

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARISTELLA CONTE ANAZETTI

“MICRO/NANOESEFERAS DE POLI (L-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E COMPLEXOS DE β -CICLODEXTRINAS CONTENDO DESIDROCROTONINA COMO UMA POSSÍVEL ALTERNATIVA NA TERAPIA CONTRA LEUCEMIAS”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) MARISTELA CONTE ANAZETTI e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.


Orientadora: Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

An18m	<p>Anazetti, Maristella Conte Micro/nanoesferas de poli (l-láctico-co-glicólico) e complexos de beta-ciclodextrinas contendo desidrocrotonina como uma possível alternativa na terapia contra leucemias / Maristella Conte Anazetti. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Patricia da Silva Melo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Apoptose. 2. Ciclodextrinas. 3. Citotoxicidade. 4. Desidrocrotonina. 5. Leucemia. I. Melo, Patricia da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Micro/nanospheres of poly (lactic-co-glycolic) and beta-cyclodextrins complexes containing dehydrocrotonin as a possible leukaemia therapy.

Palavras-chave em inglês: Apoptosis; Cyclodextrins; Cytotoxicity; Dehydrocrotonin; Leukaemia.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Patricia da Silva Melo, Cláudio Chrysostomo Werneck, Eliana Pereira de Araújo, Mariângela Martins Burgos de Azevedo, Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues.

Data da defesa: 30/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 30 de janeiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra . Patrícia da Silva Melo (Orientadora)


Assinatura

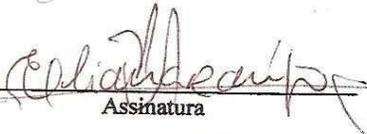
Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

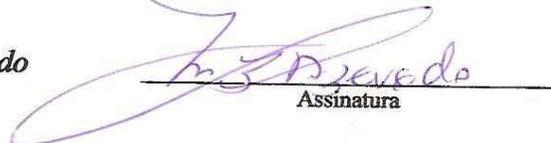
Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araújo


Assinatura

Profa. Dra. Mariângela Burgos Martins de Azevedo


Assinatura

Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni

Assinatura

Profa. Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

Profa. Dra. Ana Olívia de Souza

Assinatura



Coordenadoria de Pós-Graduação
Cx. Postal 6109- CEP 13.083-970 - Campinas/SP
Fax (019) 3521-6374 - Fone: (019) 3521-6378

CONSULTA AOS MEMBROS DA BANCA DE DEFESA

Aluno (a): **MARISTELLA CONTE ANAZETTI**

Data de Defesa: 30/01/2008

Os membros da banca desejam receber cópia da tese corrigida?
Em caso afirmativo, escolha **APENAS** uma das opções (CD ou impresso).

PROFA. DRA. PATRÍCIA DA SILVA MELO (Orientadora)

sim CD impresso
 não

PROF. DR. CLÁUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK

sim CD impresso
 não

PROFA. DRA. MARIÂNGELA DE BURGOS MARTINS DE AZEVEDO

sim CD impresso
 não

PROFA. DRA. ELIANA PEREIRA DE ARAÚJO

sim CD impresso
 não

PROF. DR. GUSTAVO ORLANDO BONILLA RODRIGUEZ

sim CD impresso
 não

Assinatura do(a) Orientador(a) _____

Dedico este trabalho,

À minha filha, Eduarda, razão da minha vida, pelo amor, respeito e admiração que demonstra constantemente, assim como por tantos momentos de felicidades, que só um anjo, tão especial, poderia proporcionar.

Ao meu querido, amado e saudoso pai, Marcelo (*in memoriam*), referência permanente em minha vida, meu herói, meu amigo, meu companheiro inseparável, que estará sempre vivo em meu coração e memória.

AGRADECIMENTOS

- A Dra. Patrícia da Silva Melo, a quem devo muito, não só pela orientação efetiva e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho e revisão da tese, mas principalmente pela amizade, conselhos, força nos diversos momentos difíceis enfrentados durante estes anos, e pelos bons momentos compartilhados.
- A Profa. Dra. Marcela Haun, pela orientação, disponibilidade, confiança, paciência, motivação e amizade.
- Aos membros da banca prévia, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, Prof. Dr. Wilson Nadruz Jr. e Prof. Dr. Armino Antônio Alves, pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para melhoria deste trabalho.
- Ao João Batista Fabrin Neto, pela amizade e disponibilidade de ajuda durante todo o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.
- Aos alunos de iniciação científica do laboratório de Cultura de Células, Iasmin, Flavinha, Paula e em especial, ao Lucas Frungillo, pela amizade e auxílio constante durante todo o período do doutorado.
- A todos os professores, funcionários e colegas do departamento de Bioquímica.
- À FAPESP, pelo apoio financeiro.
- A Profa. Dra. Mariângela M. Burgos De Azevedo, pela colaboração, disponibilidade e atenção na obtenção dos complexos de inclusão em ciclodextrinas.
- A Profa. Dra. Maria Inês Ré e seus alunos, pela colaboração na caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas.
- A Fernanda, técnica responsável pelo Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP, onde realizamos as análises de citometria de fluxo, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos.

- A Adriane, bióloga responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB, UNICAMP, pela atenção.
- Aos amigos que conquistei neste período de ótimos e outros não tão bons momentos. Muito grata por ter conhecido todos.
- A minha princesinha, Eduarda, um anjo enviado por Deus, com certeza sob influência de meu saudoso pai, o que me ensinou, dentre outras coisas, a identificar o verdadeiro valor da vida.
- Ao meu amado pai, Marcelo, que mesmo distante fisicamente, sempre esteve vivo em meus pensamentos e em meu coração.
- À minha mãe, Nanci, minhas irmãs, Márcia e Marcella, pelo amor e carinho que sinto e sempre sentirei por vocês.

ÍNDICE

RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I - INTRODUÇÃO.....	1
I. 1. Desidrocrotonina.....	2
I. 2. Sistemas de Liberação Controlada.....	5
I.2.1. Nanopartículas de PLGA.....	5
I.2.2. Complexos de Ciclodextrinas (CDs).....	8
I.3. Células da Leucemia Humana.....	11
I.4. Morte Celular por Apoptose.....	14
I.4.1. Apoptose & câncer.....	14
I.4.2. Bioquímica da Apoptose.....	15
I.4.2.1. Mitocôndria, Cálcio e Apoptose.....	19
I.4.2.2. Apoptose & Estresse Oxidativo.....	23
II - OBJETIVOS.....	28
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
III.1.1. Preparação das micro/nanopartículas de PLGA contendo desidrocrotonina.....	32
III.1.2. Preparação das micro/nanopartículas de PLGA-AE contendo DHC.....	34
III.2. Caracterização das partículas contendo desidrocrotonina (DHC).....	34
III.2.1. Eficiência de encapsulação da DHC em nanoesferas de PLGA.....	34
III.2.2. Detecção do ascorbil-éster(AE).....	35
III.2.3. Identificação Físico-Química das partículas.....	35
III.2.3.1. Distribuição do tamanho e diâmetro médio das partículas.....	35
III.2.3.2. Potencial Zeta.....	35
III.2.3.3. Morfologia da superfície das partículas.....	36
III.3. Preparação dos complexos de inclusão β CD, Metil- β CD e Hidroxi-propil- β CD contendo DHC ...	36
III.4. Cultura de Células.....	37
III.4.1. Cultura de células da leucemia humana (HL60, K562, K562 Lucena e U937).....	37
III.4.2. Cultura primária de linfócitos humanos.....	37
III.5. Citotoxicidade da DHC e de suas formulações em células leucêmicas (HL60, K562, K562 Lucena e U937) e em linfócitos humanos.....	38
III.5.1. Redução do MTT.....	39
III.5.2. Atividade Fosfatásica.....	40
III.6. Atividade antitumoral da DHC e de seus complexos de inclusão em β -CDs.....	40
III.6.1. Indução de diferenciação em células da leucemia.....	41
III.6.1.1. Atividade de redução do NBT.....	41
III.6.1.2. Marcadores de diferenciação celular: monócitos (CD14) e granulócitos (CD66b).....	41

III.6.2. Indução de morte celular por apoptose em células da leucemia.....	42
III.6.2.1. Marcação com anexina V-FITC/PI.....	42
III.6.2.2. Conteúdo de DNA e Análise do Ciclo Celular.....	42
III.6.2.3. Detecção de p21/WAF-1.....	43
III.6.2.4. Atividade de Caspases-2, -3, -6, -8 e -9.....	44
III.6.2.5. Liberação de citocromo c.....	45
III.6.2.6. Determinação de Bcl-2.....	45
III.6.2.7. Medida de Cálcio (Ca^{2+}) intracelular.....	46
III.6.2.8. “Swelling” mitocondrial.....	47
III.6.2.9. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	47
III.6.2.10. Determinação de GSH total.....	48
III.7. Análise estatística.....	49
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
IV.1. Caracterização das partículas de PLGA contendo desidrocrotina (DHC).....	51
IV.2. Citotoxicidade.....	63
IV.2.1. Citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA e DHC/PLGA-AE em células HL60.....	63
IV.2.2. Citotoxicidade da DHC e de seus complexos de inclusão em β CDs em das células da leucemia (HL60, U937, K562, K562 Lucena).....	65
IV.2.2.1. Citotoxicidade da DHC livre e de seus complexos de inclusão em β CDs na presença de antioxidantes ou depletor de GSH em células leucêmicas (HL60, U937, K562 e K562 Lucena).....	71
IV.2.1. Citotoxicidade da DHC em sua forma livre e seus complexos de inclusão em β CDs em linfócitos humanos.....	79
IV.3. Atividade antitumoral da DHC e de seus complexos em β CDs.....	80
IV.3.1. Indução de Diferenciação Celular.....	80
IV.3.1.1. Atividade de Redução do NBT.....	80
IV.3.1.2. Marcadores celulares específicos para monócitos (CD14) e granulócitos (CD66b).....	83
IV.3.2. Indução de morte celular por apoptose.....	90
IV.3.2.1. Marcação com anexina V-FITC/PI.....	90
IV.3.2.2. Conteúdo de DNA e análise do ciclo celular.....	93
IV.3.2.3. Detecção de p21/WAF-1.....	99
IV.3.2.4. Ativação de Caspases em células HL60.....	104
IV.3.2.5. Liberação de citocromo c.....	108
IV.3.2.6. Detecção de Bcl-2.....	113
IV.3.2.7. Medida de Cálcio (Ca^{2+}) intracelular.....	119
IV.3.2.8. “Swelling” Mitocondrial.....	123
IV.3.2.9. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	125
IV.3.2.10. Determinação de GSH Total.....	129

V – CONCLUSÕES	135
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
VII - ANEXO	164
VII.1. ATIVIDADES ACADÊMICAS	164
<u>Participações em Congressos</u>	164
<u>Comunicações em Congressos</u>	165
<u>Cursos Ministrados</u>	169
<u>Premiações</u>	169
<u>Publicações</u>	170
<u>Patentes</u>	171

ABREVIATURAS

- Apaf-1 – Fator de ativação de apoptose 1
- APL - Leucemia promielocítica aguda
- CAT – Catalase
- CDA – 2-Clorodesoxiadenosina
- CDK – Quinases dependentes de ciclinas
- CDs - Ciclodextrinas
- ConA – Concanavalina A
- CPPT – Complexos de poros de transição de permeabilidade mitocondrial
- CsA – Ciclosporina A
- DHC – Desidrocrotonina
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
- EDTA - Ácido tetracético etilenodiamina dissódio
- EROS - Espécies reativas de oxigênio
- GSH - Glutathiona reduzida
- HL60 – Linhagem de células da leucemia promielocítica humana
- HPBCD - 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrinas
- JC-1 – Iodeto 5,5',6,6' – tetracloro – 1,1',3,3' - tetraetilbenzimidazolcarbocianina
- K562 – Linhagem de células da leucemia eritrocítica humana
- K562 Lucena - Linhagem de células da leucemia eritrocítica humana resistente
- LMA – Leucemia mielóide aguda
- LMC – Leucemia mielóide crônica
- LPA – Leucemia promielocítica aguda
- MDR – Resistência a múltiplas drogas
- Me β CD – β -ciclodextrina metilada
- MMI - Membrana mitocondrial interna
- MME – Membrana mitocondrial externa
- MTT - [Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]
- NBD – Nitro azul diformazan
- NBT – Nitro azul tetrazólio

