilo Ferroceno 1:2:

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

Protocolo: Após estabilização das células HL60 em cultura líquida, estas foram incubadas (concentração final de $2,5 \times 10^5$ células/mL) com diferentes concentrações do Paladacilo Ferroceno 1:2 (1,18 μ M; 2,36 μ M; 3,55 μ M; 4,73 μ M; 5,92 μ M; 14,8 μ M). Após 72 horas de incubação, estas células foram lavadas (3x) em meio RPMI 1640 e diluídas em 20 mL de tampão TBS. O citospin foi realizado colocando-se 120 μ L em cada suporte

de filtro citológico e centrifugando-se por 5 minutos a 800 rpm. No dia seguinte, as lâminas foram fixadas em acetona gelada por 10 minutos e hidratadas com tampão TBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das lâminas com soro suíno por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (Bcl-2 - Dako) por 2 horas, anticorpo biotinilado (Mult-link) por 45 minutos e complexo ABC (Strept ABComplex/AP) por 45 minutos. Logo após, foi realizada a coloração com substrato cromógeno, que consiste de: A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se o substrato cromógeno que consiste de fosfato naftol AS-MX 0,2%, dimetilformamida 2%, levamisole 0,24% e o sal Fast Red TR 0,1% em 0,01 mol.L-1 Tris-HCl, pH 8.1. A contra-coloração foi efetuada com Hematoxilina de Mayer e água amoniacal por alguns segundos. As lâminas foram montadas com glicerol (Sigma-Aldrich) para leitura em microscopia óptica. A percentagem de células positivas para a oncoproteína Bcl-2 e a intensidade de coloração por meio de escala com 5 pontos foram determinadas pela contagem de pelo menos 300 células por lâmina (MAUNG et al., 1994; BINCOLETTTO et al., 1999).

3.11. Padronização da técnica de RT-PCR para estudo da expressão de Bcl-2:

Protocolo: A linhagem leucêmica HL-60 foi mantida em meio RPMI-1640 (Cultilab) e repicada semanalmente para congelamento e avaliação da expressão e transcrição de Bcl-2. Para os experimentos, as células HL-60 (concentração final de 1×10^7 células/mL) foram centrifugadas por 10 min. a 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.

3.11.1. Isolamento de RNA total

O RNA total foi isolado das células HL-60 utilizando-se Trizol™ (Gibco BRL, Life technologies). A concentração utilizada para a obtenção da 1ª fita de cDNA, descrita a seguir, foi ajustada após leitura da absorbância a 260nm.

3.11.2. 1ª fita de cDNA

Foi utilizado tampão contendo: 50 mM TrisHCl pH 8,3; 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10 µM DTT, 0,6 mM dNTP, 60 µg de “ random hexamers primers” , 4 U inibidor de RNase (40U/µL), 1 µg de RNA total; 400 U de M-Mulv (200 U/µL), DEPC-água para 50 µL. Esta reação foi incubada por 2 horas a 37°C e a seguir por 3 min. a 95°C. A mistura reacional foi colocada em gelo (1 min.) e armazenada a -20°C.

3.11.3 RT-PCR quantitativo (Transcriptase Reversa- reação de polimerase em cadeia)

Os níveis de mRNA foram semi-quantificados através da técnica de RT-PCR comparando-se a densitometria das bandas de Bcl-2 com a densitometria da banda de beta-actina (controle interno) (QUATTRONE et al., 1995). A metodologia consiste primeiramente na determinação da faixa linear entre a quantidade de cDNA inicial amplificado e a quantidade de produto final. Para esta determinação foram amplificadas diluições seriadas de cDNA tanto de beta-actina como de Bcl-2 mantendo-se o mesmo número de ciclos de amplificação. Após esta definição, os cDNAs tanto do controle, e do Bcl-2 foram amplificados em tubos separados. Esta estratégia evita a formação de duplex decorrente do envolvimento de 2 pares diferentes de *primers* no mesmo tubo (HORIKOSHI et al., 1992). O cDNA do controle interno foi obtido da preparação total de cDNA. Após amplificação, os cDNAs foram separados em gel de agarose a 1 % e as bandas comparadas com a amplificação do controle interno. A reação de PCR consistiu em: 1-5

μL de cDNA, 400 nM de cada *primer*, 1X tampão de enzima, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de dNTP e 2,5 U de TAQ DNA polimerase. O volume final da reação foi de 50 μL. As condições da PCR foram as seguintes:

Bcl-2 - 319 pb: 5 min. 94°C para denaturação; 25 ciclos: 94°C 1 min; 56°C 1 min; 72°C 1 min e final de 72°C por 10 min.

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

Bcl-2 primer 3' - 5' - AGTCTTCAGAGACAGCCAGGA - 3'

Beta- actina - 540 pb: 5 min. 94°C para denaturação; 25 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' - 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA -3'

Beta-actina primer 3' - 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC - 3'

3.12. Análises estatísticas

Para se compreender a variabilidade da variável número de colônias, utilizaremos o modelo de Análise de Variância (ANOVA). Segundo este modelo, a variabilidade é tratada em função de um ou mais fatores. No caso de diferenças significativas o teste de Tukey-Kramer foi aplicado para identificar estas diferenças. O teste T de *Student* (paramétrico) também foi utilizado na análise da celularidade, número de CFU-GM e de células aderentes na cultura líquida de longa duração. Os testes não paramétricos aplicados para avaliar diferenças significativas entre os protocolos experimentais no ensaio de expressão de Bcl-2 foram ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de comparações múltiplas de Dunn.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de redução do MTT brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

O teste de redução MTT nos permitiu observar o comportamento citotóxico do Paladaciclo ferroceno 1:2 frente à linhagem leucêmica HL60. Através da análise da figura 3 a seguir, podemos observar que este composto apresenta uma concentração inibitória 50 % igual a 5,3 μM . Este resultado indica que esta droga é capaz de inibir o crescimento celular desta linhagem em doses mínimas, sugerindo portanto, a necessidade de estudos adicionais quanto ao seu potencial antileucêmico. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle.

4.2 Viabilidade celular em linhagem leucêmica HL60

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Azul de Trypan, na linhagem leucêmica HL60 frente a diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μM ; 2,36 μM ; 3,55 μM ; 4,73 μM ; 5,92 μM ; 14,8 μM e 29,6 μM) (Figura 4). Em relação a viabilidade celular, verificamos que o número de células viáveis foi dose-dependente, com um $\text{IC} = 2,5\mu\text{M}$. Por este método, mais uma vez verificamos que este composto interfere na proliferação de células leucêmicas HL60. Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle.

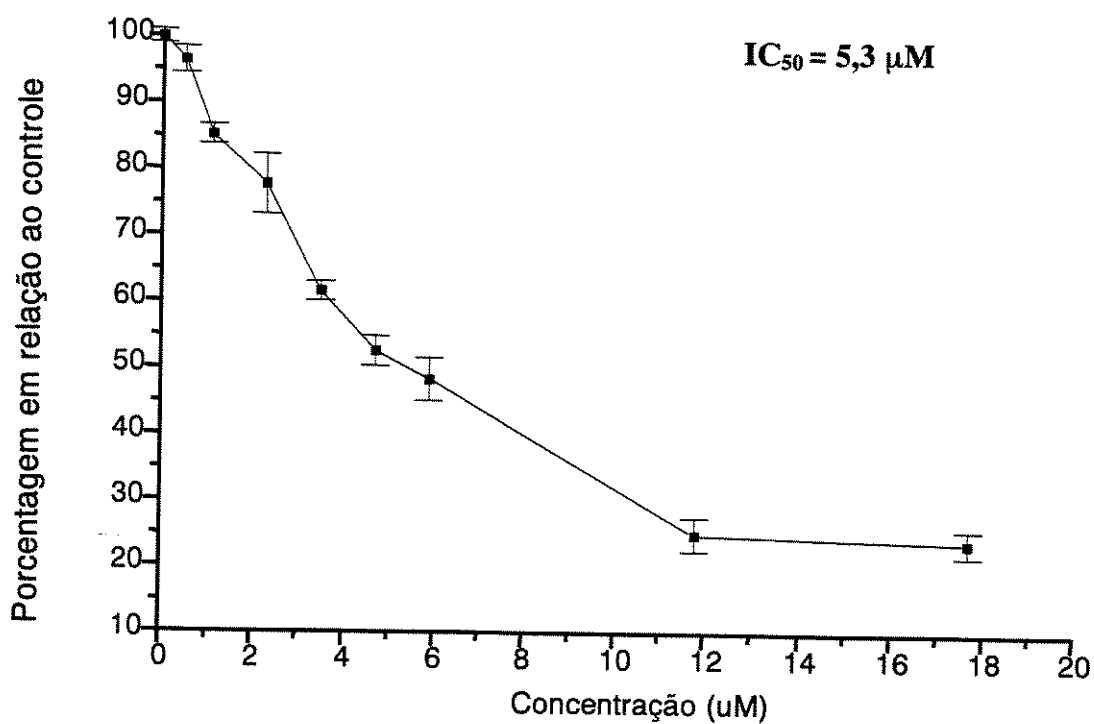


Figura 3: Citotoxicidade do Paladaciclo ferroceno 1:2 em células da linhagem HL60 após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Avaliação realizada pelo método de redução do MTT a cristais de formazan em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Leitura realizada através de ELISA em 570nm.

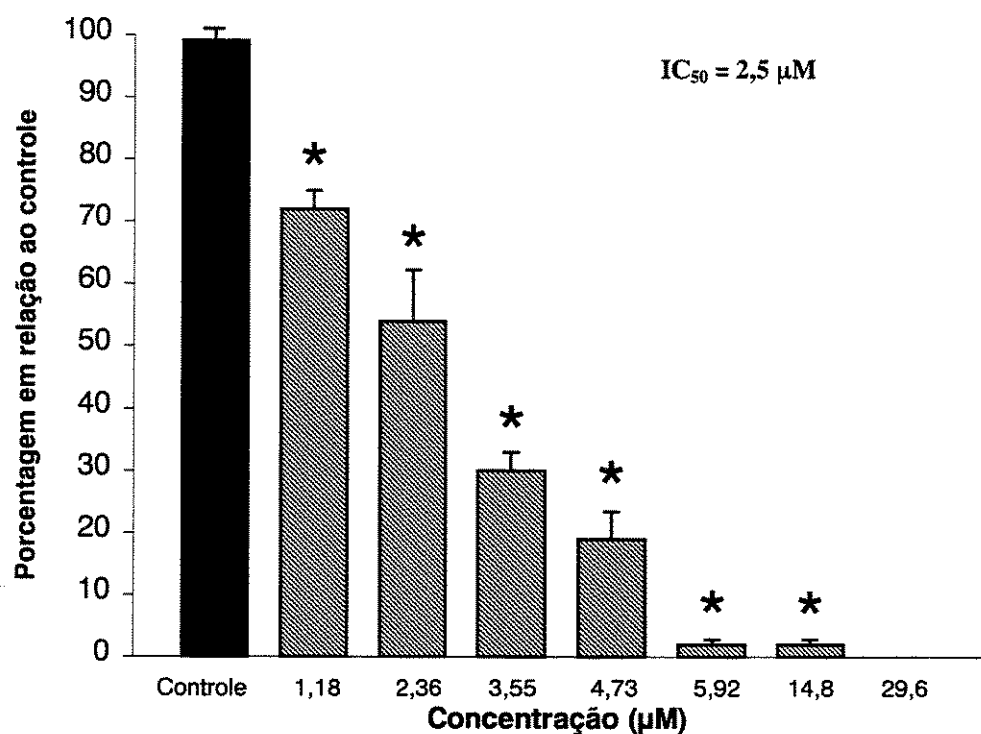


Figura 4: Número de células HL60 viáveis após a incubação com diferentes concentrações do composto Paladaciclo ferroceno 1:2. Esta avaliação foi realizada através do método de exclusão com Azul de Trypan, após a incubação das células leucêmicas com este composto por 72 horas, (*) significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).

4.3 Cultura Clonal in vitro dos precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais, na presença de diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 :

Os resultados apresentados na figura 5 demonstraram que a concentração de 1,18 μM não alterou o número de progenitores CFU-GM da medula óssea provenientes de animais normais. Por outro lado, uma diminuição dose-dependente no número de CFU-GM foi observada com concentrações iguais e/ou superiores a 2,36 μM . A IC obtida nesta avaliação foi de 4,7 μM . Os resultados estão expressos em percentagem em relação ao controle.

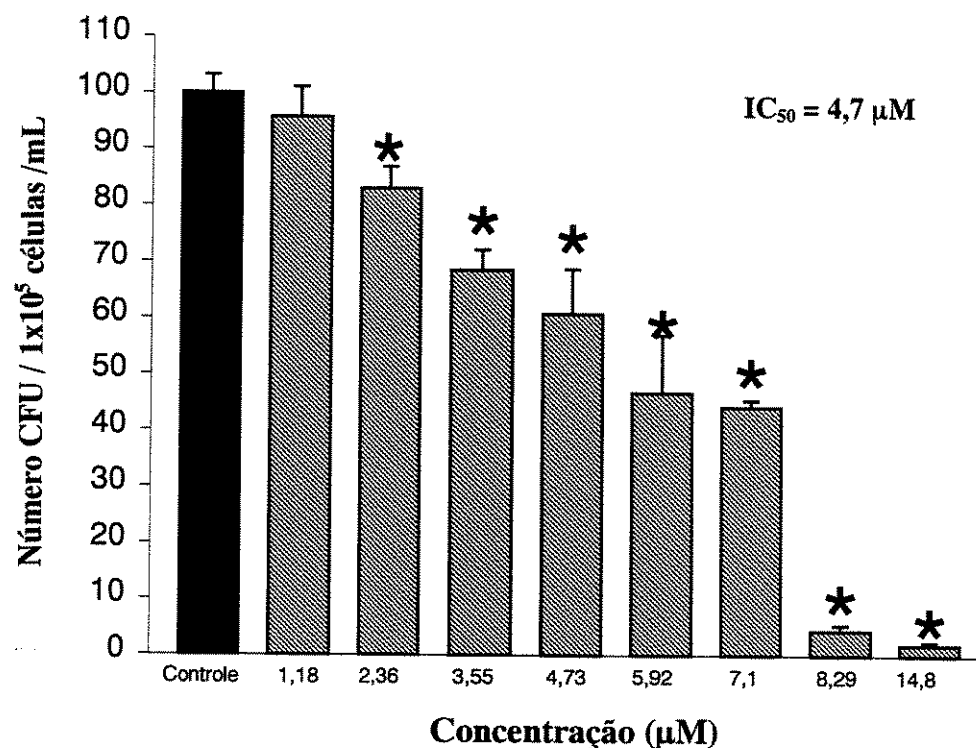


Figura 5: Atividade citotóxica de diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o número de progenitores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos normais. Avaliação realizada *in vitro*. A droga foi adicionada nas placas de cultura no momento de realização dos experimentos. * Significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).

4.4 Cultura clonal in vivo dos precursores hematopoiéticos a partir de células progenitoras da medula óssea de animais normais, animais portadores do TAE, animais tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2 e animais portadores do TAE e tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2 .

Estes resultados estão apresentados na figura 6. Nossos resultados demonstraram que o número de progenitores CFU-GM da medula óssea dos animais portadores do Tumor Ascítico de Ehrlich diminui de maneira significativa em relação aos animais normais controle. Quando estes animais foram previamente tratados com o compotos Paladaciclo ferroceno 1:2 por 4 dias consecutivos com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2, estes mantiveram a queda significativa no número de progenitores CFU-GM da medula óssea em relação ao controle normal. Por outro lado, os animais normais que receberam 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2 não apresentaram queda significativa no número de progenitores CFU-GM, demonstrando ausência de citotoxicidade para progenitores mielóides com esta concentração.

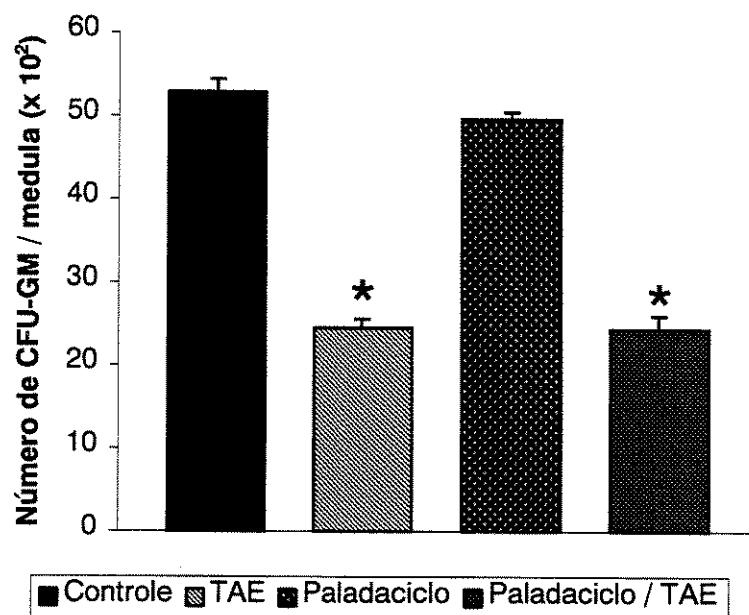


Figura 6: Número de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 células/mL) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o composto em estudo por via subcutânea durante 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foram realizados os ensaios de cultura clonal.* Significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).

4.5 Cultura clonal dos precursores hematopoiéticos a partir de células progenitoras obtidas do baço de animais normais, animais portadores do TAE, animais tratados com Paladaciclo ferroceno 1:2 e animais portadores do TAE e tratados com o Paladaciclo ferroceno 1:2 .

Nossos resultados demonstraram (figura 7) que o número de progenitores CFU-GM do baço nos animais portadores do tumor ascítico de Erhlich aumenta de maneira significativa em relação aos animais sem tumor. Quando estes animais foram tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2 por 4 dias consecutivos, iniciando-se 72 horas após a inoculação tumoral, a presença de hematopoiese extramedular (esplênica) também foi observada, indicando que a droga não interfere nesta resposta do hospedeiro na presença do tumor. Os animais normais que receberam 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2 também não apresentaram hematopoiese esplênica, sugerindo assim um baixo potencial toxicológico para este composto.

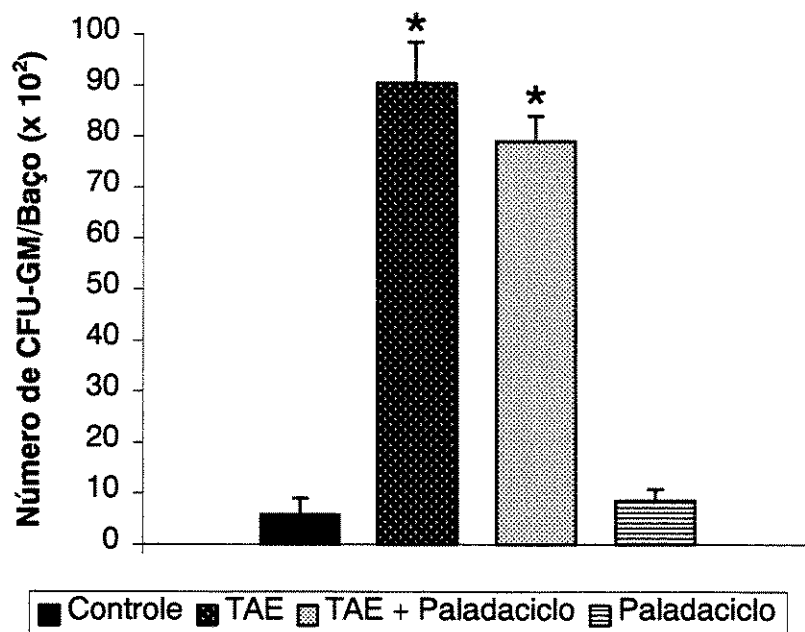


Figura 7: Colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) do baço de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 células/animal) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o composto em estudo por via subcutânea por 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foram realizados os ensaios de cultura clonal.* significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).

4.6. Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o peso do baço:

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 8. Nesta análise, mais uma vez, verificamos ausência de efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o baço de animais normais. Neste experimento o peso do baço dos animais apenas tratados com o Paladaciclo não apresentou alteração em relação ao peso obtido para os controle. Entretanto, os animais portadores do TAE e os animais portadores do TAE/tratados com $1,18\mu\text{M}$ do Paladaciclo ferroceno 1:2, apresentaram um aumento significativo no peso deste órgão quando comparado aqueles do controle normal. Portanto, podemos concluir que a droga não foi capaz de reverter a esplenomegalia observada nos animais portadores do TAE.

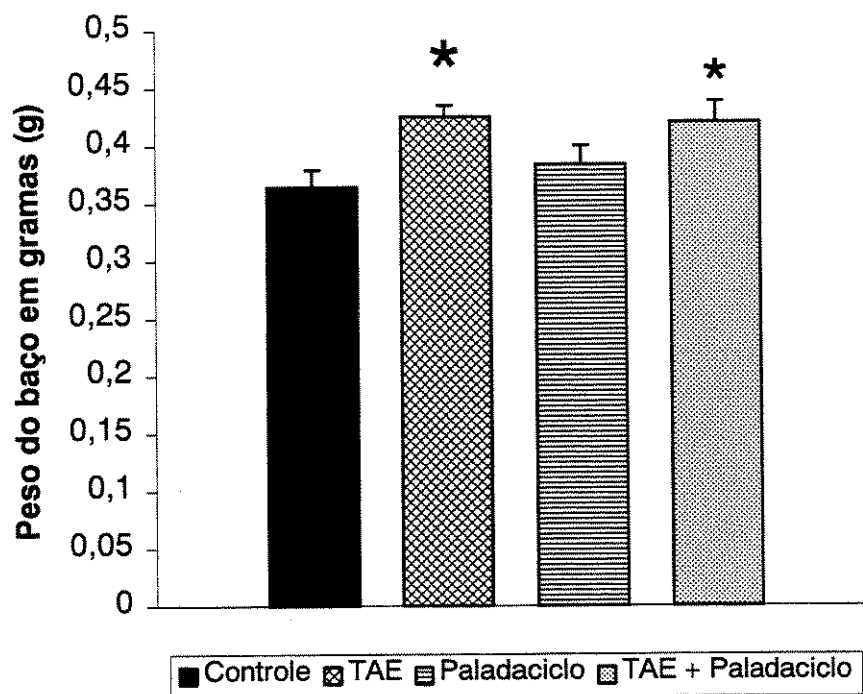


Figura 8: Peso do baço de camundongos portadores do TAE e tratados com 1,18 μ M Paladaciclo ferroceno 1:2. Os animais foram inoculados com as células tumorais (6×10^6 célula/animal) e 72 horas após este procedimento, foi iniciado o tratamento com o composto em estudo por via subcutânea por 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última dose da droga, foi realizada a mensuração do baço.* significativo em relação ao controle. ($P < 0,05$, ANOVA, Tukey-Kramer).

4.7 Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) sobre a formação do estroma medular in vitro e número de colônias (CFU-C) obtido a partir das células progenitoras obtidas no meio de cultura líquida de longa duração:

Nossos resultados demonstraram ausência de citotoxicidade do Paladaciclo ferroceno 1:2 na concentração de 1,18 μ M as células hematopoiéticas da medula óssea de animais normais, pois não verificamos alterações significativas na celularidade não aderente das culturas tratadas, quando comparada ao controle, nas semanas 1, 2 e 8 (figura 9). Além disso, verificamos também um aumento significativo no número de células aderentes do estroma medular nas culturas tratadas em relação àquelas sem tratamento, no final dos experimentos, ou seja, na 9ª semana (figura 10). Por outro lado, o número de CFU-GM, obtido semanalmente no sobrenadante das culturas líquidas a partir da quinta semana, apresentou-se reduzido em relação ao controle (figura 11), exceto na oitava semana, onde não houve diferenças significativas entre as culturas tratadas e não tratadas. As figuras 12 e 13 ilustram o aspecto morfológico das células aderentes da cultura de longa duração na quinta semana de incubação com o Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) e seu respectivo controle.