- NOS – Óxido nítrico sintase
- PARP – Poli (ADP-ribose) polimerase
- PBMCs - Linfócitos mononucleares humanos
- PCS – Espectroscopia de correlação de fótons
- PHA - Fitohemaglutinina
- PBS – Solução tampão fosfato
- PBS-A – Solução tampão fosfato sem cálcio
- PCL - poli (ϵ -caprolactona)
- PKC – Proteína quinase C
- PLGA – Ácido poli (L-láctico-co-glicólico)
- PLGA-AE - Ácido poli (L-láctico-co-glicólico) – ascorbil éster
- PLA - poli (L-ácido láctico)
- Pluronic F68 – Polaxamer – copolímero tribloco polietileno-glicol, tribloco poli-propileno-glicol, tribloco polietileno-glicol (PEG-PPG-PEG)
- PMN – Leucócitos polimorfonucleares
- pNPP - p-Nitrofenilfosfato
- $\Delta\psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial
- pRb – Proteína retinoblastoma
- PTP – Poros de transição de permeabilidade
- PVA – Polivinil álcool
- SFB - Soro fetal bovino
- SOD - Superóxido dismutase
- TNF – Fator de necrose tumoral
- TPA - Acetato de tetradecanoilforbol
- U937 – Linhagem de células da leucemia histiocítica humana
- V79 – Linhagem de células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês
- VDAC – Canal ânion voltagem-dependente

RESUMO

Nos últimos anos, a busca por alternativas mais eficientes e menos tóxicas para a terapia de diversas doenças despertou interesse em pesquisadores de diversas áreas, particularmente as que envolvam a utilização de polímeros biodegradáveis no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de hormônios, fármacos anti-câncer, antibióticos e vacinas. A quimioterapia do câncer é uma importante aplicação de conjugados droga-polímero proporcionando aumento da eficácia terapêutica e estabilidade da droga, assim como, a redução dos efeitos colaterais. Recentes estudos comprovaram a atividade anti-leucêmica da desidrocrotonina (DHC), que é um diterpeno lactona extraída das cascas de *Croton cajucara* (sacaca), uma planta nativa e endêmica da região Amazônica. Em trabalhos anteriores, mostramos que a DHC induz diferenciação e apoptose em células da leucemia humana, HL60, com envolvimento de estresse oxidativo, ativação de caspases 3 e 9, sugerindo a participação da via mitocondrial. Neste trabalho, avaliou-se comparativamente a indução de diferenciação celular e de morte celular por apoptose pela DHC, na forma livre e complexada em β -ciclodextrinas (β CDs) em diferentes linhagens de células da leucemia mielóide humana: HL60, K562, K562 Lucena e U937. Os resultados mostram-se promissores quanto à atividade antitumoral da DHC complexada à β CDs, quanto a citotoxicidade e a atividade antitumoral, mantendo a redução da citotoxicidade em células V79 e em hepatócitos, se comparada à forma livre da DHC.

ABSTRACT

In recent years, the search for alternative, more efficient and less toxic to therapy of various diseases awakened interest in researchers from various areas, particularly those involving the use of biodegradable polymers in the development of controlled release systems for hormones, anti-cancer drugs, antibiotics and vaccines. The chemotherapy of cancer is an important application of polymer-drug conjugates providing increased therapeutic efficacy and stability of drugs, as well as the reduction of side effects. Recent studies prove the anti-leukaemic activity of desidrocrotonina (DHC), a diterpeno lactone extracted from the bark *Croton cajucara* (sacaca), a plant native and endemic of the Amazon region. In previous work, we show that the DHC induces differentiation and apoptosis of leukemia cells in human, HL60, with the involvement of oxidative stress, activation of caspases 3 and 9, suggesting the involvement of the mitochondrial pathway. In this work, it is comparatively assessed aa induction of cell differentiation and cell death by apoptosis by DHC, in the form free and complexada in β -ciclodextrinas (β CDs) in different cell lines of human myeloid leukemia: HL60, K562, K562 Lucena and U937. The results show is on the promising anti-tumor activity of DHC complexada the β CDs, on cytotoxicity and anti-tumor activity while maintaining the reduction of cytotoxicity in cells V79 and in hepatocytes, if compared to how free of DHC.

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

I. 1. Desidrocrotonina

Compostos de extraídos de plantas são intensamente investigados quanto à atividade antitumoral induzindo morte celular por apoptose. A espécie *Croton cajucara* Benth (família Euphorbiaceae), é uma planta nativa e endêmica da região Amazônica, ao norte do Brasil, onde é popularmente conhecida como “sacaca” e muito utilizada na medicina popular como infusões da casca e das folhas no tratamento de diversas doenças. Dentre essas se destacam distúrbios hepáticos e renais, diabetes, diarreia, gastralgia, febre, icterícia, hepatite viral, malária e até emagrecimento (Van Den Bergh, 1982; Martins, 1989; Di Stasi *et al.*, 1989, 1994). Porém, evidências de ocorrência de hepatite tóxica também foram relatadas, principalmente no Estado do Pará, onde seu consumo é mais intenso (Maciel, 1997; Maciel *et al.*, 1998, 2000).

Estudos anteriores revelaram a presença de esteróides, flavonóides e diterpenos tipo clerodane nas folhas e cascas de *Croton cajucara* (Simões *et al.*, 1979; Itokawa *et al.*, 1989, 1990; Kubo *et al.*, 1991; Ichihara *et al.*, 1992; Maciel *et al.*, 1998, 2000), com atividades biológicas diversas, tais como antibiótica, anti-tumoral, anti-inflamatória (Kitazawa *et al.*, 1979, 1980; McChesney *et al.*, 1991; Ichihara *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1996; Perazzo *et al.*, 1997; Maciel *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2007).

Dentre os compostos encontrados em espécies de plantas do gênero *Croton*, a desidrocrotonina (**figura 1 (a)**) é o nor-diterpeno tipo clerodane presente em maior quantidade no extrato das cascas de *Croton cajucara*, possuindo atividades: hipoglicemiante (Farias *et al.*, 1997), anti-ulcerogênica (Souza-Brito *et al.*, 1998; Hiruma-Lima *et al.*, 1999, 2002), antiestrogênica (Costa *et al.*, 1999) e anti-tumoral (Grynberg *et al.*, 1999) comprovadas. Estudos indicaram atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* em três

modelos experimentais: Sarcoma 180 (S180), tumor ascítico de Ehrlich (Grynberg *et al.*, 1999; Maciel *et al.*, 2000) e células da leucemia promielocítica humana (HL60) (Anazetti *et al.*, 2001; 2002; 2003; 2004). Segundo Grynberg e colaboradores (1999), a crotonina (**figura 1 (b)**), presente também na *C. cajucara*, induz apoptose *in vitro* e produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) em células do tumor de Ehrlich.

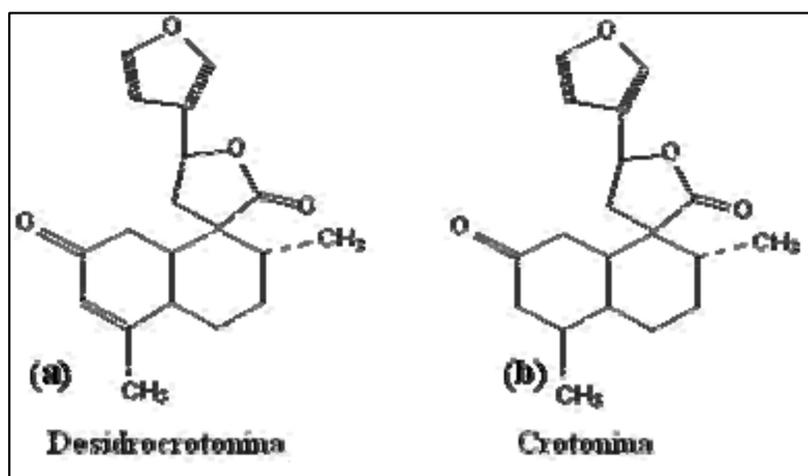


Figura 1: Estrutura Química da Desidrocrotonina (a) e Crotonina (b).

Há cerca de três décadas várias observações sugeriram que sesquiterpeno-lactonas apresentam efeitos inibitórios contra vários tipos de câncer (Rodriguez *et al.*, 1976; Grynberg *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000). Além disso, outros diterpenos isoladas de *Cistus incanus* e *Laetia corymbulosa* também apresentaram efeito citotóxico em várias linhagens de células tumorais.

A estrutura da DHC contém três grupos funcionais altamente reativos, responsáveis tanto pela citotoxicidade da molécula quanto pela atividade biológica, uma α -metileno- γ -lactona, um sistema ciclopentanona α - β -insaturada e um sistema $O=C-C=CH_2$, sendo este último um centro de alquilação essencial (Giordano *et al.*, 1992). Segundo Hanson e colaboradores (1970), o sistema α -metileno- γ -lactona participa de uma reação do tipo

Michael com nucleófilos biológicos e enzimas chaves em processos de proliferação e diferenciação celular. Neste sentido, Freire e colaboradores (2003), demonstraram que a DHC apresenta efeitos citotóxicos em células da leucemia mielóide humana HL60, com possível envolvimento de estresse oxidativo.

Em estudos anteriores foram avaliados os efeitos toxicológicos da DHC *in vitro* e *in vivo*. A observação de citotoxicidade dependente da atividade do citocromo P450 em cultura de hepatócitos sugeriu que a biotransformação hepática produz compostos mais tóxicos. Em adição, verificou-se em experimentos de toxicidade sub-crônica alteração hepática em ratos após o tratamento com a DHC. Dentre estas se incluem o aumento significativo no peso do fígado, alterações histopatológicas como tumefação turva, degeneração microvascular, alterações nucleares e aumento da atividade da enzima gama-glutamil transpeptidase. Por outro lado, a avaliação dos efeitos tóxicos da DHC em fibroblastos V79 demonstrou uma citotoxicidade do tipo basal (inespecífica). Portanto, apesar das atividades farmacológicas comprovadas, os resultados acima sugerem que o uso da DHC por períodos prolongados pode induzir lesões hepáticas, representando um efeito tóxico seletivo (Rodriguez & Haun, 1999; Melo et al., 2002; Costa *et al.*, 2007).

Com o intuito de melhorar as atividades biológicas da DHC e reduzir sua toxicidade foram desenvolvidos sistemas de liberação da DHC, utilizando a encapsulação em micro/nanoesferas de polímeros biodegradáveis e complexação em β -ciclodextrinas, que apresentou reduzida citotoxicidade em células V79 e em hepatócitos de ratos *in vitro* (Corrêa *et al.*, 2005).

I. 2. Sistemas de Liberação Controlada

I.2.1. Nanopartículas de PLGA

Os sistemas de liberação controlada de fármacos consistem em modificações que permitem alterar as propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas do mesmo (Brigger *et al.*, 2001). O controle da liberação de fármacos em sítios específicos, através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da atividade terapêutica do fármaco tem sido uma área de intensa pesquisa na última década (Schaffazick *et al.*, 2003). Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (Soppimath *et al.*, 2001).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam um diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as

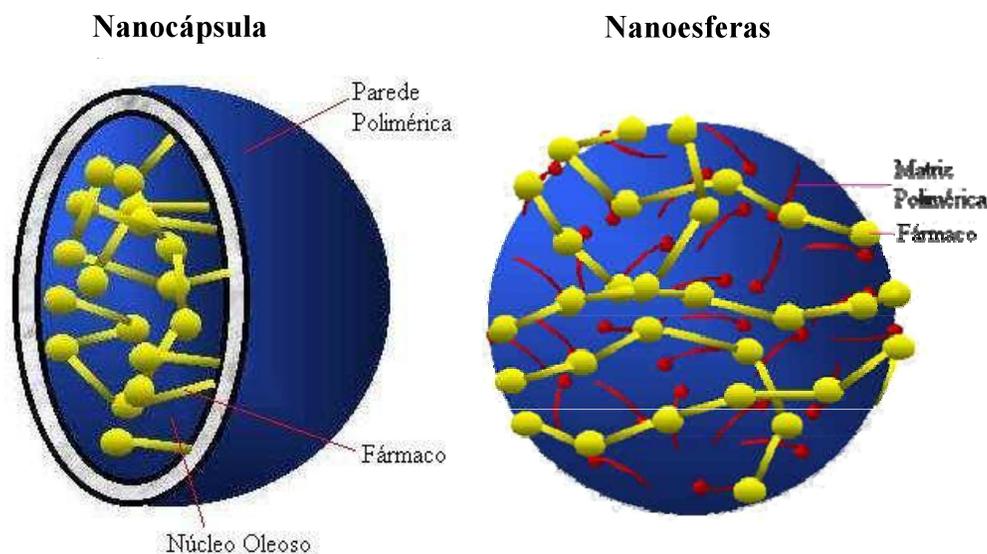


Figura 2. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (**Figura 2**). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam núcleo oleoso em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Allémann, *et al.*, 1993; Puisieux *et al.*, 1994).