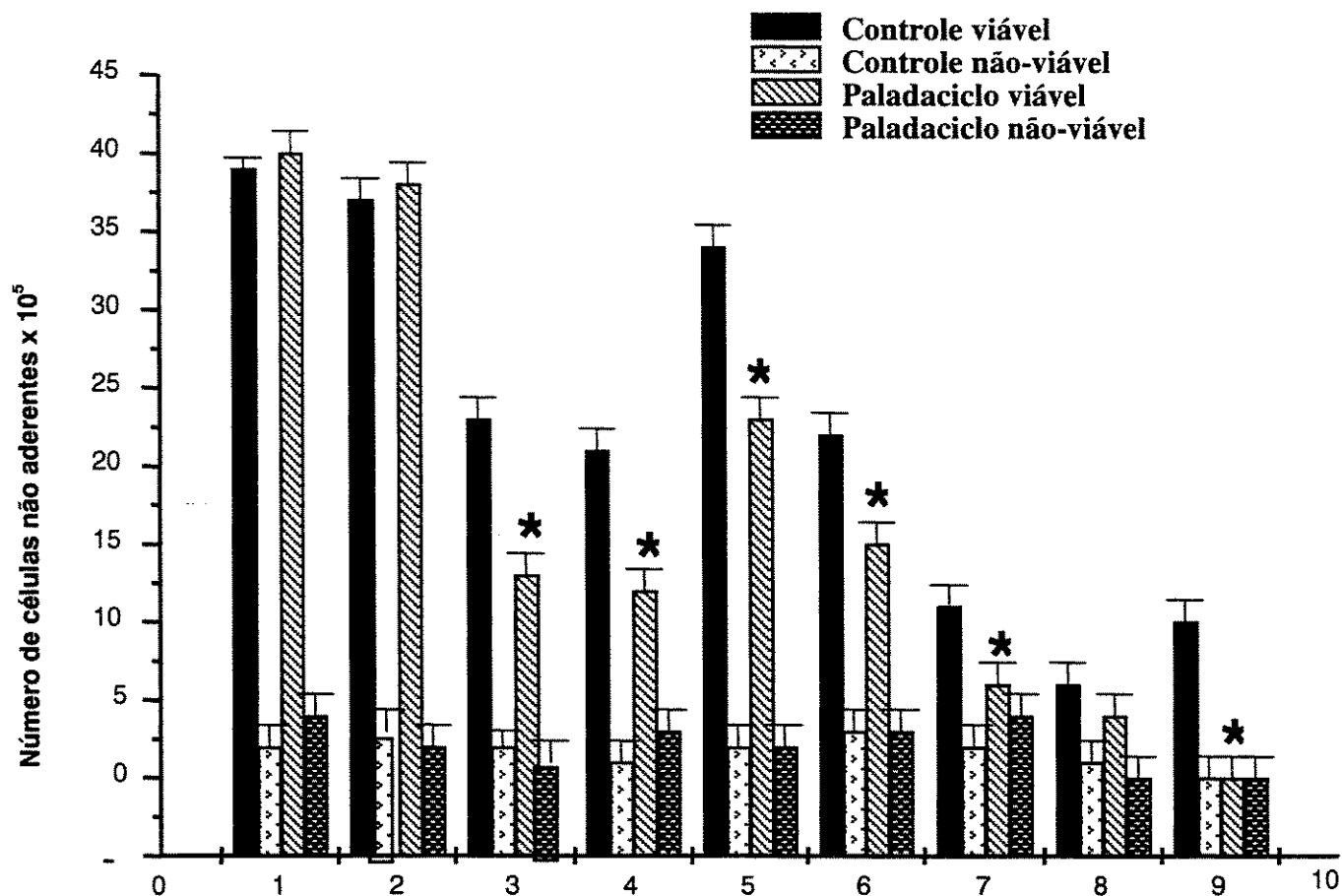


Figura 9: Número de células não-aderentes (viáveis e não viáveis) obtido semanalmente no sobrenadante das culturas líquidas de longa duração tratadas com o composto Paladaciclo ferroceno 1:2. O meio saturado foi trocado semanalmente por meio RPMI contendo a droga em estudo (1,18 μ M – concentração final). * Significativo em relação ao controle ($P < 0,05$, Teste T - *Student*).

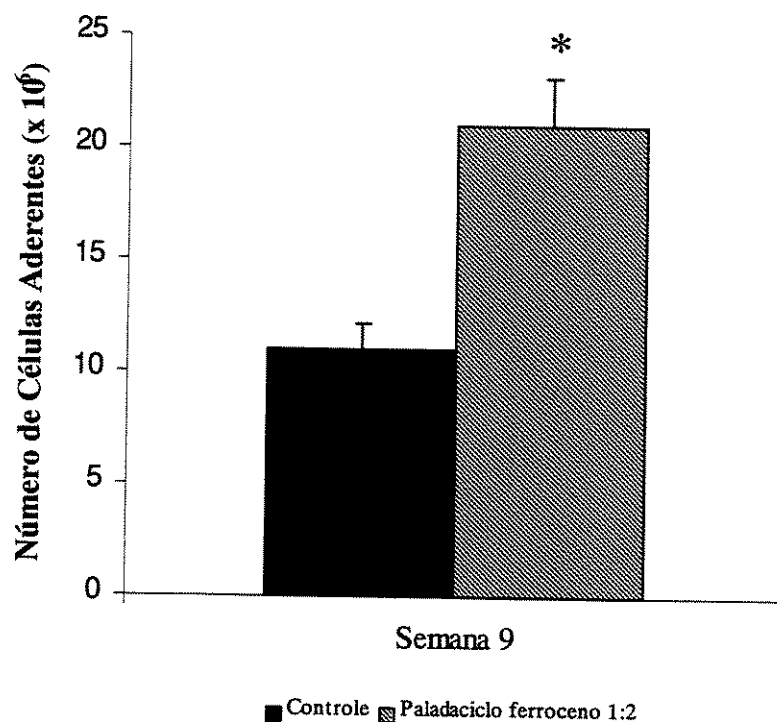


Figura 10: Efeito do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) sobre as células aderentes do estroma obtido a partir da medula óssea de animais normais. Avaliação realizada no final da cultura (9^a semana). * Significativo em relação ao controle ($P < 0,02$; Teste T - *Student*).

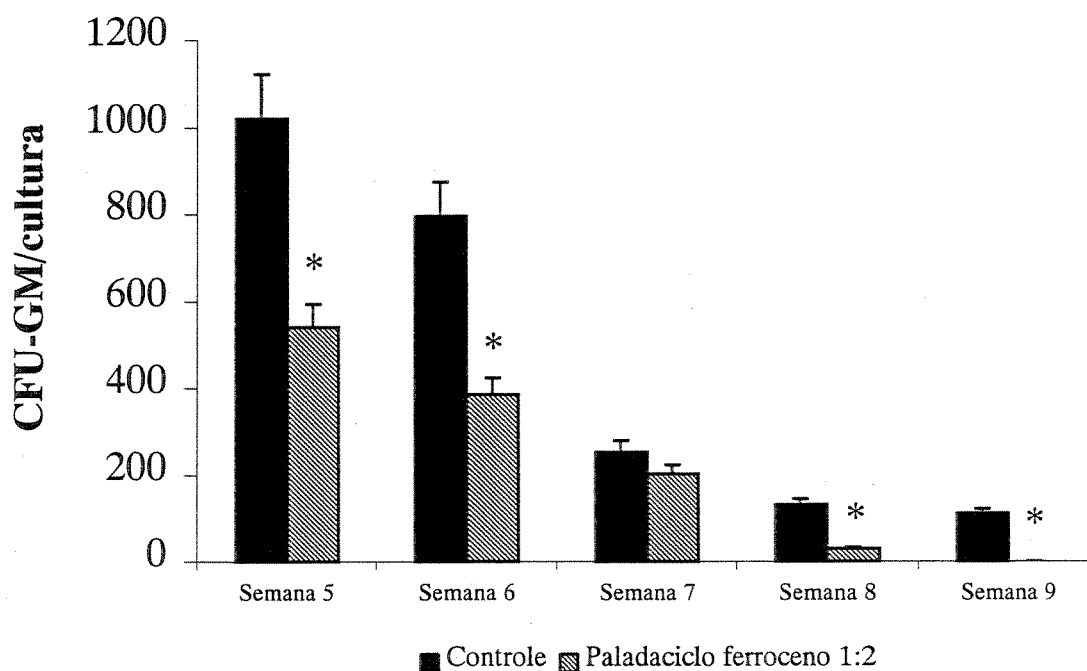


Figura 11: Efeito da incubação do composto Paladacilo ferroceno 1:2 (1,18 μ M) sobre a formação de colônias de precursores hematopoiéticos pra granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidas a partir das células não aderentes presentes no sobrenadante das culturas líquidas. Esta avaliação foi iniciada na 5ª semana de cultura, uma vez que as células aderentes formadoras do estroma medular já estavam em confluência.

* Significativo em relação ao controle ($P < 0,01$, Test T - *Student*).

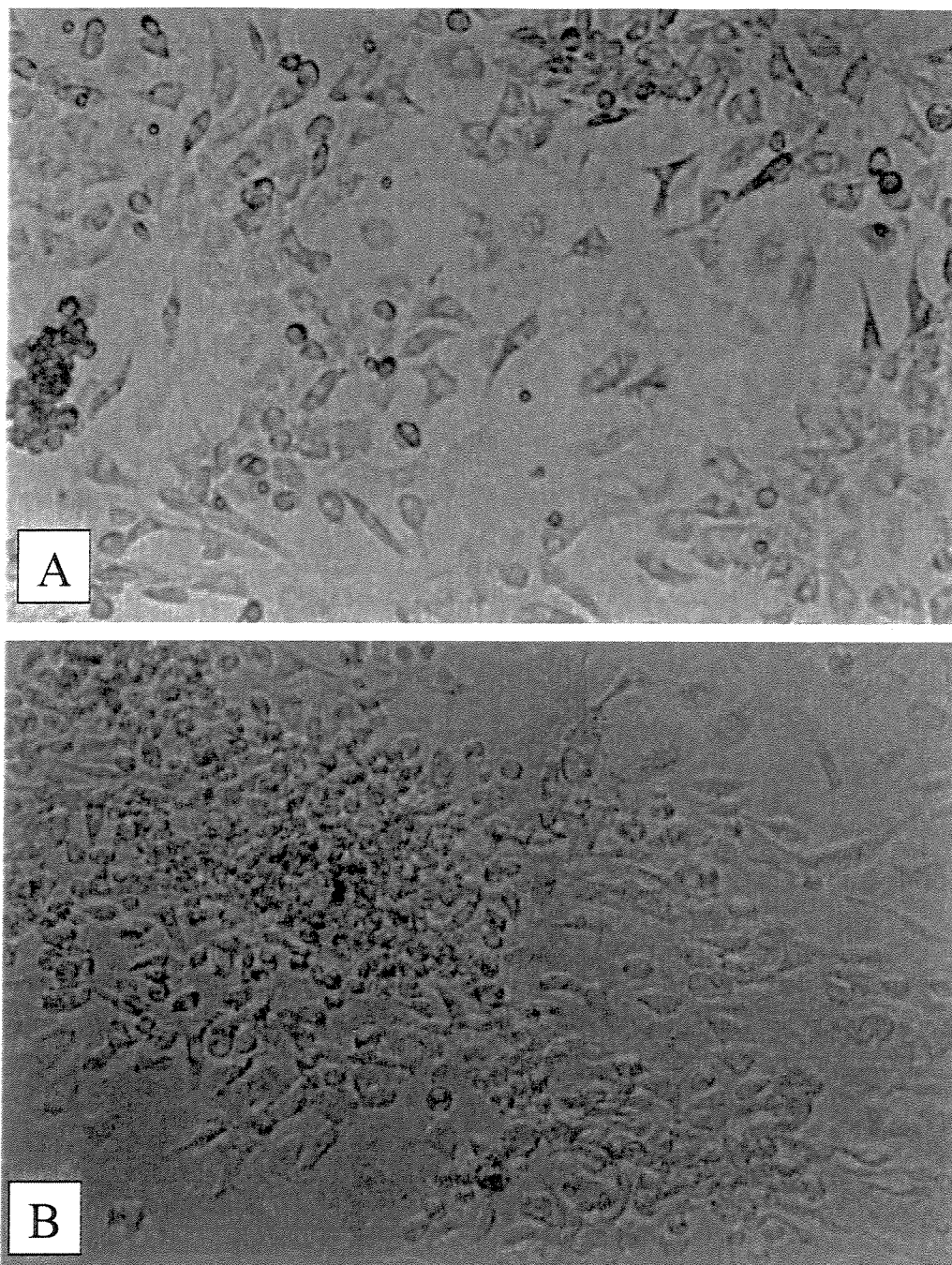


Figura 12: Aspecto microscópico do estroma medular na 5^a semana de cultura. A – cultura não tratada com o Paladaciclo (controle) e B – cultura tratada com o composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (concentração final 1,18 μ M). O meio de cultura foi renovado semanalmente. Aumento 200 x. Note a presença de áreas de concentração de células progenitoras nas culturas tratadas.