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos (Puisieux *et al.*, 1994; Yoo *et al.*, 2000; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000; Brigger *et al.*, 2002), principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e assim, uma aumento do índice terapêutico (Schaffazick *et al.*, 2003).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilatos de alquila) (Lambert *et al.*, 2000) ou na precipitação de polímeros pré-, tais como poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda os copolímeros de ácido metacrílico e de um éster acrílico e metacrílico formados (Guterres *et al.*, 1995, 2000; Santos-Magalhães *et al.*, 2000).

Diversos estudos demonstram que polímeros biodegradáveis são veículos apropriados para a incorporação de agentes quimioterápicos, liberando-os diretamente ao sítio alvo do tumor. Muitos carreadores particulados foram desenvolvidos para sistemas de liberação controlada

em fluidos corpóreos, como o sangue e a linfa, por exemplo. O ácido poli-lático (PLA) e os copolímeros de ácidos glicólico e lático (PLGA) são poli-ésteres biodegradáveis e histocompatíveis utilizados na preparação de fios cirúrgicos para suturas, reabsorvíveis pelo organismo, aprovados pelo FDA para uso em humanos (Chandy *et al.*, 2000). Estes polímeros podem ter sua superfície modificada, permitindo a aplicação no direcionamento de fármacos ao órgão alvo, proporcionando aumento da especificidade de agentes anti-tumorais e da eficácia terapêutica.

Como exemplo, tem-se o paclitaxel (Taxol[®]), uma droga antineoplásica eficiente contra vários tipos de câncer, especialmente contra tumores ovarianos e de mama, altamente hidrofóbica. Devido a esta alta hidrofobicidade é necessária a utilização de um adjuvante na administração clínica, acarretando sérios efeitos colaterais, dentre os quais destacam-se as reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Sharma *et al.*, 1996). Feng & Huang (2001) estudaram diversas preparações do Taxol[®] em nanoesferas de PLGA (poli (L-lático-co-glicólico), o que possibilitou a administração subcutânea e intramuscular, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e aumentando a eficácia terapêutica (Singla *et al.*, 2002).

Independente do método de preparação os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Em função de sua natureza coloidal, algumas dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas. A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho da partícula, a determinação do potencial zeta, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas e a cinética de liberação do fármaco (Legrand *et al.*, 1999). O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à proposição de

modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações (Schaffazick *et al.*, 2003).

A busca de novas terapias menos citotóxicas no tratamento de leucemias, associada à atividade antitumoral da desidrocrotonina (Anazetti *et al.*, 2003) despertou interesse em desenvolver um sistema de liberação controlada para a DHC e avaliar sua atividade em alguns modelos leucêmicos *in vitro*.

I.2.2. Complexos de Ciclodextrinas (CDs)

A primeira proposta de sistemas de liberação de fármacos consistia na liberação de determinada quantidade do mesmo no sítio alvo durante um período de tempo necessário de forma eficiente e precisa. Para isso, são utilizados materiais carreadores adequados que superem propriedades indesejáveis das moléculas dos fármacos (Hirayama & Uekama, 1999; Szente & Szejtli, 1999; Rajewski & Stella, 1996; Stella & Rajewski, 1997).

Ciclodextrinas (CDs) são um grupo de oligossacarídeos obtidos a partir de degradação enzimática do amido, que podem modificar propriedades farmacológicas de fármacos através da formação de complexos de inclusão (Ahmed, 2001; Ren *et al.*, 2002; Duran *et al.*, 2003; Britto *et al.*, 2004).

A principal aplicação de CDs para indústria farmacêutica é a capacidade de otimização de biofarmacêuticos em termos de solubilidade, liberação, permeabilidade de membrana, biodisponibilidade e estabilidade do componente terapêutico (Grosse *et al.*, 1997; 1998; Szejtli, 1994, 1998; Szente & Szejtli, 1999; Singh *et al.*, 2002; Loftsson *et al.*, 2004; Martin Del Valle, 2004). As principais vantagens de ciclodextrinas naturais como carreadores de fármacos são: (1) uma estrutura química bem definida, proporcionando muitos sítios potenciais para modificação química ou conjugação; (2) uma disponibilidade de ciclodextrinas de diferentes tamanhos de cavidades; (3) baixa toxicidade e atividade

farmacológica; (4) certa solubilidade em água; (5) proteção de drogas incluídas/conjugadas por biodegradação.

A mais comum ciclodextrina natural, β -ciclodextrina (**figura 3**), tem 21 grupos hidroxila sendo sete primários e 14 secundários. A visualização topológica deste macrociclo pode ser descrita como um cone truncado, no qual o arco estreito ($\sim 6.4 \text{ \AA}$) comporta o grupo primário de hidroxilas, entretanto o arco longo ($\sim 15.4 \text{ \AA}$) comporta grupos hidroxilas secundários. Visto que não há presença de grupo hidroxil-axial na cavidade toroidal de β CD, esta zona da molécula tem um caráter hidrofóbico pronunciado (Thompson, 1997; Uekama *et al.*, 1998; Loftsson *et al.*, 2004). Além disso, o interior da molécula de β -CD

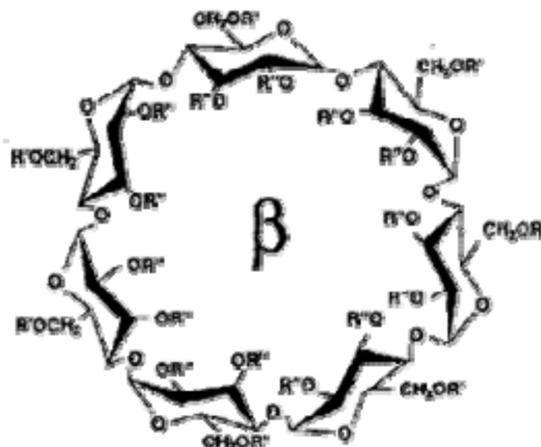


Figura 3. Estrutura Química da β -Ciclodextrina.

forma uma cavidade hidrofóbica, enquanto a superfície externa é hidrofílica, permitindo-a a atuar como um hospedeiro para uma ampla variedade de drogas lipofílicas (Zhao *et al.*, 2002).

As CDs naturais α , β , e γ diferem-se quanto ao tamanho da cavidade e solubilidade em água, consistindo de seis, sete e oito unidades de D-glicose, respectivamente, em um arranjo estrutural que permite a acomodação de fármacos formando complexos de inclusão (**figura 4**) (Saenger, 1983; Stella & Rajewski, 1997; Thompson, 1997; Zhao *et al.*, 2002; Loftsson *et al.*, 2004; Britto *et al.*, 2004; Uekama, 2004). As CDs mais hidrofílicas podem modificar a taxa de liberação de fármacos pouco solúveis em água, aumentando a absorção através de barreiras biológicas, servindo como potente carreador de fármacos em

formulações de liberação imediata (Uekama, 2004). A solubilidade de CDs pode ser melhorada através da derivatização de grupos hidroxila, tais como metilação, hidroxilação, hidroxipropilação, hidroxietilação e acetilação. (Allegre & Deratani, 1994; Sztelji, 1994, 1988; Grosse *et al.*, 1997; Harada, 2001; Kang *et al.*, 2002). Estudos anteriores mostram que β CD metilada (Me β CD) pode alterar a fluidez e a permeabilidade de membranas celulares. Além disso, observou-se maior eficiência no transporte de moléculas na presença

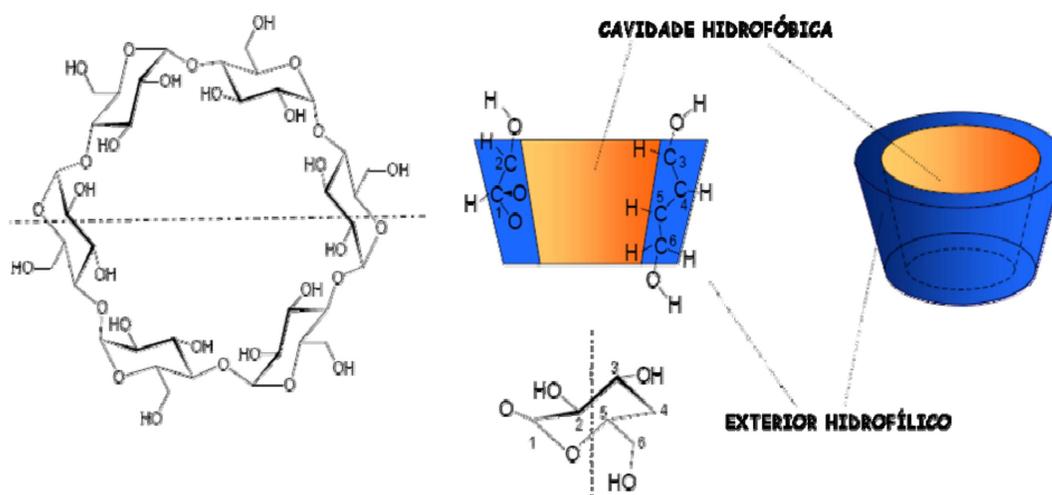


Figura 4. Estrutura Química Molecular e Tridimensional de Ciclodextrinas.

de Me β CD (Cho *et al.*, 1995; Grosse *et al.*, 1998, 1999; Loftsson & Masson, 2001; Szente *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004a). As CDs amorfas, tais como 2-hidroxi-propil- β CD (HP β CD), são úteis na inibição de transição polimórfica e variações na cristalização de fármacos hidrofóbicos durante armazenamento. Conseqüentemente mantém as características de alta solubilidade e biodisponibilidade dos componentes terapêuticos. A **tabela 1** contém as principais características de interesse dos derivados de β CDs utilizados no presente estudo, como carreadores de DHC (Irie & Uekama *et al.*, 1998; Panchagnula, 1998, 2000; Ugwu *et al.*, 1999; Szente *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Uekama, 2004).

A quimioterapia é uma importante modalidade terapêutica em muitos processos patológicos. Entretanto, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês, multidrug resistance) e a toxicidade das mesmas são suas maiores limitações. Na tentativa de modificar a estrutura química do fármaco ou driblar a resistência a múltiplas drogas, muitos pesquisadores têm explorado novas técnicas, tornando possível novas descobertas sobre as características de células tumorais. Um possível novo alvo pode ser as membranas celulares, que é o sítio potencial para a atividade de Me β CD (Grosse *et al.*, 1998, 1999). Em trabalhos anteriores, Grosse e colaboradores, (1997) mostraram a atividade antitumoral em potencial de doxorubicina complexada a β CDs em células da leucemia humana HL60.

Tabela 1. Derivados de β CDs farmacologicamente úteis.

Derivados Hidrofilicos	Características	Formas de dosagem possíveis
Me β CD	Solúvel em água fria e em solventes orgânicos	Oral, dermal, parenteral (intravenosa) e mucosa
2-HP β CD	Altamente solúvel em água, baixa toxicidade	

I.3. Células da Leucemia Humana

A leucemogênese é um fenômeno complexo caracterizado por anomalias de proliferação e diferenciação resultando em bloqueio de maturação e expansão clonal de células tumorais (Uzunoglu *et al.*, 1999). A leucemia mielóide aguda (LMA) é caracterizada pela proliferação anômala dos precursores granulocíticos-macrofágicos da medula óssea, que

está relacionado à incapacidade funcional para maturação e diferenciação celular e não a um aumento na taxa de crescimento. A habilidade em responder a fatores exógenos de diferenciação apresenta-se diminuída em células da leucemia, podendo ocorrer alteração na expressão de produtos gênicos específicos necessários para a diferenciação celular (Breitman, 1990). A linhagem celular da leucemia promielocítica aguda (LPA) HL60 foi estabelecida em 1976 a partir do sangue periférico de pacientes com LPA e foi a primeira e única linhagem de células de leucemia mielóide aguda disponível por vários anos (Collins, 1987; Dalton *et al.*, 1988; Drexler *et al.*, 1995, 2000). Estas células proliferam continuamente em culturas em suspensão, consistindo morfológica e histoquimicamente, predominantemente em promielócitos, dos quais cerca de 4-15 % apresentam características morfológicas de células mielóides mais maduras: mielócitos, metamielócitos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Collins *et al.*, 1977, 1978; Newburger *et al.*, 1979; Breitman, 1990).

A linhagem de células da leucemia mielóide crônica (LMC) K562 foi estabelecida por Lozzio & Lozzio, (1975a) a partir de efusão pleural de um paciente em crise blástica terminal. A população celular tem sido caracterizada como altamente não diferenciada em série granulocítica (Lozzio & Lozzio, 1975b). Estudos das propriedades de superfície de membrana concluíram que as células K562 constituíam uma linhagem de eritroleucemia humana (Anderson *et al.*, 1979). Os blastos K562 são multipotenciais, células hematopoiéticas malignas que se diferenciam espontaneamente na presença de progenitores de séries eritrocíticas, granulocíticas e monocíticas (Lozzio *et al.*, 1981). Koefler & Golde, (1980) revisaram diversos indutores de diferenciação em sublinhagens derivadas da linhagem celular K562 de origem.

Como mencionado anteriormente, o fenômeno de resistência a múltiplas-drogas (MDR) à quimioterapia é o maior obstáculo no tratamento contra o câncer. O fenótipo mais característico de MDR envolve a expressão do produto do gene MDR-1, glicoproteína-P (Juranka *et al.*, 1989), entretanto, o processo de resistência é multifatorial. Para elucidar os mecanismos de MDR, tem-se utilizado linhagens de células selecionadas apresentando reatividade cruzada a uma ampla variedade de agentes anticancerígenos. As células K562 Lucena caracterizam-se como resistentes a múltiplas-drogas, originalmente selecionada devido à resistência ao alcalóide vinca vincristina e derivou da linhagem celular K562 de origem Alguns agentes quimioterápicos aumentaram a resistência dessas células, tal como 5-fluorouracil. Além disso, as células K562 Lucena apresentaram resistência à radiação-UV e a peróxido de hidrogênio. Alterações no citoesqueleto dessas células também foram observadas tais como, expressão aumentada de actina e/ou tubulina e alterações na organização de fibras, microtúbulos e complexos de Golgi, além de expressão elevado de RNAm de actina e da subunidade protéica de β -tubulina, quando comparadas com a linhagem K562 de origem. (Rumjanek *et al.*, 2001). Esta linhagem superexpressa a glicoproteína-P e tem sua resistência revertida por verapamil, trifluoperazina e ciclosporinas A, D e G (Trindade *et al.*, 1999; 2000).

A linhagem de células da leucemia monocítica U937 foi estabelecida a partir de células malignas obtidas do sangue periférico de um paciente, por efusão pleural, com linfoma histiocítico difuso (McCollum *et al.*, 2005). Estas células leucêmicas foram derivadas de um linfoma de não-Hodgkin por Sundstrom & Nilsson, (1976). Estudos desde o final da década de 70 têm mostrado que essas células apresentam um bloqueio na diferenciação de progenitores monocíticos e podem ser induzidas à diferenciação terminal monocítica por misturas de sobrenadantes de cultura de linfócitos humanos, forbol ésteres, vitamina D3,

interferon gama, fator de necrose tumoral (TNF) e ácido retinóico. Portanto, constitui um modelo para estudos *in vitro* de indução de diferenciação monócito/macrófago. As células U937 expressam o antígeno Fas e são sensíveis aos anticorpos anti-Fas e TNF (Sundstrom & Nilsson, 1976; Baker & Reddy, 1996; Choi *et al.*, 2002).

Devido à proliferação desregulada e à inibição de morte celular por apoptose serem eventos comuns no desenvolvimento de tumores em geral, estes dois aspectos são alvos de intervenção terapêutica em todos os tipos de câncer (Evan & Vousden, 2001). Vários estudos demonstram a indução de apoptose em células de leucemia humana constituindo uma vantagem em relação a compostos quimioterápicos com ação estritamente citotóxica (Bertrand *et al.*, 1991; Dive & Hickmann, 1991; Gorczyca *et al.*, 1993; Kaufmann & Earsnshaw, 2000; Bertram, 2001; Hugh, 2003; Reed, 2003; Bai *et al.*, 2004). A combinação de agentes citotóxicos que induzem diferenciação celular e apoptose pode modificar a história da quimioterapia nos próximos anos, desenvolvendo tratamentos mais tóxicos para as células tumorais e mais eficientes, projetados em função das alterações biológicas dessas células.

I.4. Morte Celular por Apoptose

I.4.1. Apoptose versus câncer

A regulação do número de células é uma propriedade crucial dos organismos multicelulares. O corpo humano é composto por aproximadamente 10^{14} células, sendo que diariamente bilhões de células morrem para assegurar o funcionamento adequado do organismo. A morte celular desse tipo é fisiológica e constitui a morte celular programada ou apoptose, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr e colaboradores (1972). Portanto apoptose é um processo essencial para a regulação do desenvolvimento e manutenção da homeostase em tecidos adultos,

sendo uma consequência do balanço entre morte *versus* taxa de proliferação celular. Processos de proliferação celular desregulada e morte celular por apoptose suprimida constituem suporte para a progressão neoplásica, comum a todos os tipos de câncer (Wyllie *et al.*, 1980; Thompson, 1995; McConkey, 1998; Curtin *et al.*, 2002; Kerr, 2002; Jatella, 2004; Kim, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Os processos governantes da gênese e progressão de câncer são evolutivos, pois a seleção natural atua sobre a diversidade adquirida e inerente de vários clones somáticos, prevalecendo as formas que apresentam vantagens propagativas. (Israels and Israels, 1999; Bertram, 2001; Evan & Vousden, 2001; Cruchten & Broeck, 2002; Fischer & Schulze-Osthoff, 2005). A modulação da apoptose em células tumorais consiste em um novo conceito no tratamento quimioterápico de diferentes tipos de câncer, utilizando fármacos anti-tumorais mais seletivos e, portanto, mais eficientes (Hickman, 1996; Yamada *et al.*, 2003). Apoptose pode ser induzida por inúmeros estímulos, incluindo agentes anti-tumorais, privação de fatores de crescimento e radiação. Dentre os efeitos da indução de morte celular por apoptose em resposta à quimioterapia, destacam-se a redução no volume tumoral. Entretanto, a inibição da morte celular por apoptose em células tumorais pode causar resistência à múltiplas-drogas (MDR) (Kim *et al.*, 2002; 2003; Pommier *et al.*, 2004; Kim, 2005).

I.4.2. Bioquímica da Apoptose

Apoptose resulta de um colapso de infra-estrutura celular através de digestão proteolítica, que leva a desintegração do citoesqueleto, transtorno metabólico e fragmentação genômica (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005). A maioria das alterações morfológicas observadas por Kerr e colaboradores (1972), é causada por membros da família de cisteíno proteases, chamadas caspases, que estão envolvidas nas fases de iniciação (caspases-2, -8, -9, -10),

execução (caspases-3, -6, -7) e regulação das vias apoptóticas (**figura 5**) (Jacobson & Evan, 1994; Cohen, 1997; Stennicke & Salvesen, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998;

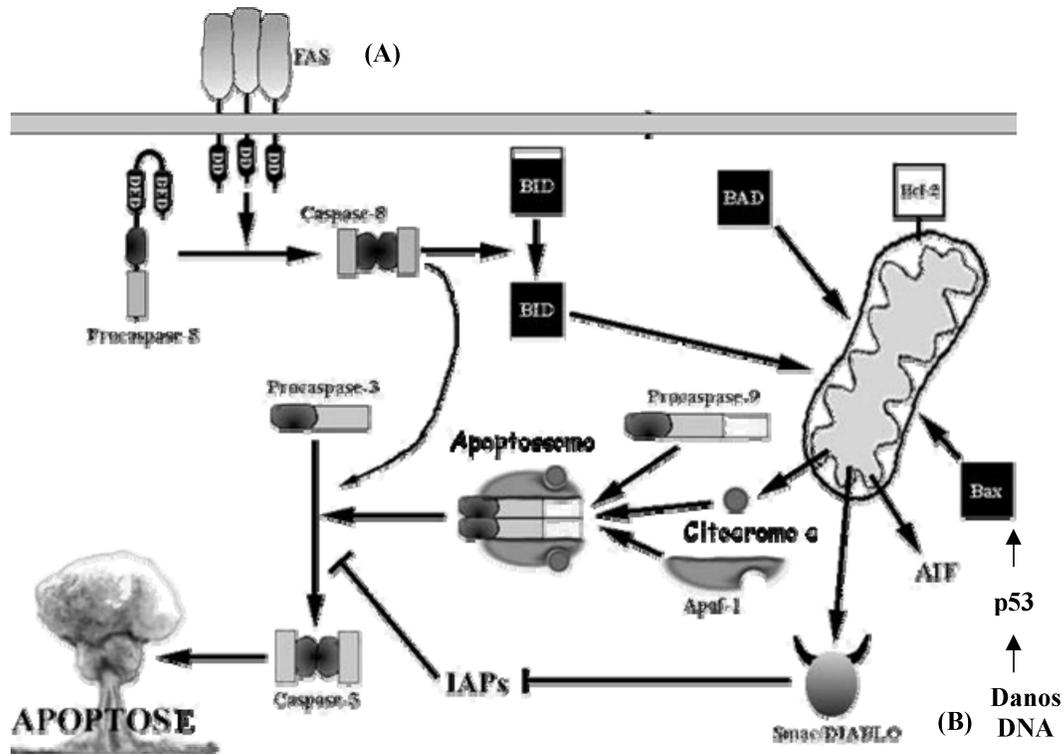


Figura 5. A via receptor (A) é desencadeada por membros da família de receptores de morte celular, tal como CD95/Fas/Apo-1. Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte, que recruta pró-caspases através de proteínas de domínio de morte associada ao receptor. A via mitocondrial (B) é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Estes se associam com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte por apoptose.

Hengartner, 2000; Minko *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003; Fuentes-Prior & Salvesen, 2004).

Alguns reguladores do ciclo celular participam em ambos os processos, morte celular programada e divisão celular. A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF- κ B, CDK, ciclinas e CKI. Após estímulo, estas proteínas podem induzir proliferação celular, parada

do ciclo ou morte celular. O “background” genético e o micro-ambiente celular são importantes, assim como a extensão de danos ao DNA e o nível de diferentes proteínas (Vermeulen *et al.*, 2003a,b). Níveis elevados de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 bloqueiam (Bcl-2 e Bcl-x) e aumento de outras induzem a apoptose (Bax, Bad e Bak). As proteínas Bax (família de proteínas pró-apoptóticas) estão associadas a outras proteínas, que ancoram Bax no citoplasma. Entretanto, na presença de danos no DNA ou fosforilação de fatores de transcrição específicos, ocorre a dissociação das proteínas Bax e homo (Bax/Bax) ou heterodimerização (Bax/Bcl-2) com outras, resultando na translocação de Bax do citoplasma para a mitocôndria, desencadeando apoptose. As proteínas Bcl-2 estão localizadas na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares. Dentre suas atuações está o bloqueio da liberação de citocromo c pela mitocôndria após estímulo apoptogênico (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005; Kim, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Em geral, dentre as vias de sinalização de morte celular por apoptose induzidas por agentes anti-tumorais, conforme mostrado na **figura 5**, destacam-se duas, uma via receptor-dependente (extrínseca) (A) e outra via mitocôndria-dependente (intrínseca) (B) (Debatin, 2004; Orrenius *et al.*, 2003; Kim, 2005). A predominância de uma via sobre a outra depende do tipo celular (Barnhart *et al.*, 2003). A via receptor-dependente envolve a ativação de receptores de morte, tais como Fas e TRAIL. A ativação desses receptores é mediada por um complexo de sinalização formado pelo recrutamento de um domínio de morte, constituído por um complexo protéico associado ao receptor Fas e procaspase-8. Caspase-8 ativa diretamente caspase-3, levando a apoptose (**figura 5 (A)**). A via mitocôndria-dependente envolve atividade de caspase-8 na clivagem e heterodimerização de proteínas pró-apoptóticas (Bax) que interagem com canais aniônicos voltagem-dependentes (VDAC) na membrana mitocondrial externa (MME), resultando na liberação

de citocromo-c e ativação de caspases-3 e -9 (**figura 5 (B)**) (Kim *et al.*, 2002; Lacour *et al.*, 2003; Barnhart *et al.*, 2003; Kim, 2005).