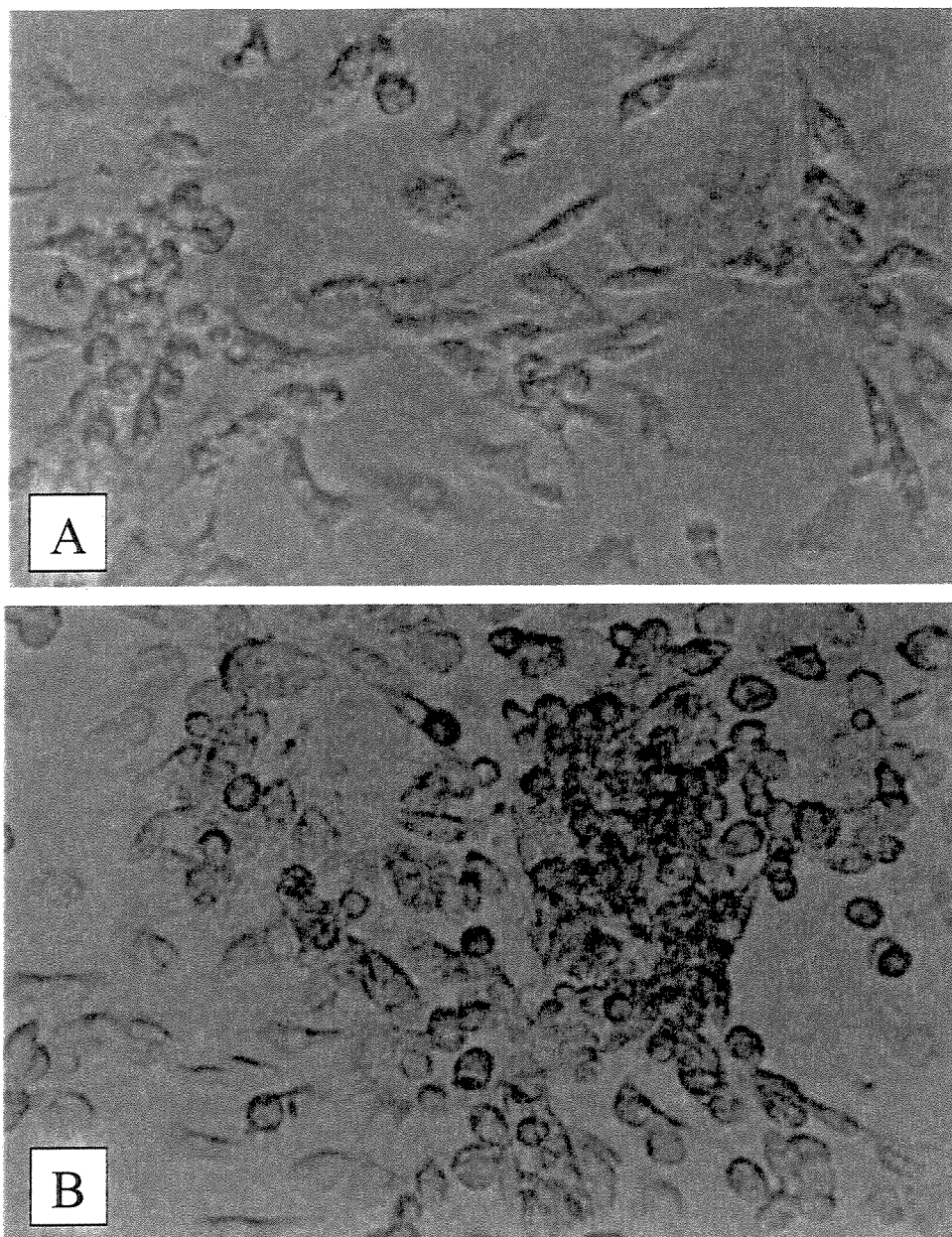


Figura 13: Aspecto microscópico do estroma medular na 5^a semana de cultura. A – cultura não tratada com o Paladaciclo ferroceno 1:2 (controle) e B – cultura tratada com o Paladaciclo ferroceno 1:2 (concentração final 1,18 μ M). O meio de ambas as culturas foi renovado semanalmente. Aumento 400 x. Note a presença de áreas de concentração de células progenitoras nas culturas tratadas.

4.8 Expressão do proto-oncogene Bcl-2 em células leucêmicas HL60 tratadas com o Paladaciclo ferroceno 1:2 :

Após contagem das lâminas, determinou-se a porcentagem de células positivas presentes e intensidade de coloração por meio de escala com 5 pontos. Não houve diferença estatística na intensidade de coloração entre as células controle e as células tratadas com 1,18 μ M; 2,36 μ M; 3,55 μ M; 4,73 μ M e 5,92 μ M (média da pontuação = 3). No entanto, para a concentração de 14,8 μ M, determinou-se médias de pontuação 1 com $p < 0,001$ em relação ao controle e as concentrações 1,18 μ M; 2,36 μ M; 3,55 μ M; 4,73 μ M e 5,92 μ M (ANOVA de Kruskal-Walles, teste de comparações múltiplas de Dunn).

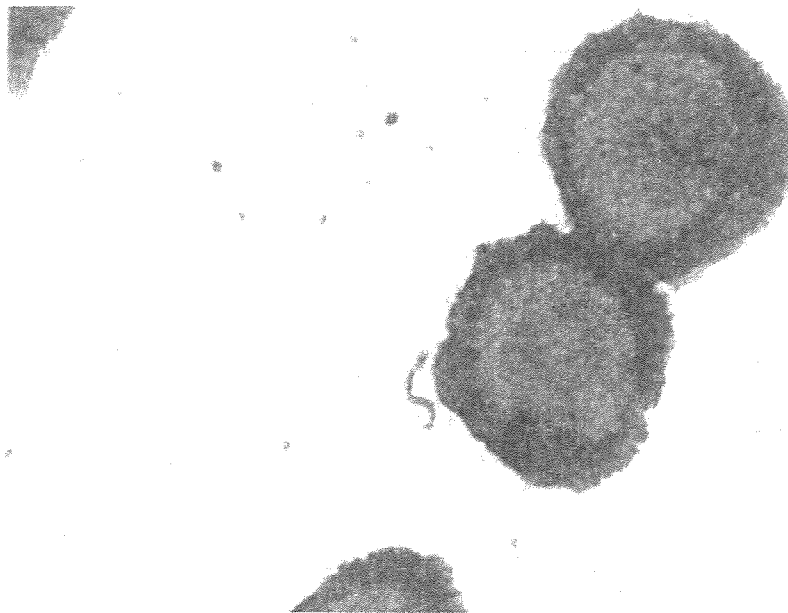


Figura 14: Expressão do proto-oncogene *Bcl-2* método APAAP: (fosfatase alcalina- anti-fosfatase) em células HL60 não incubadas. Note a intensidade de expressão de *Bcl-2* em células HL60. (Aumento 400 x).

4.9 Avaliação da transcrição gênica do Bcl-2, em células leucêmicas HL60 pelo método de RT-PCR:

Esta análise confirmou os resultados obtidos nos ensaios de imunocitoquímica, pois verificamos pelo método de RT-PCR, que o Paladociclo ferroceno 1:2 não é capaz de modular a expressão de Bcl-2 em células HL60 incubadas por 72 horas com 1,18mM, 3,55mM, e 5,92mM.

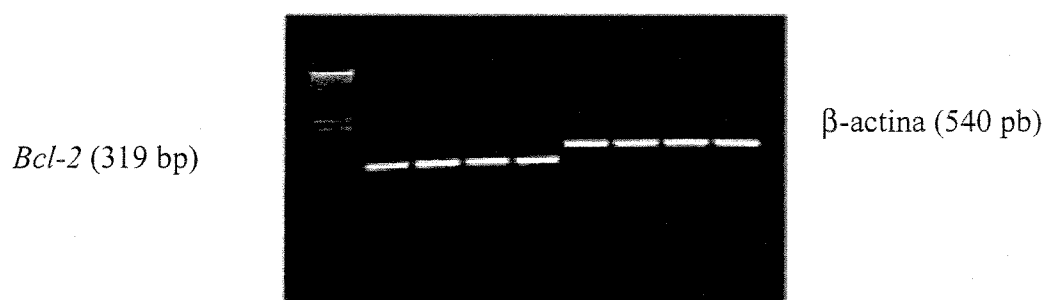


Figura 15: Análise por RT-PCR da expressão de genes envolvidos no processo apoptótico em células leucêmicas HL60 na presença de concentrações crescente do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μ M, 3,55 μ M e 5,92 μ M). Amplificação do cDNA para b-actina e Bcl-2 está apresentada e identificada na figura acima.

5. DISCUSSÃO

Historicamente, as análises iniciais de novos agentes antineoplásicos baseiam-se na eficácia contra uma série de tumores murinos transplantáveis (CORBETT et al.,1987). No entanto, com o propósito de superar possíveis limitações nas avaliações de novos compostos antitumorais, emprega-se hoje em dia, linhagens celulares derivadas de tumores humanos (FRICKER et al.,1989). Neste sentido, avaliou-se previamente, a atividade citotóxica do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 *in vitro*, para posteriormente, ser realizada a avaliação *in vivo*.

Os resultados obtidos sugerem que o Paladaciclo ferroceno 1:2 apresenta potencial antitumoral, uma vez que este composto foi capaz de interferir na proliferação e viabilidade das células leucêmicas HL60, sendo importante salientar, que esta linhagem apresenta células com grande capacidade de resistência aos quimioterápicos convencionais (EDELSTEIN, et al., 1988). A citotoxicidade deste composto foi verificada pelos testes de exclusão do Azul de Trypan e redução do MTT a formazan, fornecendo deste modo, os primeiros parâmetros relacionados às concentrações inibitórias do Paladaciclo ferroceno 1:2. O teste de redução do MTT nos forneceu um IC de 5,3 μ M. Este valor de concentração inibitória foi menor no teste de exclusão pelo Azul de Trypan, o qual nos forneceu um IC de 2,5 μ M. A diferença obtida nas concentrações inibitórias descritas acima poderia ser explicada, pelo menos em parte, pelos diferentes princípios dos métodos, pois o teste de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT a cristais de formazan (OSORIO et al., 1998). Por outro lado, o teste de exclusão do azul de Trypan avalia a capacidade da célula de permitir a entrada do corante através da membrana plasmática e em seguida, conseguir expulsá-lo para o meio extracelular. Portanto, é possível que embora a membrana celular apresente danos causados pelo Paladaciclo ferroceno 1:2, as organelas citoplasmáticas ainda estejam em condições de realizar algumas das funções

bioquímicas como por exemplo as mitocôndrias, local da reação na qual se baseia o teste de redução do MTT a formazan (SCUDIERO et al., 1988).

Ao avaliarmos os efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) *in vitro*, obtivemos um IC similar ao obtido no teste de redução do MTT a formazan, ou seja, 4,7 μM . Por outro lado, este valor de concentração inibitória média foi maior quando comparamos com aquele obtido pelo teste de exclusão do azul de trypan. Levando em consideração que a medula óssea é um tecido de renovação rápida, altamente susceptível à agentes tóxicos (BREIDENBACH et al., 2003; LAUFS et al., 2003; SCHEY et al., 2003), nossos resultados sugerem uma maior citotoxicidade do composto em estudo para células leucêmicas HL60 em relação às células normais. Além disso, é importante salientarmos que a menor concentração testada no experimento de CFU-GM (1,18 μM), já foi capaz de diminuir o número de células HL60 viáveis quando analisado pelo método de exclusão do azul de trypan. Por outro lado, em células de medula óssea normal, esta concentração não causou nenhuma alteração na formação de colônias mielóides. Portanto, esta dose (1,18 μM) foi utilizada nos ensaios de cultura clonal *in vivo*, em animais inoculados com células do TAE.

Em relação às alterações hematopoiéticas induzidas pelo TAE, vários trabalhos na literatura têm demonstrado que este tumor é capaz de provocar uma mielossupressão, normalmente expressa pela diminuição no número de precursores hematopoiéticos CFU-GM. Um dos mecanismos sugeridos para a causa desta supressão da medula óssea é a capacidade deste tumor de induzir a liberação de substâncias inibitórias do sistema imunológico, como a prostaglandina da série E – PGE_2 (FECCHIO et al., 1990). Na presença de PGE_2 , ocorre uma inibição do influxo inflamatório e alterações nas funções de macrófagos com inibição da proliferação de células T e bloqueio da ação de $\text{TNF-}\alpha$ nos macrófagos (YOUNG e HOOVER, 1986; NELSON et

al.,1990; ALLEVA et al.; 1993; SEGURA et al., 1997). Neste sentido, observamos em nossos estudos mais uma vez uma diminuição significativa no número de colônias para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) em animais portadores do TAE. Além disso, a presença desse tumor também foi capaz de induzir a hematopoiese extramedular, que manifestou-se pelo aumento no número de precursores hematopoiéticos CFU-GM no baço de animais portadores deste tumor. Em paralelo, foi observada uma ligeira esplenomegalia nos baços desses animais, confirmada pelo aumento do peso desses órgãos.

A presença de hematopoiese esplênica na presença do TAE já está bem caracterizada na literatura (VALADARES et al., 1998; JUSTO et al., 2001; QUEIROZ et al., 2001.). Porém, a consequência de tal efeito no desenvolvimento tumoral, ainda não foi totalmente esclarecida. Sabe-se que na vida adulta, a hematopoiese é restrita à medula óssea. No entanto, algumas patologias como o câncer, falência ou disfunção do microambiente medular e também a exposição a substâncias tóxicas podem induzir a hematopoiese extramedular em órgãos como baço e fígado, mesmo durante a vida adulta, pois estes órgãos mesmo inativos reservam no período pós-natal um potencial hematopoiético (STADECKER e WRIGHT, 1984). Em nossos estudos, a hematopoiese esplênica foi verificada apenas na presença do TAE. Por outro lado, tratamento com o Paladaciclo ferroceno 1:2 não causou nenhuma alteração no baço dos animais, pois tanto o número de progenitores hematopoiéticos como o peso deste órgão, não apresentaram nenhuma alteração em relação ao controle.