Após estímulo apoptótico, a homo (Bax/Bax) ou heterodimerização (Bax/Bcl-2) de proteínas Bax no citoplasma, resulta na translocação dessas para a mitocôndria, onde interagem com canais VDAC de ampla condutância, provocando a formação de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial interna (PTP). Esses poros de PTP podem ser inibidos, quando na presença de ciclosporina-A. Os poros de transição de mitocôndria causam aumento de permeabilidade de membrana mitocondrial e consequente dissipação do gradiente de prótons (H^+) e, portanto, despolarização ou perda de potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) e “swelling” osmótico, devido à alta concentração de solutos na matriz mitocondrial. O complexo de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (CPPT) é composto de um translocador do nucleotídeo adenosina e os canais VDAC, ambos alvos de vários indutores pró-apoptóticos. Entretanto, alguns autores mostraram que o citocromo c pode ser liberado a partir da membrana mitocondrial interna antes da despolarização da mesma e, portanto, antes da abertura de poros de PTP (Yang *et al.*, 2005). Além disso, muitas caspases podem induzir diretamente PTP mitocondrial, sugerindo que a seqüência de eventos pode implicar na liberação de citocromo c, seguido pela ativação de caspases e posteriormente, eventos proteolíticos induzidos por caspases desencadeiam PTP (Reed, 1997; Lassus *et al.*, 2002). A liberação de citocromo c resulta na formação de uma apoptossomo, consistindo de fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1) e procaspase-9, que é ativada à caspase-9 por dATP. Caspase-9 iniciadora leva a ativação de caspases efetoras, tais como caspases-3 ou -7, que clivam um inibidor de DNase ativado por caspase, produzindo poly (ADP-ribose) polimerase (PARP), resultando na

fragmentação de DNA característica (Li *et al.*, 1997; Reed, 1997; Vander Heiden *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Deveraux *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Finkel, 2001; Gottlieb, 1999, 2000, 2001; Jia *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 2002; Lacour *et al.*, 2003; Scorrano *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Khosravi-Far & Esposti, 2004; Tsuruta *et al.*, 2004; Verrier *et al.*, 2004; Bras *et al.*, 2005; Fischer & Schulze-Osthoff, 2005; Kim, 2005; Yang *et al.*, 2005).

1.4.2.1. Mitocôndria, Cálcio e Apoptose

Apoptose pode ser induzida via perda do controle homeostático de Ca^{+2} , que atua como um segundo mensageiro, podendo também regular, positivamente ou negativamente, a indução de morte através de alterações na distribuição de Ca^{+2} em compartimentos celulares. Neste contexto, o Ca^{+2} pode inibir ou ativar vias de sinalização de morte celular (Orrenius *et al.*, 2003).

O papel do Ca^{+2} , como indutor de morte foi inicialmente sugerido por Fleckenstein e colaboradores, 1974, os quais propuseram que o influxo de Ca^{+2} em miócitos pode ser o mecanismo central de patologias cardíacas desencadeadores após isquemia. Estudos posteriores mostraram que o fluxo, a distribuição e alterações na sinalização de Ca^{+2} intracelular podem ter efeitos adversos, incluindo alterações na proliferação e diferenciação celular, assim como na modulação de apoptose. Sabe-se que processos dependentes de Ca^{+2} intervêm na atividade dos principais executores de apoptose, as caspases, o seqüestro de Ca^{+2} em pool intracelular e em retículo endoplasmático, pode ser suficiente para desencadear a morte celular por apoptose como resposta ao estresse. Além disso, processos dependentes de Ca^{+2} podem ser recrutados durante a eliminação final de células mortas ou em processos de morte promovendo sua lise e fagocitose (Orrenius *et al.*, 2003).

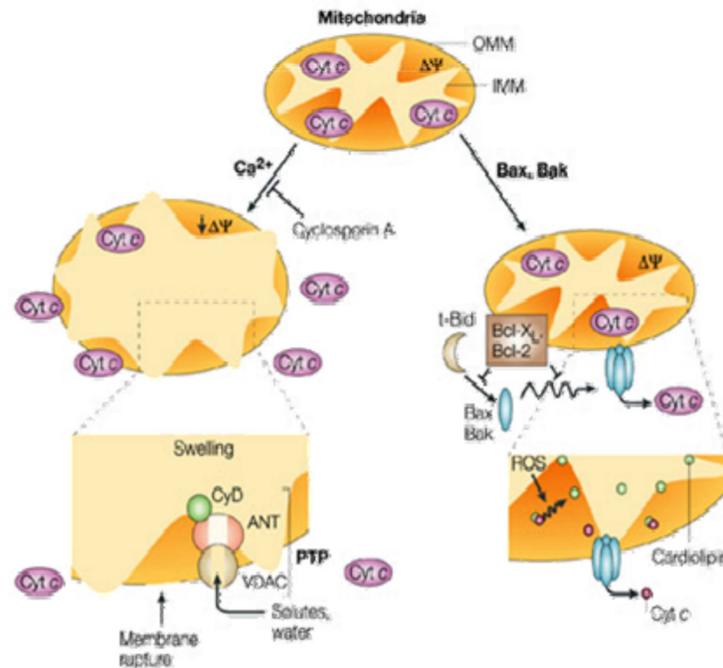


Figura 6. Mecanismos de liberação de proteínas a partir do espaço intermembranas mitocondrial. Há pelo menos dois mecanismos reconhecidos para permeabilização da membrana mitocondrial externa (MME). O primeiro **(A)** envolve abertura do poro de transição de permeabilidade (PT), que consiste em canal ânion voltagem-dependente composto por um complexo protéico. Abertura do poro é seguida pelo swelling mitocondrial, ruptura da MME e liberação de citocromo c para o espaço intermembranas. Entretanto, abertura transitente do poro pode ocorrer em uma pequena parte da mitocôndria que esteja sofrendo transição de permeabilidade por um determinado tempo. Neste caso, a liberação de proteínas mitocondriais ocorre sem swelling significativo ou perda de potencial de membrana mitocondrial (não mostrado). Em ambos os casos, o processo pode ser bloqueado pela ciclosporina A (CsA), que se liga a uma proteína do complexo de poro e inibe a abertura deste. O segundo mecanismo **(B)** de permeabilização da MME envolve membros da família de proteínas Bcl-2, principalmente Bax e Bak, e t-Bid. Citocromo c está normalmente ligado à MMI por associação com o fosfolípido aniônico cardiolipina, que é exclusiva da mitocôndria e está presente predominantemente na MMI. A dissociação de citocromo c da cardiolipina é um importante passo inicial na liberação no citosol e é estimulada pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), assim como a ligação de Ca^{+2} à cardiolipina (não mostrado).

Há muitos anos a mitocôndria é conhecida por participar ativamente na compartimentalização de Ca^{+2} intracelular (Hampton *et al.*, 1996; Galitovsky & Gogvadze, 2001; Carafolli, 2002). O recrutamento da via mitocondrial de sinalização de apoptose resulta na permeabilização de membrana externa da mitocôndria (MME) e a liberação de proteínas pro-apoptóticas desta organela, dentre as quais o citocromo c tem atraído maior

atenção, devido ao seu papel na ativação de caspases (**figura 6**). A permeabilização da MME pode ser obtida por vários mecanismos, incluindo formação de poros por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e ruptura da membrana mitocondrial interna (MMI) como resultado de swelling mitocondrial. Evidências mostram que proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, Bax e Bak, assim como t-Bid e outras proteínas - BH3, translocam-se à mitocôndria na presença de estímulo apoptótico. Bax e Bak podem formar oligômeros na MME, e este processo é estimulado por t-Bid e outras proteínas - BH3. Entretanto, seqüestro de proteínas pró-apoptóticas por membros da família anti-apoptótica, Bcl-2 e Bcl-X_L, previnem a oligomerização e a inserção de Bax e Bak na MME e, portanto, inibem a formação do poro de permeabilidade de MME. Outros papéis do Ca⁺² na sinalização de apoptose são conhecidos, tais como ativação de proteínas da família Bcl-2, Bad, pela calcineurina, ativação de óxido nítrico sintase, de fosfolipases, de endonucleases, de transglutaminases e de proteases. Além disso, o Ca⁺² regula um segundo mecanismo responsável pela permeabilização da MMI e liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, as quais estão associadas à resposta ao estresse conhecida como transição de permeabilidade de membrana interna. Este envolve a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), que consiste, como descrito anteriormente, em um amplo complexo de proteínas que comprimem o canal ânion voltagem-dependente (VDAC) (Halestrap *et al.*, 1998; Crompton, 1999; Orrenius *et al.*, 2003). O complexo de poro localiza-se no local de contato entre a MMI e a MME. O poro comporta-se como um canal voltagem-dependente que se torna ativo pela alta concentração de Ca⁺² na matriz mitocondrial, estresse oxidativo, oxidação de grupamentos tióis, alcalinização ou baixo potencial transmembrana. Inicialmente, observa-se uma rápida abertura e fechamento do poro, seguido pela abertura persistente induzida pela entrada do Ca⁺² e componentes de baixa massa molecular

(MM<1500). A abertura do poro pode ser revertida por agentes tais como a ciclosporina A (CsA) e por inibidores do influxo de Ca^{+2} mitocondrial (Weis *et al.*, 1994; Orrenius *et al.*, 2003).

Vários tratamentos têm sido desenvolvidos para induzir apoptose via transição de permeabilidade mitocondrial mediada por Ca^{+2} em diferentes tipos celulares. Tais agentes incluem ionóforos de Ca^{+2} , neurotoxinas, quimioterápicos e agentes pró-oxidantes, como por exemplo, ácido araquidônico e peroxinitrito (Petronilli *et al.*, 1993; Korge & Weis, 1999; Kidd *et al.*, 2002; Akao *et al.*, 2003). Como mencionado anteriormente, a formação de PTP resulta na liberação de citocromo c da mitocôndria e de outras proteínas pró-apoptóticas e pode estar associada com swelling osmótico da mitocôndria, alta concentração de proteína na matriz e ruptura de MME. Entretanto, somente uma fração da população mitocondrial pode sofrer transição de permeabilidade e liberação de citocromo c. Alguns estímulos apoptóticos podem induzir alterações na sinalização do Ca^{+2} mitocondrial desencadeando o processo apoptótico pela facilitação da abertura de PTP induzida por Ca^{+2} . Recentes observações indicaram que a resistência de células leucêmicas ao 2-clorodesoxiadenosina (CDA) está associada com aumento na habilidade de suas mitocôndrias em sequestrar Ca^{+2} evitando a indução de PTP. As células resistentes a CDA foram seletivamente resistentes à apoptose induzida por taspigargina, mas não à apoptose induzida por staurosporina ou Fas. Portanto, parece que há pelo menos dois mecanismos distintos responsáveis pela permeabilização da mitocôndria durante a fase inicial da apoptose, porém estes podem estar inter-relacionados (Orrenius *et al.*, 2003).

1.4.2.2. Apoptose & Estresse Oxidativo

Uma grande variedade de estímulos pode induzir apoptose, dentre esses o estresse oxidativo provocado pela geração de intermediários oxidativos através da ação de alguns agentes anti-neoplásicos (Slater *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1999; Matsura *et al.*, 1999; Matés & Sanchez-Jimenez, 2000; Piwocka *et al.*, 2001).

O estado redox das células é uma consequência do balanço entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), oxidantes e redutores equivalentes. Elevação nos níveis de EROS acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular os níveis dessas espécies resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Sob esta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, que podem levar a morte celular. Embora diversas macromoléculas estejam sujeitas ao ataque por EROS, lesões em nucleotídeos livres ou no DNA podem ocasionar danos permanentes devido aos efeitos deletérios destas espécies (Allen & Tresini, 2000).

Muitos tipos celulares normais e malignos podem gerar e liberar espécies reativas de oxigênio *in vitro* em resposta a um estímulo específico desencadeado via fator de crescimento/citocina ou constitutivamente no caso de células tumorais (Cerutti, 1994; Zwart *et al.*, 1999). Células cancerígenas podem gerar peróxido de hidrogênio e, se isso ocorrer *in vivo*, pode contribuir para a mutação das células normais em cancerígenas e provocar danos em tecidos normais e, assim, facilitar o crescimento e invasão do tumor (Zwart *et al.*, 1999). Trabalhos anteriores sugeriram que a persistência de uma situação de estresse oxidativo em células tumorais poderia explicar parcialmente algumas características do câncer, tais como proto-oncogenes ativados, fatores de transcrição, instabilidade genômica, resistência a radioterapia ou a quimioterapia, invasão tecidual e

metástase (Toyokumi *et al.*, 1995; Allen & Tresini, 2000). Contudo, a ocorrência de uma situação de estresse oxidativo *in vivo* e suas consequências para o hospedeiro permanece uma questão em aberto. Um dos mais importantes fatores a ser considerado em relação a essa situação de estresse oxidativo é o balanço entre radicais livres e sistemas antioxidantes, comumente utilizados como marcadores do estado redox.