Com relação aos animais portadores do TAE/tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2, também não observamos nenhuma proteção desta droga nestes camundongos em relação aos animais apenas portadores deste tumor, confirmando resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (CAIRES et al., submetido). Estes resultados podem estar relacionados ao fato desta droga ser mais ativa contra tumores malignos por inibir a Catepsina B em *estudos in vitro* e *in vivo* (CAIRES et al., 2000), a qual está

envolvida na degradação de componentes da matriz extracelular nos processos metastáticos (NAKAGINA et al.; 1983; MIGNATTI et al.; 1996; COLELLA et al.; 2002.). Neste sentido, como já descrito na introdução, o tratamento com esta droga aumentou significativamente a sobrevivência de ratos portadores do tumor de Walker, em paralelo a uma diminuição dose-dependente da massa tumoral. Este tumor é metastático, e expressa altas concentrações de Cathepsina B, a qual é inibida na presença do Paladaciclo ferroceno 1:2, como descrito anteriormente (CAIRES et al., submetido). Estes resultados sugerem uma certa especificidade deste composto por alguns tumores.

Esta ausência de efeitos protetores do Paladaciclo ferroceno 1:2 pode ser explicada, pelo menos em parte, pelos resultados obtidos na cultura líquida de longa duração. Nesta análise, observamos que o Paladaciclo ferroceno 1:2 induz um aumento significativo no número de células aderentes formadoras do tecido estromal no final dos experimentos, como demonstrado pelo aumento da celularidade das culturas destacando-se um aumento nas áreas de *cobblestone*, locais de alojamento das células jovens. Além disso, o tratamento dessas culturas com o composto mostrou ausência de citotoxicidade, pois o número de células não aderentes não viáveis das culturas tratadas apresentou-se similar ao controle durante todo o período de estudo. Por outro lado, o número de células viáveis mostrou-se diminuído nas culturas tratadas nas semanas 3,4,5,6,7 e 9. Resultados similares para o número de CFU-GM, obtido semanalmente no sobrenadante das culturas líquidas foram observados. O CFU-GM apresentou-se reduzido em relação às culturas sem tratamento nas semanas 5, 6, 8 e 9, enquanto que resultados similares foram obtidos para as culturas tratadas e não tratadas, na 7ª semana de experimento.

Este padrão de resposta tem sido observado com drogas inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA), como por exemplo o Captropil (CHISI et al., 1999). Neste sentido, realizados por nosso grupo de estudo demonstraram por métodos espectrofluorimétricos, que o Paladaciclo

ferroceno 1:2 também é um potente inibidor da ECA em concentrações mínimas (BINCOLETTTO et al.; 2003). Recentemente, o papel da ECA na regulação da resposta hematopoiética tem sido amplamente investigado por vários pesquisadores (COMTE et al., 1998; ROUSSEAU-PLASSE et al., 1998; GAUDRON et al., 1999; JUNOT et al., 1999; AZIZI et al., 2000; RODGERS et al., 2000; AZIZI et al., 2001; JUNOT et al., 2001). CHISI et al. (1999), demonstraram que a inibição desta enzima resulta em um aumento na concentração de um de seus substratos endógenos, o tetrapeptídeo hematoregulador AcSDKP, o qual regula negativamente a hematopoiese, impedindo que as células pluripotentes da medula óssea entrem na fase S do ciclo celular. (AZIZI et al., 1996; MICHAUD et al., 1997; GAUDRON et al., 1999). Portanto, a similaridade de nossos resultados com aqueles obtidos na resposta hematopoiética na presença de inibidores da ECA, sugere que o composto Paladaciclo ferroceno 1:2 também regule a resposta hematopoiética através de um acúmulo do tetrapeptídeo hematoprotetor AcSDKP. Este aumento nas concentrações do AcSDKP explicaria, pelo menos em parte, o maior número de células aderentes na cultura de longa duração e o menor número de colônias de progenitores CFU-GM. Além disso, este aumento nas concentrações do AcSDKP também pode estar envolvido nas variações obtidas na celularidade viável a partir da terceira semana de cultura e no número de CFU-GM na sétima semana de cultura, quando, não foi observada uma redução significativa em relação ao controle. Levando em consideração que na camada de células aderentes existem macrófagos aumentam com o período de cultura (DEXTER, 1979), e que estes produzem ECA (COSTEROUSSE, et al., 1993), provavelmente o peptídeo AcSDKP começaria a ser clivado por essas novas enzimas produzidas e sua atividade hematoprotetora seria ligeiramente interrompida até que os níveis endógenos de AcSDKP não clivado voltassem a aumentar (BONNET, et al., 1992). De fato, a literatura científica demonstra que as concentrações do AcSDKP variam durante o período de cultura, pois este tetrapeptídeo tem uma meia vida biológica de 4,5 minutos (EZAN, et al.,

1994). Portanto, uma variação das concentrações do tetrapeptídeo poderia estar relacionada com as variações observadas nos parâmetros citados acima. Sendo assim, podemos sugerir que o Paladaciclo ferroceno 1:2 em baixas concentrações (1,18 μM) também é capaz de impedir que células jovens da medula óssea entrem na fase S do ciclo celular, devido a um aumento nas concentrações do tetrapeptídeo AcSDKP, abrindo perspectivas de estudos em relação ao seu potencial hematoprotetor. Além disso, levando também em consideração a curta meia vida biológica do tetrapeptídeo AcSDKP, fator este, que prejudica sua distribuição e manutenção da faixa terapêutica constata, a pesquisa de compostos quimicamente relacionados, que interfiram nos níveis deste tetrapeptídeo, como as drogas inibidoras da ECA, pode contribuir para o desenvolvimento de uma nova droga hematoprotetora. Além disso, uma possível explicação para o fato do Paladaciclo ferroceno 1:2 não conseguir reverter a mielossupressão causada pelo TAE seria a atividade deste composto sobre a ECA o que provocaria um acúmulo do tetrapeptídeo AcSDKP e conseqüentemente um aumento no número de células aderentes do estroma medular, não permitindo assim, que a medula óssea pudesse responder à agressão tumoral.

É importante salientarmos ainda, que os hematoprotetores estudados atualmente como o tetrapeptídeo AcSDKP (MASSÉ et al., 1998) não apresentam efeitos inibitórios sobre células tumorais, ao contrário deste Paladaciclo que estamos pesquisando, que também apresentou uma inibição no crescimento de células da linhagem leucêmica HL60.

Em relação aos efeitos do Paladaciclo sobre a expressão de genes envolvidos na apoptose celular, avaliados pela da técnica de imunocitoquímica (foafatase alcalina/anti-fosfatase – APAAP) e RT-PCR, verificamos que este composto não modifica a expressão de Bcl-2, a qual interfere no processo de morte celular programada, conhecido como apoptose (HUANG et al., 2002). A apoptose é um ativo e bem regulado processo caracterizado por fenômenos específicos como por exemplo, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (SQUIER et al., 1995).

A família de proteínas Bcl-2 associadas à indução de apoptose é constituída por membros que inibem este processo (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1) e outros que o induzem (Bax, Bad, Bcl-x). Portanto, o balanço entre membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos determinam o destino das células em muitos sistemas (KROEMER, 1997; DAÍ et al., 2000; FARID et al., 2001; MARTINEZ-ARRIBAS et al., 2003). Bcl-2 é uma proteína da membrana mitocondrial que inibe este processo impedindo a liberação de citocromo c e conseqüentemente a ativação das caspases efetoras da morte celular (KOO et al., 2002). Portanto, a elevada expressão desta proteína também interfere na resposta à quimioterapia possibilitando a sobrevivência de clones de células malignas, que contribuem para o insucesso e/ou resistência à quimioterapia (KIM, et al., 2001).

Neste sentido, utilizando o método da fosfatase alcalina - anti-fosfatase (APAAP), procuramos encontrar sinais de modulação da expressão gênica de Bcl-2 pelo Paladaciclo ferroceno 1:2 em células HL60. No entanto, apenas as concentrações iguais ou superiores a 14,8 μ M, promoveram uma redução na expressão do proto-oncogene Bcl-2 quando estudado por esta técnica. Após a realização do método da fosfatase alcalina, avaliamos a expressão gênica do proto-oncogene Bcl-2, utilizando a técnica de RT-PCR. O padrão observado no ensaio imunocitoquímico se repetiu neste experimento. Concentrações menores ou iguais a 5,92 μ M não conseguiram modular a expressão de Bcl-2, o que sugere que esta via de indução da apoptose não está relacionada aos resultados obtidos em trabalhos paralelos realizados por nosso grupo de estudos utilizando a reação de Feulgen acoplada a análise de imagem, indicando que a apoptose é um dos mecanismos de citotoxicidade do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 (resultados não publicados). Portanto, outras vias de ativação da apoptose podem estar envolvidas independentemente da via Bcl-2, como por exemplo, a via dos receptores para ligantes Fas (KOJI et al., 2003) e TNF (CLERMONT et al., 2003).

Assim sendo, levando todos os resultados obtidos pelo nosso grupo em consideração, podemos sugerir que estamos diante de um novo composto com propriedades reguladoras da hematopoiése e atividade citotóxica em células leucêmicas.



6. CONCLUSÕES

O presente trabalho sobre o potencial farmacológico e toxicológico do composto Paladaciclo ferroceno 1:2 permite concluir:

Estudos *in vitro*

- O paladaciclo ferroceno 1:2 (1,18 μM) ~~diminui~~ ^{diminuiu} o número de células aderentes do estroma medular e diminui o número de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) obtidos do sobrenadante das culturas líquidas.
- O número de células viáveis do sobrenadante das culturas líquidas oscila durante o período de incubação, sugerindo o envolvimento do estroma na diminuição observada na celularidade nas semanas 3, 4, 5, 6, 7 e 9.
- A expressão de Bcl-2 não é alterada em células HL60 após o tratamento com diferentes concentrações deste composto, sugerindo que esta via de indução de apoptose não está relacionada com a citotoxicidade deste composto em células HL60.
- As células leucêmicas HL60 são mais susceptíveis aos efeitos citotóxicos desta droga do que células progenitoras da medula óssea de animais normais.

Estudos *in vivo*

- A administração de 1,18 μM do Paladaciclo ferroceno 1:2 não foi capaz de reverter os efeitos supressores sobre a hematopoiése medular a presença da hematopoiése extramedular induzidos pelo desenvolvimento tumoral.
- A hematopoiése esplênica não se manifesta em animais apenas tratados com este composto, o que sugere uma baixa toxicidade desta droga em baixas concentrações.

7. ABSTRACT

In this work we have investigated the pharmacological and toxicological potential of a new organometallic compound containing palladium as transition metal, which was called in this study by Palladacycle ferrocene 1:2. Thus, to evaluate the antitumoral activity *in vivo*, we have analysed the growth and differentiation of granulocyte-macrophage progenitor cells (GM-CFU) in the well established Ehrlich ascites tumor (EAT) experimental model. Our results have demonstrated that the Palladacycle ferrocene 1:2, administered for four consecutive days at a dose of 1 mg/kg (sc), was not able to revert the myelosuppression induced by the EAT development. Similar results were obtained when we studied the splenic hematopoiesis, since this pathological condition that is induced by the tumor, was not inhibited by the administration of Palladacycle ferrocene 1:2. This characteristic was not observed in normal mice that received the same treatment schedule suggesting a low systemic toxicity for this drug.

The *in vitro* studies, using the clonal culture technique, have demonstrated a dose-dependent reduction in the number of granulocyte-macrophage progenitor cells (GM-CFU) of cultures treated with Palladacycle ferrocene 1:2. However, the smallest concentration (1,18 μ M) analyzed in this assay, showed no toxicity to the bone marrow progenitor cells. This same concentration (1,18 μ M), when added to the long-term bone marrow culture, significantly increased the number of adherent stromal cells in relation to the control non-treated cultures. This effect was accompanied by a larger number of cobblestone areas, site of lodging of the young cells in the long-term cultures, in these cultures.

The cytotoxicity of this compound, analyzed by the Trypan Blue exclusion test and the MTT colorimetric assay, showed an IC of 2,5 μ M and 5,3 μ M, respectively. The difference obtained for the inhibitory concentrations described above could be explained, at least in part, by the different methods used. The MTT test evaluates the capacity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase to reduce the MTT to

formazan crystals and the Trypan Blue exclusion test evaluates the cell integrity of the membrane.

The Bcl-2 expression, which controls the programmed cell death and/or the resistance of the malignant cells to chemotherapeutic agents, was unaltered in the presence of different Palladacycle ferrocene 1:2 concentrations. This absence of effects on the expression of this gene was verified by immunocytochemistry (method of alkaline phosphatase, anti-alkaline phosphatase-APAAP) and by RT-PCR techniques. These results suggest that other mechanisms are involved in the induction of apoptosis by this compound (which was verified in studies that are in progress in our laboratory using Feulgen reaction).