Em uma situação de estresse oxidativo as células apresentam dois mecanismos de defesa importantes: um tampão redutor tiol consistindo de pequenos peptídeos com moléculas sulfidríla redox ativas: glutathiona (GSH) e tiorredoxina (TRX) e, um sistema enzimático (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX)) (**figura 7**) (Yu, 1994; Gabbita *et al.*, 2000; Matés, 2000; Davis *et al.*, 2001; Curtin *et al.*, 2002).

A GSH é o mais abundante composto tiol de baixo peso molecular encontrado em plantas e animais (Meister & Anderson, 1984; Sies, 1999), em concentrações variando entre 0,1 – 10 mM (Schroeder *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 2001). Este tripeptídeo apresenta diversas funções celulares em adição à suas propriedades antioxidantes participando na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose (Larsson *et al.*, 1983; Vina, 1990; Cotgreave & Gerdes, 1998; Arrigo, 1999; Sies, 1999; Voehringer, 1999; Davis *et al.*, 2001). Estes processos estão interrelacionados com o estado redox tiol, interações proteína-glutathiona e proliferação celular (Cotgreave & Gerdes, 1998; Sies, 1999).

Em condições normais, mais de 95 % da GSH nas células está reduzida; portanto o ambiente intracelular é, normalmente, altamente redutor. Investigações sobre o papel da GSH na modulação da sinalização apoptótica sugerem que alterações no estado redox intracelular induzido por agentes citotóxicos também são modulados pela geração de EROS e pela extrusão de GSH das células (Ghibelli *et al.*, 1995). Vários estudos demonstram uma

diminuição de GSH intracelular concomitante a um aumento em EROS no processo de morte celular por apoptose (Oda *et al.*, 1999; Xu & Thornalley, 2001).

A esse respeito, Slater e colaboradores (1995) postularam que a perda de GSH citoplasmático seria um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, através da influência na capacidade redox tamponante da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes. Quando há uma diminuição também nos níveis de GSH mitocondrial, a produção de energia é afetada e a célula incha e sofre “necrose secundária” (apoptose tardia). Estudos demonstraram que a morte celular apoptótica pode sofrer uma transição para a necrótica durante uma situação de estresse oxidativo através de dois mecanismos principais. O primeiro é desencadeado pela inativação de caspases devido à oxidação do grupo tiol de seus sítios ativos por agentes oxidantes ou S-nitrosilação. No segundo mecanismo ocorre uma redução nos níveis de ATP, portanto, na produção de energia, devido à diminuição de função mitocondrial causada pela ação de agentes oxidantes, levando à liberação de citocromo c e alteração de permeabilidade de membrana mitocondrial (McConkey, 1998; Chandra *et al.*, 2000).

A **figura 7** mostra as maiores fontes produtoras de EROS incluem a mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática e citosol. A mitocôndria gera $O_2^{\bullet-}$ durante a respiração, que é convertido a H_2O_2 pela superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD). No citosol, $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 pela superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (Cu, Zn-SOD). As duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox , glutationa (GSH) presente em ambos, citosol e mitocôndria e, catalase presente na fração peroxissomal. Outras fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem as enzimas xantina oxidase no citosol, NADPH oxidase na membrana plasmática e citocromo P450 no retículo endoplasmático.

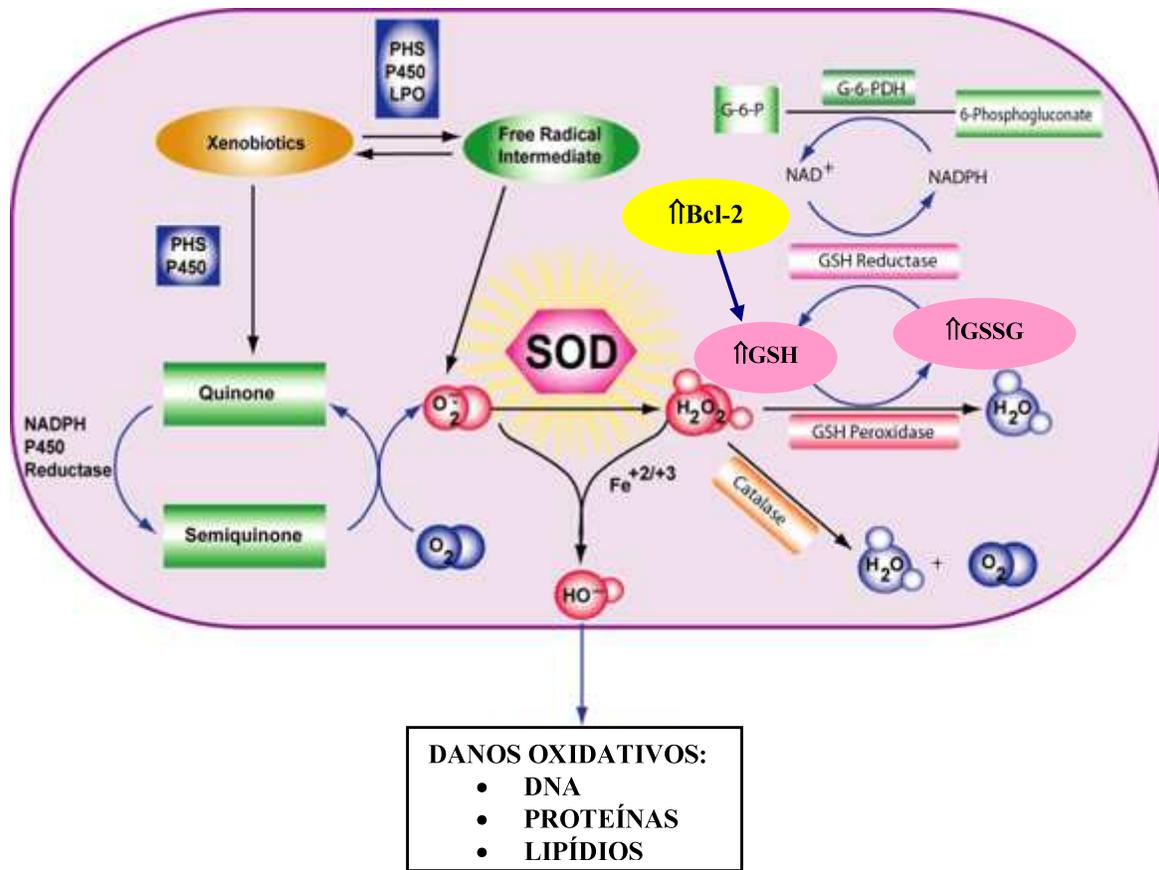


Figura 7. Fontes intracelulares de EROS e principais mecanismos de defesa antioxidante. As maiores fontes produtoras de EROS são: mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana plasmática e citosol. A mitocôndria gera $O_2^{\bullet-}$ durante a respiração, que é convertido a H_2O_2 pela Mn-SOD. No citosol, $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 pela Cu, Zn-SOD. As duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox GSH presente em ambos, no citosol e na mitocôndria e catalase, presente nos peroxissomas. Outras fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem as enzimas xantina oxidase no citosol, NADPH oxidase na membrana plasmática e citocromo P450 no retículo endoplasmático. Bcl-2 pode funcionar como um antioxidante em alguns sistemas apoptóticos induzindo a realocização de GSH no núcleo.

As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, mencionada anteriormente, podem funcionar como um antioxidante em alguns sistemas apoptóticos induzindo a realocização de GSH no núcleo. O óxido nítrico (NO) pode ser produzido no citosol ou na mitocôndria pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Adicionalmente, $TNF\alpha$ pode induzir ativação de NOS, resultando na geração de óxido nítrico. O NO pode reagir com lipídeos de membrana e podem causar mutações no DNA. Além disso, $ONOO^-$ pode induzir peroxidação lipídica e sinalizar a morte celular por apoptose.

II - OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

Estudos anteriores mostraram que a desidrocrotina (DHC) apresenta atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* em pelo menos dois modelos experimentais: Sarcoma 180 (S180), tumor ascítico de Ehrlich (Grynberg *et al.*, 1999; Maciel *et al.*, 2000). Anazetti e colaboradores, (2003; 2004) mostraram que a DHC apresenta efeitos citotóxicos, induzindo morte celular por apoptose em células da leucemia mielóide humana HL60, com envolvimento de estresse oxidativo. Porém, estudos toxicológicos da DHC *in vitro* e *in vivo* evidenciaram efeitos hepatotóxicos significativos e citotóxicos em fibroblastos V79, demonstrando citotoxicidade do tipo basal (inespecífica). Portanto, embora a DHC apresente atividade antitumoral comprovada, sua administração por períodos prolongados pode causar efeitos tóxicos seletivos, tais como lesões hepáticas (Rodriguez & Haun, 1999; Melo, 2000).

Com o intuito de intensificar a eficácia terapêutica da DHC, assim como reduzir os efeitos citotóxicos inespecíficos e hepatotóxicos, este trabalho teve como objetivos gerais, avaliar comparativamente a atividade antitumoral da DHC em células da leucemia humana, utilizando diferentes formulações, ou sistemas de sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como a encapsulamento da DHC em micro/nanoesferas poliméricas de PLGA (ácido poli (L-láctico-co-glicólico)) e complexação em β -ciclodextrinas (β CDs). Este último sistema de liberação utilizando complexação da DHC em β CDs induziu redução significativa na citotoxicidade basal, demonstrada em fibroblastos (células V79) e em hepatócitos de ratos *in vitro* (Corrêa *et al.*, 2005). Portanto, definimos como objetivos para o presente trabalho:

- Desenvolver um sistema polimérico de liberação controlada para a DHC, encapsulando-a em nanopartículas de PLGA, copolímero poli (L-láctico-co-glicólico), que envolve etapas de preparação e de caracterização das nanoesferas poliméricas. Os complexos de inclusão de ciclodextrinas contendo DHC (DHC/BCD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) foram preparados, caracterizados e fornecidos pelo grupo de pesquisa da STQ – Serviços em Tecnologia Química – CIETEC, USP, sob orientação da Profa. Dra. Mariângela M. B. De Azevedo, conforme descrito por Corrêa *et al.*, 2005.
- Comparar a citotoxicidade da DHC em sua forma livre, encapsulada em nanoesferas de PLGA e complexada com β CDs em células da leucemia humana, utilizando como modelos experimentais, as linhagens HL60, U937, K562 e K562 Lucena, comparando os efeitos citotóxicos da DHC livre e de suas formulações em linfócitos humanos.
- Comparar a eficiência na indução de diferenciação e de morte celular por apoptose induzida pela DHC e suas formulações em estudo, assim como investigar os eventos envolvidos nas possíveis vias de sinalização, tais como parada do ciclo celular, ativação de caspases, swelling osmótico da matriz mitocondrial e perda de potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, depleção de glutathiona reduzida (GSH), expressão de proteínas anti-apoptócicas da família Bcl-2, assim como alterações nas concentrações de Ca⁺² intracelular.

Devido aos promissores resultados na redução da citotoxicidade basal e hepatotoxicidade obtidos por Corrêa e colaboradores, (2005) com os complexos de inclusão de β CDs contendo DHC associado às dificuldades encontradas na produção de nanoesferas

poliméricas, os estudos de mecanismos bioquímicos envolvidos na indução de apoptose foram realizados somente com os complexos em ciclodextrinas.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1.1. Preparação das nanopartículas de PLGA contendo desidrocrotolina

A desidrocrotolina (DHC) foi obtida a partir das cascas do caule da *Croton cajucara*, como previamente descrito por Souza Brito e colaboradores (1998). Obteve-se 99% de pureza de DHC, determinada por RMN (ressonância magnética nuclear), UV (ultravioleta), IR (infravermelho) e MS (espectroscopia de massa), conforme Souza-Brito e colaboradores (1998).

As nanoesferas de PLGA (65:35, ácido láctico-co-glicólico) foram preparadas em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Nelson Duran, Laboratório de Química Biológica, IQ, UNICAMP, mais especificamente pelos alunos Sérgio Teixeira e Lucas Frungillo. Todas as preparações foram obtidas em condições estéreis, utilizando o método de precipitação do polímero pré-formado ou também chamado método de emulsificação-difusão associado à evaporação de solvente, com algumas modificações, conforme esquematizado na **figura 8** características (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996, 1998a; Ferdous *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1999).