Finally, we suggest that this compound, in low concentrations, modulates the hematopoietic response and it also presents cytotoxicity in HL60 cell line. Studies *in vivo* are in progress in our laboratory to characterize the molecular events involved in the hematopoietic response to this drug.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALI, H.; HAZNEDAROGLU, I.C.; GOKER, H.; CELIK, I.; OZATLI, D.; KORAY, Z. Circulating and local bone marrow renin-angiotensin system in leukemic hematopoiesis: preliminary evidences. **Hematol**, 7:75-82, 2002.

ABOUL-ENEIN, A. M. Inhibition of tumor growth with possible immunity by Egyptian garlic extracts. **Nahrung**, 30:161-9, 1986.

ALLEN, T.D.; DEXTER, T.M. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. **Exp Hematology**, 12(7):517-21, 1984.

ALLEVA, D.G.; BURGER, C.J.; ELGERT, K.D. Interferon-gamma reduces tumor-induced Ia- macrophage-mediated suppression: role of prostaglandin E2, Ia, and tumor necrosis factor-alpha. **Immunopharmacology**, 25:215-27, 1993.

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.

AZIZI, M. ; JUNOT, C. ; EZAN, E. ; MENARD, J. Angiotensin I-converting enzyme and metabolism of the haematological peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 28:1066-9, 2001.

AZIZI, M. ; ROUSSEAU, A. ; EZAN, E. ; GUYENE, T. ; MICHELET, S. ; GROGNET, J. et al. Acute angiotensi-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. **J Clin Invest**, 97:839-44, 1996;

AZIZI, M.; MASSIEN, C.; MICHAUD, A.; CORVOL, P. In vitro and in vivo inhibition of the 2 active sites of ACE by omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor. **Hypertension**, 35:1226-31, 2000.

BINCOLETTTO, C.; OLIVEIRA, C.; SMITH, M.; HERMELY, J.; JULIANO, M.; CAIRES, A. Cyclopalladated complex inhibits the ACE activity in vitro and progenitor cells proliferation in murine bone marrow cultures. **Exp Hematol**, 31: 201, 2003.

BINCOLETTTO, C. ; SAAD, S.T. ; SILVA, E.S. ; QUEIROZ, M.L.S. Hematopoietic response and bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**, 62: 38-42, 1998.

BINCOELTTO, C.; SAAD, S.T.; da SILVA, E.S.; QUEIROZ, M.L. Hematopoietic response and bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**, 62:38-42, 1999.

BONNET, D.; LEMOINE, F.M.; KHOURY, E.; PRADELLES, P.; NAJMAN, A.; GUIGON, M. Reversible inhibitory effects and absence of toxicity of the tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) in human long-term bone marrow culture. **Exp Hematol**, 20:1165-9, 1992.

BOROJEVIC, R.; CARVALHO, M.A.; CORREA-JUNIOR, J.D.; ARCANJO, K.; GOMES, L.; JOAZEIRO, P.P. Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. **Cell Tissue Res**, 24, 2003 [Epub ahead of print].

BOSCHERT, M.T. ; BECKERT, B.W. ; PUCKETT, C.L. ; CONCANNON, M.J. Analysis of lipocyte viability after liposuction. **Plast Reconstr Surg**, 109(2):761-5; discussion 766-7, 2002.

BREIDENBACH, M.; REIN D.T.; SCHONDORF, T.; SCHMIDT, T.; KONING, E.; VALTER, M. et al. Hematological side-effect profiles of individualized chemotherapy regimen for recurrent ovarian cancer. **Anticancer Drugs**, 14:341-6, 2003.

CAIRES, A. C. F.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, 22: 329-34, 1999.

CAIRES, A. C. F., RODRIGUES, F. A. ; KAKISHIMA, L. A. Paladaciclos como inibidores de cisteíno-proteases. Estudos pela técnica de FTIR/ATR. **Rev Soc Quim Mex**, 46: 179 - 79, 2002.

CAIRES, A.C.F.; TRINDADE, C.B.; TERSARIOL, I.L.S. Brazilian Patent-PI 0204160. **Industrial Property Magazine RPI** , 1666, December, 2002.

CAIRES, A.C.F. ; TERSARIOL, I.L.S. ; OLIVEIRA, C.R. ; DREHER, S. ; NASCIMENTO, F.D.; TRINDADE, C.B. Chiral cyclopalladated complexes derivated from N,N-dimethyl-1-phenethylamine and 1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene as inhibitors of cathepsin B activity and as anti-tumoral agents. **J Med Chem**, Submetido, 2003

CARUSO, F.; ROSSI, M. ; TANSKI, J. ; PETTINARI, C. ; MARCHETTI F. Antitumor activity of the mixed phosphine gold species chlorotriphenylphosphine-1,3-bis (diphenylphosphino) propanegold(I).

J Med Chem, 46:1737-42, 2003.

CHISI, J.E.; WDZIECZAK-BAKALA, J. ; THIERRY, J. ; BRISCOE CV, RICHES AC. Captopril Inhibits the Proliferation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Murine Long-Term Bone Marrow Cultures. **Stem Cells**, 17:339-44, 1999.

CLERMONT, F. ; ADAM, E. ; DUMONT, J.E. ; ROBAYE, B. Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha in primary cultured bovine endothelial cells. **Cell Signal**, 15:539-46, 2003.

CLERICI, C; MOCARELLI, P; VILLA, M.L.; NATALE, N. Influence of Ehrlich ascites carcinoma on repopulating ability of mouse bone marrow cells. **J Natl Cancer Inst**, 47:555-60, 1971.

COLELLA, R.; GOODWYN, E.; GOPAL, P. Increased cell density decreases cysteine proteinase inhibitor activity and increases invasive ability of two prostate tumor cell lines. **Cancer Lett**, 185:163-72, 2002.

COMTE, L.; LORGEOT, V.; BIGNON, J.; VOLKOV, L.; DUPUIS, F.; WDZIECZAK-BAKALA, J. et al. In vivo modifications of AcSDKP metabolism and haematopoiesis in mice treated with 5-fluorouracil and Goralatide. **Eur J Clin Invest**, 28:856-63, 1988.

CORBETT, T.H. ; VALERIOTE, F.A. ; BAKER, L.H. Is the P388 murine tumor no longer adequate as a drug discovery model ?. **Invest New Drugs**, 5: 3-20, 1987.

COSTEROUSSÉ, O.; ALLEGRINE, J.; LOPEZ, M.; ALHENEC-GELAS, F. Angiotensin I- converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J**, 15;290 (Pt 1):33-40, 1993.

CVITKOVIC, E. ; SPAULDING, J. ; BETHUNE, V. ; MARTIN, J. ; WHITMORE, WF. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. **Cancer**, 39:1357-61, 1977.

DAI, D.; MOULTON, B.C.; OGLE, T.F. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. **Biol Reprod**, 63:188-95, 2000.

DELMONT, L. ; LIEBELT, R. Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer. **Cancer Res**, 26: 149-59, 1966.

DEXTER, T.M. ; ALLEN, T.D. ; LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells "in vitro". **J. Cell Physiol**, 91: 335-44, 1977.

DEXTER, T.M. Haemopoiesis in long-term bone marrow cultures. **Acta Haematol**, 62:299-305, 1979.

DEXTER, T.M. Stromal cell associated haemopoiesis. **J Cell Physiol Suppl**, 1:87-94, 1982.

- EAVES, C.J.; CASHMAN, J.D.; KAY, R.J.; DOUGHERTY, G.J.; OTSUKA, T.; GABOURY, L.A. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. ii. analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer. **Blood**, 78:110-17, 1991.
- EDELSTEIN, M.; CORBETT, T.; VALERIOTE, F. In vitro screening model for the detection of agents active against myelogenous leukemia. **Cancer Invest**, 16:303-8, 1988.
- EHRlich, P. ; APOLANT, T. Beobachtungen wiber maligne mause tumoren. **Berliner Klunische Wochenschrift**, 28: 871-74, 1905.
- EZAN, E. ; CARDE, P. ; LE KERNEAU, J. ; ARDOUIN, T. ; THOMAS, F. ; ISNARD, F. ; DESCHAMPS DE PAILLETTE, E. ; GROGNET, J.M. Pharmacokinetics in healthy volunteers and patients of NAc-SDKP (seraspénide), a negative regulator of hematopoiesis. **Drug Metab Dispos**, 22:843-48, 1994.
- 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.
- FARID, P.; GOMB, S.Z.; PETER, I.; SZENDE, B. bcl2, p53 and bax in thyroid tumors and their relation to apoptosis. **Neoplasma**, 48:299-301, 2001.
- FECCHIO, D. ; RUSSO, M. ; SIROIER, P. ; BRAQUER, P. ; JANCAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. **Int J Immunopharmacol**, 12:57, 1990.

FIBBE W.E.; van DAMME, J.; BILLIAU, A.; GOSELINK, H.M.; VOOGT, P.J.; van EEDEN, G. Interleukin 1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, 71:430-5, 1988.

FRICKER, S.P. ; BUCKLEY, R.G. Characterization of a human tumour cell line panel for screening of anti-tumour agents "in vitro". **Biochem Soc Trans**, 17:1049-50, 1989.

GALBIATI, F.; POLASTRI, L.; THORENS, B.; DUPRAZ, P.; FIORINA, P. ; CAVALLARO, U. ; CHRISTOFORI, G. ; DAVALLI, A.M. Molecular pathways involved in the antineoplastic effects of calcitriol on insulinoma cells. **Endocrinol**, 144:1832-41, 2003.

GAUDRON, S. ; GRILLON, C. ; THIERRY, J. ; RICHES, A. ; WIERENGA P.K. ; WDZIECZAK-BAKALA, J. "In vitro" Effect of Acetyl-N-Ser-Asp-Lys- Pro (AcSDKP) Analogs Resistant to Angiotensin I-Converting Enzyme on Hematopoietic Stem Cell and Progenitor Cell Proliferation. **Stem Cells**, 17:100-06, 1999.

GIRALDI, T. ; SAVA, G. ; ZORZET, S. ; PERISSIN, L. ; PICCINNI, P. Activity and inhibition by cytotoxic and antimetastatic drugs of cathepsin B-like cysteine proteinase in transplantable leukemias in mice. **Anticancer Res**, 7:343-6, 1987.

GOSWAMI, D. ; SEN S. ; AU, DE. Possible antineoplastic agents, part 15: synthesis, biological activity and quantitative structure activity relationship of substituted-2-(4'-methoxybenzenesulphonamido) glutaric acid analogs against Ehrlich ascites carcinoma. **Pharmazie**, 56:366-71, 2001.

GUERRIERO, A.; WORFORD, L.; HOLLAND, H.K.; GUO, G.R.; SHEEHAN, K.; WALLER, E.K. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood*, 90:3444-55, 1997.

GUEST, I. ; UETRECHT. J. Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low--molecular-weight compounds. *Exp Hematol*, 29:123-37, 2001.

GUIGON, M. ; BONNET, D. ; LEMOINE, F. ; KOBARI. L. ; PARMENTIER. C. ; MARY, J.Y. Najman A. Inhibition of human bone marrow progenitors by the synthetic tetrapeptide AcSDKP. *Exp Hematol*, 18:1112-15, 1990.

HAWKINS, J.C. ; VAUX, L.D. Analysis of the Role of bcl-2 in apoptosis. *Immunol Reviews*, 142: 127-39, 1994.

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.

HAZNEDAROGLU, I.C.; OZTURK, M.A. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *J Biochem Cell Biol*, 35:867-80, 2003.

HERMAN, P.; FERRANT, A.; DE BRUYERE, M.; STRAETMANS, N. Stromal factors support the expansion of the whole hemopoietic spectrum from bone marrow CD34+DR- cells and of some hemopoietic subsets from CD34+ and CD34+DR+ cells. *Leukemia*, 12:735-45, 1998.

HERZIG, M.C. ; LIANG, H. ; JOHNSON, A.E. ; WOYNAROWSKA, B. ; WOYNAROWSKI, J.M. Irofulven induces apoptosis in breast cancer cells regardless of caspase-3 status. **Breast Cancer Res Treat**, 71:133-43, 2002.

HIGBY, D.J. ; WALLACE, H.G. ; HOLLAND, J.F. Cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): a phase I study. **Cancer Chemother Rep**, 57: 459-63, 1973.

HOCKENBERRY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKLEY, W.; NAHM, M. ; KORSMEYER, S.J. *Bcl-2* protein is topographically restricted in tissues characterised by apoptotic cell death. **Proc Nat Acad Sci USA**, 88: 6961-5, 1991.

HORIKOSHI T, DANENBERG KD, STADLBAUER TH, VOLKENANDT M, SHEA LC, AIGNER K, GUSTAVSSON B, LEICHMAN L, FROSING R , RAY M. Quantitation of thymidylate synthase, dyhydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. **Cancer Res**, 52: 108, 1992.

HUANG, W.; YAO, X. The expression of the apoptosis-suppressive gene *bcl-2* in the tissue of colon carcinoma. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 22(3):218-20, 2002.

JUNOT, C.; THEODORO, F.; THIERRY, J.; CLEMENT, G.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; EZAN, E. Development of an enzyme immunoassay for a stable amidated analog of the hemoregulatory peptide acetyl-ser-asp-lys-pro. **J Immunoassay Immunochem**, 22:15-31, 2001.

JUNOT, C.; NICOLET, L.; EZAN, E.; GONZALES, M.F.; MENARD, J.; AZIZ, M. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma,

- urine, and tissue concentrations of hemoregulatory peptide acetyl-ser-asp-lys-pro in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 291:982-87, 1999.
- JUSTO, G.Z. ; DURÁN, N. ; QUEIROZ, M.L.S. Myelopoietic response in tumor-bearing mice by aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur J Pharmacol**, 388: 219-26, 2000.
- JUSTO, G.Z. ; SILVA, M.R. ; QUEIROZ, M.L.S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 23:119-32, 2001.
- KEEB, G. ; LALA, P.K. Effect of Ehrlich ascites tumor transplantation in mice on the distribution of cells capable of forming hemopoietic colonies "in vitro". **Eur J Cancer**, 14: 331-42, 1978.
- KIM, P.K. ; MAHIDHARA, R. ; SEOL, D.W. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. **Drug Resist Updat**, 4(5):293-6, 2001.
- KITA, E. ; NISHIKAWA, F. ; YAGYU, Y. ; HAMURO, A. ; OKU, D. ; EMOTO, M. et al. Nonspecific stimulation of host defense by *Corynebacterium kutscheri* I. Antitumor effect. **Nat Immunol Cell Growth Regul**, 8: 313-24, 1989.
- KOJI, T. ; HISHIKAWA, Y. Germ cell apoptosis and its molecular trigger in mouse testes. **Arch Histol Cytol**, 66:1-16, 2003.
- KOO, M.S; KWO, Y.G. ; PARK, J.H. ; CHOI, W.J. ; BILLIAR, T.R. ; KIM, Y.M. Signaling and function of caspase and c-jun N-terminal kinase in cisplatin-induced apoptosis. **Mol Cells**, 30;13(2):194-201, 2002.

- KOPF, H. ; KOPF-MAIER, P. Titanocene dichloride. The first metallocene with cancerostatic activity. **Angew Chem Int Ed Engl**, 18: 477-78, 1979.
- KOPF-MAIER, P. Tumor inhibition by titanocene dichloride: first clue to the mechanism of action. **Naturwissenschaften**, 67: 415-16, 1980;
- KOPF-MAIER, P; WAGNER, W e KOPF, H. "In vitro" growth inhibition by metallocene dichlorides. **Cancer Chem Pharmacol**, 5: 237-41, 1981.
- KOPF-MAIER, P. ; WAGNER, W. ; LISS, E. Cytokinetic behaviour of Ehrlich Ascitic Tumor after in vivo treatment with Cis-diamminedichloroplatinum II and metallocene dichlorides. **J Cancer Res Clin Oncol**, 201: 21-30, 1981.
- KOPF-MAIER, P.; WAGNER, W.; LISS, E. Induction of cell arrest at G1/S and G2 after treatment of Ehrlich Ascites tumor cells with metallocene dichloride and Cisplatinum "In vitro". **J Cancer Res Clin Oncol**, 106: 44-52, 1983.
- KOPF-MAIER, P; PREISS, F MARX, T; KLAPOTKE, T; KOPF, H. Tumor inhibition by titanocene complexes: activity against Sarcoma 180. **Anticancer Res**, 6: 33-37, 1986.
- KOPF-MAIER, P. Intracellular localization of titanium within xenografted sensitive human tumors after treatment with the antitumor agent titanocene dichloride. **J Struct Biol**, 105: 35-45, 1990.
- KOPF-MAIER, P; MUHLHAUSEN, S.K. Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin "In vitro". **Chem Biol Interact**, 82: 295-316, 1992.

KOPF-MAIER, P; TORNIEPORTH-OETTING IC. Antitumor activity of titanocene amino acid complexes. **Biometals**, 9: 267-71, 1996.

KOPF-MAIER, P. Antitumor activity of titanocene dichloride in xenografted human renal-cell carcinoma. **Anticancer Res**, 19: 493-504, 1999.

KORSMEYER, S. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood**, 80: 879-86, 1992.

KOVALA-DEMERTZI, D. ; DOMOPOLOU, A. ; DEMERTZIZ, M.A. ; VALLE, G. ; PAPAGEORGIOU, A. Palladium (II) complexes of 2-acetylpyridine N(4)-methyl, N(4)-ethyl and N(4)-phenylthiosemicarbazones. Crystal structure of chloro (2-acetylpyridineN(4)-methylthiosemicarbazona) palladium(II). Synthesis, spectral studies, in vitro and in vivo antitumor activity. **J Inorg Biochem**, 68: 147-55, 1997.

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, 1988, p. 355.

KROEMER, G. The proto-oncogene *Bcl-2* and its role in regulating apoptosis. **New England J of Med**, 6: 614-20, 1997;

KUSMARTSEV, S. ; RUIZ DE MORALES, J.M. ; RULLAS, J. ; DANILETS, M.G. ; SUBIZA, J.L. Sialoadhesin expression by bone marrow macrophages derived from Ehrlich-tumor-bearing mice. **Cancer Immunol Immunother**, 48: 493-8, 1999.

LAUFS, S.; BUSS, E.C.; ZELLER, W.J.; FRUEHAUF, S. Transfer of drug resistance genes in hematopoietic progenitors for chemoprotection: is it still an option? **Drug Resist Updat**, 6:57-69, 2003.

LAVAU, C.; DEJEAN, A. The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia**, 8:1615-21, 1994.

LEH, F.K. ; WOLF, W. Platinum complexes: a new class of agents. **J Pharmacol Science**, 65: 315-28, 1976.

LEONI, L.M. ; HAMEL, E. ; GENINI, D. ; SHIH, H. ; CARRERA, C.J. ; COTTAM, H.B. ; CARSON, D.A. Indonacine, a microtubule-binding indanone and a selective inducer of apoptosis in multidrug-resistant cancer cells. **J Natl Cancer Inst**, 92: 217-24, 2000.

LUO, J. C.; YAMAGUCHI, S.; SHINKAI, A.; SHITARA, K; SHIBUYA, M. Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. **Cancer Res**, 58: 2652-60, 1998.

MARTIN, S.J.; BRADLEY, J.G. ; COTTER, T.G. HL60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. **Clin Exp Immunol**, 79: 448-53, 1990.

MARTINEZ-ARRIBAS, F.; NUNEZ-VILLAR, M.J.; LUCAS, A.R.; SANCHEZ, J.; TEJERINA, A.; SCHNEIDER, J. Immunofluorometric study of Bcl-2 and Bax expression in clinical fresh tumor samples from breast cancer patients. **Anticancer Res**, 23:565-8, 2003.

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.

MASSÉ, A. ; RAMIREZ, L.H. ; BINDOULA, G. ; GRILLON, C. ;
WDZIECZAK-BAKALA, J. ; RADDASSI, K. et al. The tetrapeptide
Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (Goralatide) protects from doxorubicin-
induced toxicity: Improvement in mice survival and protection of bone
marrow stem cells and progenitors. **Blood**, 91: 441-49, 1998.

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: 105-09, 1994.

METCALF, D. The bioassay of colony stimulating factors. In: The
hemopoietic colony stimulating factors. **Elsevier. Amsterdam**, 187-212,
1984.

MICHAUD, A. ; WILLIAMS, T.A. ; CHAUVET M.T. ; CORVOL, P.
Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition:
Captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-Acetyl-Seryl-
Aspartyl- Lysyl-Proline hydrolysis compared with that of angiotensin I.
Mol Pharm, 51: 1070-76, 1997.

MICHAUD, A.; CHAUVET, M.T.; CORVOL, P. N-domain selectivity of
angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies
of its highly selective substrate, N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline.
Biochem Pharmacol, 57:611-8, 1999.

MIGNATTI, P. ; RIFKIN D.B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. **Enzyme Protein**; 49:117-37, 1996.

MIRANDOLA, L.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L. Modulation by *acanthospermum australe* extracts of the tumor induced hematopoietic changes in mice. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 24:275-88, 2002.

MOFFATT, J.; HASHIMOTO, M.; KOJIMA, A.; KENNEDY, D.O.; MURAKAMI, A.; KOSHIMIZU, K. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, 21:2151-57, 2000.

MRUG, M.; STOPKA, T.; JULIAN, B.A.; PRCHAL, J.F.; PRCHAL, J.T. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. **J Clin Invest**, 100:2310-14, 1997.

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-benzoylbenzylidenamine. Comparison of the activity of these compounds with other isostructural cyclopalladated compounds. **J Med Chem**, 36: 3795-801, 1993.

NAKAGINA, M. ; IRIMURA, T. ; DI FERRANTE, D. ; DI FERRANTE, N. ; NICOLSON, G.L. Heparan sulfate degradation: relation to tumor invasive and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. **Science**. 6: 611-13, 1983.

- NELSON, J.A.; PARHAR, R.S.; SCODRAS J.M.; LALA P.K. Down-regulation of macrophage i-a expression in tumor-bearing mice. **J Leukocyte Biol**, 48:394-402, 1990.
- OSORIO, R.M. ; HEFTI, A. ; VERTUCCI F.J. ; SHAWLEY AL. Cytotoxicity of endodontic materials. **J Endod**, 24:91-6, 1998.
- PARKER, J.E. ; MUFTI, G.J. ; RASOOL, F. ; MIJOVIC, A. ; DEVEREUX, S; PAGLIUCA, A. The role apoptosis, proliferation, and Bcl-2-related proteins in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. **Blood**, 96: 3932-38, 2000.
- PESSINA, A. ; BRAMBILLA, P. ; VILLA, S. ; MOCARELLI, P. CFU-S and CFU-C proliferation after treatment of normal bone marrow cells with Ehrlich ascitic fluid. **Oncology**, 39: 391-95, 1982.
- PESSINA, A. ; BRAMBILLA, P. ; VILLA, S. ; MAROCCHI, A. ; MOCARELLI, P. Factors produced by macrophages and tumour cells: Influence on the granulocytic precursor cells (CFU-C) in normal and tumour bearing mice. **J Cancer Res Clin Oncol**, 102: 235-44, 1982.
- 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 osteoblasts. **Cancer Res**, 15: 986-89, 2002.
- 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.

QIAN. F.; CHAN. S.J.; GONG. Q.M.; BAJKOWSKI, A.S.; STEINER, D.F.; FRANKFATER, A. The expression of cathepsin B and other lysosomal proteinases in normal tissues and in tumors. **Biomed Biochim Acta**, 50:531-40, 1991.

QUATTRONE, A. ; PAOUCCI, L. ; SANTINI, V. ; SCHIAVONE, N. ; NOFERINI, D. ; CALASTRETTI, A. ; COPRENI, E. ; MORELLI, S. ; FERRINI, P.L.R. ; NICOLIN, A. ; CAPACCIOLI, S. Quantification of bcl-2 oncogene in cultured lymphoma/leukemia cell lines and in primary leukemia B-cells by a highly sensitive RT-PCR method. **Haematol**, **80**: 4954, 1995.

QUEIROZ, M.L. ; JUSTO, G.Z. ; VALADARES, M.C. Adjuvant effect of *Pluchea quitoc* extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 23:215-28, 2001

QUEIROZ M.L.; JUSTO G.Z.; VALADARES, M.C. PEREIRA-DA-SILVA, F.R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 23:367-82, 2001.

RODGERS, K.E. ; XIONG, S. ; STEER, R. ; DIZEREGA, G.S. Effect of Angiotensin II on Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation. **Stem Cells**, 18:287-94, 2000.

ROSENBERG, B; VANCAMP, L; TROSCO, JE; MANSOUR, VH.
Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. **Nature**, 222: 385-86, 1969.

ROSENBERG, B. ; VAN CAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compound. **Cancer Res**, 30: 1799-802, 1970.

ROSENBERG, B. Platinum Co-ordination complexes in cancer chemotherapy. **Naturwissenschaften**, 60: 339-406, 1973.

ROUSSEAU-PLASSE, A.; WDZIECZAK-BAKALA, J., LENFANT, M.; EZAN, E.; GENET, R.; ROBINSON, S. et al. Lisinopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, prevents entry of murine hematopoietic stem cells into the cell cycle after irradiation in vivo. **Exp Hematol**, 26:1074-9, 1998.

RUIZ DE MORALES, J.; VELEZ, D.; SUBIZA, J.L. Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells. **Exp Hematol**, 27: 1757-67, 1999.

RUSZALA-MALLON, V. ; SILVA J. ; LUMANGLAS A.L. Depression of cell-mediated immunity in plasmacytoma-bearing mice. **Immunol Cell Biol**, 69:11-16, 1991.