Inicialmente, água e acetona foram mutuamente saturados por 1 minuto antes do uso

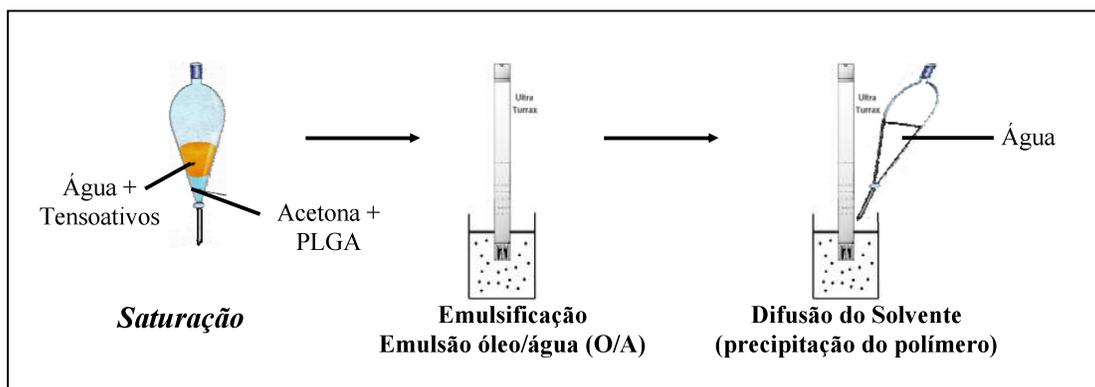


Figura 8. Esquema de preparação das nanoesferas de PLGA contendo DHC utilizando o método de precipitação do polímero pré-formado (método de emulsificação-difusão) associado à evaporação de solvente.

para promover um equilíbrio termodinâmico inicial de ambos os líquidos. Em seguida, 200 mg de PLGA (65:35, massa molar 45.000-75.000 Da) foram dissolvidos em 10 mL de acetona para preparar as nanopartículas vazias. Para a preparação de nanopartículas contendo DHC, 200 mg de PLGA foram dissolvidos em 10 mL de acetona, seguido pela adição de 40 mg de DHC. Esta fase orgânica foi emulsificada com 20 mL de uma solução tensoativa aquosa saturada com acetona (5 % w/v), composta por polivinil álcool de baixa massa molar (PVA 30.000 – 70.000 Da) e Pluronic F68 (copolímero que atua como tensoativo: poli (etileno glicol)-bloco-poli (propileno glicol)-bloco poli (etileno glicol) (copolímero tribloco PEG-PPG-PEG, massa molar 8.400 Da). A emulsão foi preparada com auxílio de um homogeneizador de alta velocidade (Ultra-Turrax) a 8.000 rpm por 10 min. Em seguida, 80 mL de água saturada com acetona foram adicionadas sob agitação à emulsão para induzir a difusão da acetona na fase contínua, promovendo a nanoprecipitação do polímero e portanto, levando a formação das nanopartículas. Para evaporação do solvente orgânico a preparação foi mantida sob agitação magnética por 12 h em condições estéreis. Após evaporação do solvente, o excesso de DHC não adsorvida foi retirado utilizando pelo menos duas lavagens sucessivas com água destilada estéril e centrifugação a 10000 g por 2 h. Inicialmente, a liofilização foi utilizada como método de sacagem, durante a qual a tensão interfacial aumenta devido à retirada súbita de água. Na tentativa de corrigir esse problema, adicionou-se sacarose (1 % w/v), substância crioprotetora, que, assim como o manitol, a glicose e o Pluronic, aumentam a viscosidade do meio (Schaffazick *et al.*, 2003; Quintanar-Guerrero, *et al.*, 1998b). Posteriormente, as partículas foram submetidas à rotaevaporação e manutidas em suspensão, obtendo-se como vantagens maior estabilidade do diâmetro das partículas, aumento significativo no poder de penetração

destas nos testes biológicos, resultando em maior eficácia quanto à toxicidade (Desai *et al.*, 1996; 1997). A desvantagem é a esterilização e armazenagem (Schaffazick *et al.*, 2003b).

III.1.2. Preparação das nanopartículas de PLGA-AE contendo DHC

A síntese do derivado lipofílico do ácido ascórbico (AE - ascorbil éster) foi realizada conforme descrita Stevanović e colaboradores (2007), com algumas modificações. Baseando-se na catálise enzimática de uma reação de esterificação entre o ácido ascórbico e vinil-esterato mediada pela lipase Novozym 435 (Sigma). Para isso, o vinil esterato, doador do radical acila saturado contendo 16 carbonos, foi adicionado em quantidade excessiva. A confirmação da posição da esterificação foi obtida por RMN, dissolvendo-se o produto da reação em DMSO deuterado. As partículas funcionalizadas foram preparadas conforme descrito acima, exceto a preparação da fase orgânica, que foi acrescida de 20mg de Ascorbil-éster.

III.2. Caracterização das partículas contendo desidrocrotina (DHC)

III.2.1. Eficiência de encapsulação da DHC em nanoesferas de PLGA

A determinação da eficiência de encapsulação da DHC em nanoesferas de PLGA foi realizada conforme Kubo e colaboradores, (1991). Inicialmente, 1 mL da preparação suspensa em 10 mL de metanol e centrifugada (Beckman-Coulter, Allegra X22R) durante 10 minutos a 15.000 rpm, obtendo-se precipitação das partículas e dissolução da DHC no sobrenadante. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi dissolvido em 5 mL de metanol e uma alíquota desta solução foi analisada em espectroscopia de UV-vis a 232 nm (Hitachi U-2000). Utilizando-se o coeficiente de extinção molar da DHC (8000 M.cm⁻¹) e com auxílio de uma curva de calibração previamente construída, determinou-se o total de DHC na suspensão (Kubo *et al.*, 1991).

III.2.2. Detecção do ascorbil-éster (AE)

O AE foi detectado por cromatografia de camada delgada em placa de sílica com revelador fluorescente utilizando-se como eluente de corrida o acetato de etil-clorofórmio na proporção de 9:5 (v/v). Como padrões de comparação foram utilizadas soluções de ascorbil-éster livre e partículas poliméricas preparadas sem a adição de ascorbil-éster dissolvidos em acetona PA.

III.2.3. Identificação Físico-Química das partículas

III.2.3.1. Distribuição do tamanho e diâmetro médio das partículas

A distribuição granulométrica das amostras foi determinada por difratometria a laser utilizando um “Laser Sizer” (LS 13320, Malvern), módulo para pó (tornado), que realiza a análise a seco, sem dispersão da amostra em meio líquido (Ré & Biscans, 1999). A média do diâmetro sobre o volume de distribuição $d_{(4,3)}$ foi utilizado como parâmetro de distribuição do tamanho das partículas e o span representa uma medida indireta da dispersão ou da largura da distribuição granulométrica. Estas medidas foram realizadas no Laboratório Tecnologia de Partículas - Instituto de Pesquisas Tecnológicas S.A. – Departamento de Agrupamento de Processos Químicos, cuja pesquisadora responsável é a Dr^a Maria Inês Ré.

III.2.3.2. Potencial Zeta

A carga de superfície, um índice de estabilidade físico-química, foi avaliada através da determinação de potencial zeta (ζ) das nanopartículas. As medidas foram obtidas segundo o método de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) em água deionizada, conforme descrito por Maia e colaboradores (2004). As preparações foram suspensas em água milli-Q, pH 7,4 a 25°C e submetidas ao analisador de potencial zeta (Ré & Biscans, 1999; Amiji & Shenoy, 2005). Estas medidas foram realizadas no

Laboratório de Tecnologia de Partículas -Instituto de Pesquisas Tecnológicas S.A. – Departamento de Agrupamento de Processos Químicos, cuja pesquisadora responsável é a Dr^a Maria Inês Ré. Cada valor representa a média de quinze leituras obtidas (Miglietta *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2004).

III.2.3.3. Morfologia da superfície das partículas

A morfologia da superfície das partículas foi analisada obtendo imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Instituto de Biologia, Laboratório de Microscopia Eletrônica (UNICAMP), sob supervisão da bióloga Adriane Cristina S. Sprogis.

Uma amostra liofilizada de nanopartículas foi colocada em fita dupla face sobre “stubs” de alumínio formando uma camada uniforme de nanopartículas. Em seguida, a amostra foi coberta com ouro utilizando um sistema de cobertura com ouro “sputtering” a uma corrente de 40 mA, pressão de 0,2 mBar por 100 s e espessura de 260 Å. As amostras foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura a 10 kV (Prior *et al.*, 2001; Maia *et al.*, 2004).

III.3. Preparação dos complexos de inclusão β CD, Metil- β CD e Hidroxipropil- β CD contendo DHC

Os complexos de inclusão DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD foram preparados e caracterizados em colaboração com a Dra. Mariângela B.M. De Azevedo, da STQ – Serviços em Tecnologia Química – CIETEC - USP, São Paulo, conforme descrito por Corrêa *et al.*, 2005. As formulações foram preparadas em uma proporção molar de 1:2 de DHC e β CDs (Me β CD e HP β CD) em meio orgânico-aquoso (etanol/água). A DHC e β CDs (1:2) foram dissolvidos em etanol e água, e a mistura agitada por 8 horas a 45°C. Após este período o solvente foi removido sob pressão reduzida em rotaevaporador até a secagem completa. Deixou-se em estufa a 70°C por 3 horas ou até peso constante. A

amostra foi mantida em um dessecador até ser utilizada. A caracterização físico-química dos complexos de inclusão de DHC em β CDs foi determinada utilizando difração de raio-X pó, calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

III.4. Cultura de Células

III.4.1. Cultura de células da leucemia humana (HL60, K562, K562 Lucena e U937)

As linhagens de células de Leucemias Humanas (HL60, K562, K562 Lucena e U937) foram mantidas em cultura permanente, através de repiques periódicos. O cultivo foi realizado em meio RPMI, contendo 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

III.4.2. Cultura primária de linfócitos humanos

As células mononucleares de sangue periférico humano (linfócitos) foram isoladas de sangue venoso de voluntários saudáveis como descrito previamente por Hirano e colaboradores (1989) e tratadas com diferentes concentrações dos complexos de inclusão DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD, na presença e ausência do mitógeno fitohemaglutinina (PHA 5 μ g/mL) por 72 h. Os linfócitos (1×10^6 células/mL) foram cultivados em suspensão em meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 IU de penicilina/mL e 100 mg de estreptomicina/mL, em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37°C.

III.5. Citotoxicidade da DHC e de suas formulações em células leucêmicas e em linfócitos humanos

A avaliação do efeito citotóxico das nanoesferas de PLGA contendo DHC e dos complexos de inclusão entre DHC e β CDs (β -, Me β - e HP β -ciclodextrinas) em células da leucemia HL60, K562, K562 Lucena e U937 foi determinada utilizando ensaios de viabilidade celular que permitem avaliar a função mitocondrial, utilizando a atividade de redução do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium) e/ou a atividade fosfatásica, conforme descrito por Anazetti e colaboradores (2003). Inicialmente, $3,0 \times 10^5$ células/mL foram expostas a diferentes concentrações (0 – 500 μ M) de DHC em sua forma livre, encapsulada em nanoesferas de PLGA ou complexada em β CDs (dissolvidas em meio de cultura RPMI contendo 0,25 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Após o tratamento, as células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 72 horas. Em seguida, foram realizados os ensaios de citotoxicidade.

Quando EROS são produzidas em excesso estabelece-se um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes que leva a depleção da glutathiona (GSH), o mais importante agente antioxidante na detoxicação de xenobióticos e carcinogênicos. Recentes estudos mostraram que a glutathiona reduzida (GSH) pode determinar a regressão de neoplasias malignas induzidas quimicamente *in vitro* e *in vivo*. A única forma de aumentar o estoque da GSH orgânica é a administração de precursores, entre os quais o mais prático e eficiente é a N-acetilcisteína (NAC), que se comporta como agente potencialmente antimutagênico e anticarcinogênico, devido à capacidade de atuar como agente redutor e como substância nucleofílica capaz de conjugar-se a metabólitos e substâncias eletrofílicas. Entretanto, agentes depletors de GSH, tal como o dietil maleato (DEM),

pode induzir um aumento na progressão do tumor, sugerindo que níveis suficientes da GSH previnem a formação do tumor.