SCHEY, S.A.; CAVENAGH, J.; JOHNSON, R.; CHILD, J.A.; OAKERVEE, H.; JONES, R.W. An UK myeloma forum phase II study of thalidomide; long term follow-up and recommendations for treatment. **Leuk Res**, 27:909-14, 2003.

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.

SEGURA, J.A. ; BARBERO, L.G. ; MARQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett**, 414: 1-6, 1997.

SEGURA, J.A. ; BARBERO, L.G. ; MARQUEZ, J. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell on populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunol Lett**, 111: 1-6, 1997.

SHULTZ, M.D. ; LASSIG, J.P. ; GOOCH, M.G. ; EVANS, B.R. ; WOODWARD, J. Palladium a new inhibitor of cellulase activities. **Biochem Biophys Res Commun**, 209: 1046-52, 1995.

SMITH, T.C. ; LEVINSON, C. Ehrlich ascitic tumor cell surface labeling and kinetics of glycocalyx release. **J. Supramol Struct**, 12: 115-125, 1979.

SPOONCER, E. ; ELIASON, J. ; DEXTER, M. Long term mouse bone marrow cultures in: *A practical approach*. Edited by NG Testa and G. Molineux, Oxford University Press, New York, p.56-73, 1993.

SQUIER, M.K.; SEHNERT, A.J.; COHEN, J.J. Apoptosis in leukocytes. **J Leukoc Biol**, 57:2-10, 1995, Review.

STADECKER, M.J. ; WRIGHT, J.A. Distribution and kinetics of mononuclear phagocytes in granulomas elicited by eggs of *Schistosoma mansoni*. **Am J Pathol**, 116: 245, 1984.

TAKAHASHI, 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.

TALIERI, M.; DIAMANDIS, E.P.; KATSAROS, N.; GOURGIOTIS, D.; SCORILAS, A. Expression of BCL2L12, a new member of apoptosis-related genes, in breast tumors. **Thromb Haemost**, 89:1081-8, 2003.

TAYLOR, C.G. ; SARGENT, J.M. ; ELGIE, A.W. ; WILLIAMSON, C.J. ; LEWANDOWICZ, G.M. ; CHAPPATTE, O. ; HILL, J.G. Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, 22:278-82, 2001.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, 281:1312-6, 1998.

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.

VALADARES, M.C.; KLEIN, S.I.; QUEIROZ, M.L.S. "Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing in Ehrlich Ascite Tumor and treated with dyclopentadienildichloratitanium IV". **Inter. J Immunopharmacol**, 20: 573-81, 1998.

VALADARES, M.C.; QUEIROZ, M.L.S. The effect of a Titanocene Dichloride derivative, Ti IV (C₅H₅)(2) NCS(2), on the haematopoietic response of Ehrlich tumour-bearing mice. **Eur J Pharmacol**, 439: 35-42, 2002.

VIÑUELA, J. E.; RODRÍGUEZ, R.; GIL, J.; DE LA CONCHA, E. G.; SUBIZA, J. L. Antigen shedding vs. Development of natural supressor cells as mechanism of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor. **Int J Cancer**, 47: 86-91, 1991.

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, 1974, p. 167.

WANG, X. ; LIU, J. ; LI, J. ; YANG, Y. ; LIU, J. ; LI, B. ; POPE M.T. Synthesis and antitumor activity of cyclopentadienyltitanium substituted polyoxotungstate [CoW₁₁O₃₉(CpTi)]⁷⁻ (Cp= η^5 -C₅H₅). **J Inorg Biochem**, 94:279-84, 2003.

WILTSHAW, E and CARR, B. Recent Results in Cancer Research. In: CONNORS, T.A. ; ROBERTS, J.J. **Platinum Co-ordination Complexes in Cancer Chemotherapy**. New York: Ed. Springer-Verlag, 1974, p. 167.

WHITNEY, R.B. ; KELLY, B.S. ; LEVY, J.G. Immunosuppression in mice bearing primary tumours. **Eur J Cancer**, 14: 699-705, 1978.

YOUNG, M.R.; HOOVER, C.S. Inhibition of spleen cell cytotoxic capacity toward tumor by elevated prostaglandin E₂ levels in mice bearing Lewis lung carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, 77: 425-29, 1986.

ZHOU, J. ; CHEN, Y. ; LI, C. ; LIU, W. The protein expression of Bcl-2, Bax, Fas/Apo-1 in acute myeloid leukemia. **J Tongji Med Univ**, 18: 42, 1998.

9. APÊNDICE

Tabela 2: Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos Swiss inoculados com o TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2 . Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média por Placa	(%)
Controle	105	103	104	99	104	107	106	102	101	103,4 $\pm$ 1,54	100
TAE	50	52	51	49	48	53	47	53	50	50,3 $\pm$ 1,033	49
TAE + Paladaciclo	52	55	56	57	48	51	49	52	53	52,5 $\pm$ 1,61	51
Paladaciclo	102	104	100	102	101	103	101	98	100	101,2 $\pm$ 0,87	98

Tabela 3: Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos do baço de camundongos Swiss inoculados com o TAE e tratados com 1,18 μ M do Paladaciclo ferroceno 1:2 . Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Média	(%)
Controle	2	3	4	2	2	2	4	1	1	$2,3 \pm 0,324$	100
TAE	31	33	30	26	29	31	28	27	34	$29,8 \pm 0,803$	49
TAE + Paladaciclo	28	24	29	26	28	27	29	27	25	$27 \pm 0,222$	51
Paladaciclo	2	3	2	3	2	3	4	4	3	$2,8 \pm 0,506$	98

Tabela 4: Efeitos do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos para granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos Swiss normais incubadas com diferentes concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 no momento de realização das culturas. Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.

Placas	1	2	2	4	Média	(%)	P
Controle	130	129	129	123	127,7 $\pm$ 3,20	100	
1,18 μ M	122	130	118	119	122,2 $\pm$ 5,43	95,7	P > 0,005
2,36 μ M	105	109	101	109	106 $\pm$ 3,83	83	P < 0,001
3,55 μ M	85	84	92	89	87,5 $\pm$ 3,69	68,5	P < 0,001
4,73 μ M	71	72	88	80	77,7 $\pm$ 7,93	60,8	P < 0,001
5,92 μ M	49	53	70	67	59,7 $\pm$ 10,30	46,7	P < 0,001
7,10 μ M	55	56	57	58	56,5 $\pm$ 1,29	44,2	P < 0,001
8,2 μ M	6	5	7	5	5,75 $\pm$ 0,957	4,5	P < 0,001
14,8 μ M	3	2	2	3	2,5 $\pm$ 0,577	1,95	P < 0,001

Tabela 5: Variação do peso do baço de camundongos Swiss inoculados com células do TAE e tratados com várias concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2.

Animais	1	2	3	Média	P
Controle	0,381	0,360	0,352	0,364 $\pm$ 0,014	
TAE	0,430	0,427	0,418	0,425 $\pm$ 0,0062	P < 0,01
Paladaciclo	0,395	0,380	0,361	0,383 $\pm$ 0,017	P > 0,05
TAE + Paladaciclo	0,441	0,407	0,412	0,420 $\pm$ 0,018	P < 0,01

Tabela 6: Efeitos de várias concentrações do Paladaciclo ferroceno 1:2 sobre a viabilidade celular da linhagem leucêmica HL60. Análise realizada pelo método de exclusão do azul de trypan.

Amostra	1	2	3	4	Média	(%)
Controle	48	43	50	57	$49,5 \pm 5,80$	100
1,18 μ M	35	33	40	34	$35,5 \pm 2,98$	72
2,36 μ M	34	34	22	18	$27 \pm 8,24$	54
3,55 μ M	19	12	15	14	$15 \pm 2,94$	30
4,73 μ M	06	05	12	14	$9,25 \pm 4,42$	19
5,9 μ M	01	00	01	02	$01 \pm 0,816$	02
14,8 μ M	01	02	01	00	$01 \pm 0,816$	02
29,6 μ M	00	00	00	00	00 ± 00	00

Tabela 7: Número de células viáveis, não-viáveis e de CFU-GM obtido do sobrenadante das culturas líquidas de longa duração da medula óssea de animais Swiss normais. As culturas foram repopuladas após a terceira semana de incubação. Resultados expressos em quantidade total de células e colônias obtidas por cultura realizada em dois experimentos independentes.

Cultura Líquida de Longa Duração - Controle				
Semanas	Número de células viáveis ($\times 10^5$)	Número de células não-viáveis ($\times 10^5$)	Média (CFU-C)	CFU total/cultura
1 ^a	31 $\pm$ 0,5	02 $\pm$ 0		
2 ^a	25 $\pm$ 0,9	03 $\pm$ 0		
3 ^a	23 $\pm$ 0,4	02 $\pm$ 0		
4 ^a	21 $\pm$ 1,1	01 $\pm$ 0		
5 ^a	34 $\pm$ 1,3	02 $\pm$ 0		
6 ^a	22 $\pm$ 0,3	03 $\pm$ 0	60,3 $\pm$ 2,082	1020
7 ^a	11 $\pm$ 0,9	02 $\pm$ 0	72,3 $\pm$ 3,055	792
8 ^a	06 $\pm$ 1,2	01 $\pm$ 0	46,3 $\pm$ 3,055	253
9 ^a	08 $\pm$ 0,5	01 $\pm$ 0	44,6 $\pm$ 6,145	135
			43,6 $\pm$ 4,51	110

Tabela 8: Número de células viáveis, não-viáveis e o número de CFU-GM obtido do sobrenadante da cultura líquida de longa duração tratada com, 1,18 μ M (concentração final) do Paladaciclo ferroceno 1:2 após a 5^a semana. As culturas foram repopuladas na 4^a semana de incubação.

Cultura Líquida de Longa Duração com 1,18 μM Paladaciclo ferroceno 1:2				
Semanas	Número de células viáveis (x 10 ⁵)	Número de células-não viáveis (10 ⁵)	Média (CFU-C)	CFU total/cultura
1 ^a	10 $\pm$ 0,9	04 $\pm$ 0		
2 ^a	11 $\pm$ 0,7	02 $\pm$ 0		
3 ^a	13 $\pm$ 1,1	01 $\pm$ 0		
4 ^a	12 $\pm$ 0,8	03 $\pm$ 0		
5 ^a	23 $\pm$ 1,2	02 $\pm$ 0		
6 ^a	15 $\pm$ 0,8	03 $\pm$ 0	47,3 $\pm$ 4,509	540
7 ^a	06 $\pm$ 0,4	04 $\pm$ 0	50,6 $\pm$ 2,082	385
8 ^a	04 $\pm$ 0,1	02 $\pm$ 0	66,6 $\pm$ 4,163	202
9 ^a	00	01 $\pm$ 0	12 $\pm$ 2,000	24
			0	0

Tabela 9: Citotoxicidade do Paladaciclo ferroceno 1:2 em células da linhagem HL60 após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Avaliação realizada pelo método de redução do MTT a cristais de formazan em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Leitura realizada através de ELISA em 570nm. Resultados expressos em percentagem em relação ao controle.

MTT - Linhagem HL60 na presença do Paladaciclo ferroceno 1:2	
Concentração (μM)	(%) Sobrevida celular
0	100 ± 1,02
0,5	96,4 ± 2,03
1,1	85,2 ± 1,45
2,3	77,7 ± 4,51
3,5	61,6 ± 1,47
4,7	52,6 ± 2,25
5,9	48,3 ± 3,24
11,8	25 ± 2,53
17,7	23,8 ± 2,05

Resumo das atividades realizadas no período do Mestrado.

Artigos resumidos publicados em anais de eventos

OLIVEIRA, CR; BINCOLETTTO, C; CAIRES ACF. Regulatory effects of cyclopalladated compounds on the bone marrow stromal cells. **V Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica Imunologia e XXVII Congresso Brasileiro de Imunologia. 2002.**

OLIVEIRA, CR; BINCOLETTTO, C; JANUÁRIO, J; CRUZ, RF; CAIRES ACF. Avaliação da mielotoxicidade de uma nova classe de complexos organometálicos - PALADOCICLOS. **XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2002.**

OLIVEIRA, CR; CAIRES ACF; BINCOLETTTO, C; Avaliação da citotoxicidade de complexos organometálicos contendo paládio como metal de transição – PALADOCICLOS. **XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2002.**

SOUZA, N.J. A; OLIVEIRA, C.R; JUSTO, G.Z; BINCOLETTTO, C. Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Utilizados no Selamento de Perfurações. **I Congresso de Odontologia da Universidade de Mogi das Cruzes. XXV Jornada Odontológica da Universidade de Mogi das Cruzes. 2002.** Premiação com primeiro lugar na categoria painéis profissionais.

Artigo resumido publicado em revista especializada.

BINCOLETTO, C.; OLIVEIRA, C.; SMITH, M.; HERMELY, J.; JULIANO, M.; CAIRES, A. Cyclopalladated complex inhibits the ACE activity in vitro and progenitor cells proliferation in murine bone marrow cultures. **Exp Hematol**, 31: 201, 2003.