A depleção de GSH pode ser causada por diferentes alterações bioquímicas e patológicas, incluindo swelling e disfunção mitocondrial (Jain *et al.*, 1991; Heales *et al.*, 1995, 1996; Slater *et al.*, 1995). Com o intuito de analisar o papel da GSH no estresse oxidativo induzido pela DHC livre e complexada em β CDs, $3,0 \times 10^5$ células da leucemia humana foram pré-incubadas por 1 h, na presença e ausência de $1 \mu\text{M}$ de ciclosporina A (CsA) e/ou antioxidantes (GSH 1mM ; NAC 1mM e GSH $500\mu\text{M}$ associado ao NAC $500\mu\text{M}$), assim como depletor de GSH, DEM $100\mu\text{M}$ a 37°C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , durante 72 horas. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de DHC, nas formas livre e complexada (dissolvidas em meio de cultura contendo 0,25% de dimetilsulfóxido).

Após este período, foi realizado o teste de redução do MTT, que avalia a viabilidade celular segundo o funcionamento mitocondrial como descrito por Anazetti e colaboradores (2003).

A viabilidade de linfócitos humanos foi determinada após tratamento com diferentes concentrações de DHC em sua forma livre e complexada com β CDs ($0 - 1000 \mu\text{M}$) durante 72 h, seguido dos ensaios de redução do MTT e atividade fosfatásica (Anazetti *et al.*, 2003).

III.5.1. Redução do MTT

Para avaliação da capacidade de redução do MTT após tratamentos por 72 h, o meio de cultura foi cuidadosamente removido, seguido pela adição de $0,5 \text{ mg}$ de MTT/mL de meio RPMI e incubação das células a 37°C durante 4h. Em seguida, o formazan, produto da reação, foi solubilizado em $0,1 \text{ mL}$ de etanol. A leitura de absorbância foi

obtida utilizando um ELISA a 570 nm. Controles contendo a mesma concentração de dimetilsulfóxido (DMSO) (0,25%) foram considerados como 100% de viabilidade celular (Denizot & Lang, 1986).

III.5.2. Atividade Fosfatásica

A atividade fosfatásica foi medida após retirada do meio de cultura e adição de 150 μ L do substrato p-nitrofenilfosfato (pNPP), 75 mM em tampão acetato 0,001 M pH 5,5. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C durante por 30 min e a reação foi paralisada com adição de 150 μ L de NaOH 1 M. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 405 nm.

III.6. Atividade antitumoral da DHC e de seus complexos de inclusão em β -CDs

Para avaliação da atividade antitumoral da DHC e de seus complexos de inclusão em ciclodextrinas, comparativamente, foram analisados a eficácia na indução de diferenciação, morte e/ou parada do ciclo celular. Inicialmente, para cada análise, 3 x 10⁵ células da leucemia (HL60, K562, K562 Lucena e U937)/mL de meio de cultura RPMI foram tratadas com concentrações próximas ao IC₅₀, dos complexos de inclusão entre DHC e β CD, Me β CD e HP β CD (150, 250 e 400 μ M) e da DHC em sua forma livre (150, 250 μ M) por diferentes períodos de exposição, variando entre 12, 24, 48 e 72 h. Para as análises de indução de morte celular por apoptose, as células foram pré-incubadas por 1 h na presença e ausência de 1 μ M de ciclosporina A (CsA), um inibidor da formação de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTP), conforme descrito por Schneider & Hogeboom (1950) com algumas modificações.

III.6.1. Diferenciação celular em células da leucemia

III.6.1.1. Atividade de redução do NBT

A avaliação de indução de diferenciação celular pelos complexos de inclusão em estudo foi determinada através da medida da atividade de redução do NBT (nitro blue tetrazolium) sob estimulação pelo TPA (12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato), conforme Sakashita e colaboradores (1991); Kohroki e colaboradores (1998), com algumas modificações. Inicialmente, após o tratamento $1,0 \times 10^6$ células foram centrifugadas a 350 g e resuspensas em 0,5 mL de meio RPMI contendo 10 % de SFB. À suspensão celular foi adicionado 0,5 mL de uma solução composta pela mistura de 200 mg de TPA – 1 mg de NBT/mL de tampão PBS, seguido da incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ por, no mínimo, 30 minutos. Após centrifugação a 350 g, 0,6 mL de etanol foram adicionados ao sedimento, solubilizando o formazan precipitado (NBD), produto da redução do NBT. A quantidade de NBD formado foi determinada após leitura da absorbância a 560 nm.

III.6.1.2. Marcadores de diferenciação celular: monócitos (CD14) e granulócitos (CD66b)

Para determinação dos tipos celulares diferenciados após exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre e complexada em ciclodextrinas, durante 12, 24, 48 e 72 h, utilizamos os marcadores CD14 e CD66b. Após o período de tratamento, $1,0 \times 10^6$ células/mL foram centrifugadas a 350 g e ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI contendo 10 % de SFB, seguido da adição de 20µL do anticorpo (CD66b e/ou CD14) conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). As células foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP) utilizando comprimento de onda de

excitação de 530 nm. Os dados foram obtidos utilizando o software CellQuest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI versão 2.8.

III.6.2. Morte celular por apoptose em células da leucemia

III.6.2.1. Marcação com anexina V-FITC/PI

Células apoptóticas foram detectadas utilizando dupla marcação com Anexina V – FITC/PI (iodeto de propídeo). Em função da alta afinidade e especificidade da anexina V à fosfatidilserina (PS), esta proteína pode é utilizada como marcador sensível para detecção de células em apoptose, que sofrem, dentre outros eventos iniciais externalização de PS, característica deste processo de morte celular. Após o período de tratamento, as células foram submetidas à lavagem em tampão de ligação (Hepes/NaOH 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; MgCl₂ 1 mM e CaCl₂1,8mM), e ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação contendo anexina V – FITC na diluição apropriada (1:500) e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, 400 µL de tampão de ligação foi adicionado, juntamente com 40 µL de uma solução de 100µg de PI/mL de tampão de ligação. As células foram imediatamente analisadas utilizando citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP) em comprimento de onda de excitação de 488 nm (para o PI) e 530 nm (para o FITC). Os dados foram obtidos utilizando o software CellQuest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI versão 2.8.

III.6.2.2. Conteúdo de DNA e Análise do Ciclo Celular

O conteúdo de DNA celular, determinado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo (PI), nos permite analisar a fragmentação de DNA. Este ensaio foi

realizado conforme Nicoletti e colaboradores (1991) e Ito e colaboradores (2003, 2004 a,b). Após o período de tratamento, $2,0 \times 10^6$ células foram lavadas com PBS e centrifugadas 200 g. O sedimento foi ressuspensão em solução hipotônica contendo o corante PI (PI 50 $\mu\text{g/mL}$, citrato de sódio 1 mg/mL , Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM , 10 % (v/v) de Triton X-100 e EDTA 1 mM), seguido por incubação a 4 °C por 24 h. O conteúdo de DNA foi analisado em citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares - Hemocentro-UNICAMP), utilizando o programa CellQuest para aquisição dos 10.000 eventos. A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o programa de análise celular ModIFIT LT 3.0 (Becton Dickinson). Os comprimentos de onda utilizados foram de 488 nm (excitação) e 620-700 nm (detecção de emissão).

III.6.2.3. Detecção de p21/WAF-1

Para dosagem de p21/WAF-1 em lisados celulares foi utilizado o p21/WAF-1 ELISA Kit (Calbiochem, Germany). A metodologia foi realizada conforme recomendações do fabricante após tratamentos descritos acima. As células foram lavadas com PBS gelado e o sedimento ressuspensão a $5,0 \times 10^6$ células/mL em tampão de ressuspensão (Tris 50mM, contendo EDTA 5mM, PMSF 0,2mM, 1 μg de pepstatina/mL, e 0,5 μg de leupeptina/mL, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 20 μL de agente extrator de antígeno para cada 100 μL de suspensão celular e as células foram mantidas no gelo durante 30 minutos sob agitação periódica durante este intervalo. Os extratos celulares foram centrifugados a 350 g por 5 minutos e congelados a -80°C até o momento da análise, quando foram diluídos em solução diluente 1:5. O primeiro passo do ELISA refere-se à adição do detector de anticorpo, seguido dos extratos celulares e padrões de concentrações de p21/WAF-1 conhecidas. Após incubação por 2h em temperatura

ambiente, as amostras foram lavadas por três vezes e adicionado a estas o conjugado anticorpo-enzima, incubando-as por 30 minutos a temperatura ambiente e novamente as amostras foram lavadas três vezes. Em seguida, foi adicionado o substrato específico, seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica foi medida a 485 nm, com correção de imperfeições ópticas na placa para 540 nm. Os resultados foram expressos em relação à curva padrão pré-determinada em unidades de p21/WAF-1/mL.

III.6.2.4. Atividade de Caspases-2, -3, -6, -8 e -9.

As medidas diretas da atividade de caspases foram feitas utilizando kits colorimétricos de determinação de proteases (R&D Systems, USA), conforme recomendações do fabricante, após tratamentos descritos anteriormente. Este ensaio baseia-se na detecção espectrofotométrica do cromóforo p-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, sendo que X corresponde a seqüências de aminoácidos reconhecidas por caspases específicas, tais como VDVAD, DEVD, VEID, IETD e LEHID para caspases 2, 3, 6, 8 e 9, respectivamente. Conforme a metodologia, $2,0 \times 10^6$ células foram centrifugadas a 350 g e lisadas utilizando baixas temperaturas (2 a 8 °C). A concentração de proteínas no lisado foi medida utilizando método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, USA), sendo que 200 µg de proteínas foram incubadas com cada substrato X-pNA (concentração final de 200 µM) a 37°C por 4 h em uma placa de 96 cavidades. A densidade óptica das amostras foi medida a 405 nm. O aumento na atividade de caspases foi determinado comparando os resultados de células tratadas em relação aos controles (atividade relativa).

III.6.2.5. Liberação de citocromo c

As medidas de citocromo c humano em lisados celulares foram feitas utilizando o Quantikine Cytochrome c Immunoassay (ELISA sandwich da R&D Systems, USA). A metodologia foi realizada conforme recomendações do fabricante após tratamentos descritos acima. As células foram lavadas com PBS gelado por três vezes. O sedimento foi ressuspensão a $1,5 \times 10^6$ células/mL em tampão de lise, que solubiliza o citocromo c no citosol e na mitocôndria durante a incubação por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 1000 g por 15 minutos e o sobrenadante 5 vezes diluído e estocado a -70°C , em tampão de diluição para proteínas (RD5P). Em cada cavidade da placa de pré-revestida com o anticorpo monoclonal específico para citocromo c, foi adicionado tampão de diluição RD5P, padrões ou extratos celulares, seguidos de incubação por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, foi aspirado o conteúdo de cada cavidade e estas foram 4 vezes lavadas com tampão de lavagem. Após as lavagens, o citocromo c conjugado foi adicionado e incubado por 2 h a temperatura ambiente. As etapas de lavagens foram repetidas seguidas pela adição da solução de substrato e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi paralizada com adição de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica (DO) de foi medida a 450 nm, com correção de imperfeições ópticas na placa para 540 ou 570 nm. Os resultados foram dados em DO, relativa à curva padrão pré-determinada.

III.6.2.6. Determinação de Bcl-2

Para detecção de Bcl-2 humano em lisados celulares foi utilizado o Bcl-2 ELISA Kit (Calbiochem, Germany). A metodologia foi realizada conforme recomendações do fabricante após tratamentos descritos acima. As células foram lavadas com PBS gelado e o sedimento foi ressuspensão a 5×10^6 células/mL em tampão de ressuspensão (Tris

50mM, contendo EDTA 5mM, PMSF 0,2mM, 1µg de pepstatina/mL, e 0,5 µg de leupeptina /mL, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados 20 µL de agente extrator de antígeno para cada 100µL de suspensão celular e as amostras foram mantidas no gelo durante 30 minutos, sendo ocasionalmente agitadas. Os extratos celulares foram centrifugados a 350 g por 5 minutos e congelados a -80°C até o momento da análise, quando foram diluídos em solução diluente 1:5. O primeiro passo do ELISA refere-se à adição do detector de anticorpo, seguido dos extratos celulares e padrões de concentrações de bcl-2 conhecidas. Após incubação por 2h em temperatura ambiente, foram realizadas três lavagens e adição do conjugado anticorpo-enzima, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente as amostras foram lavadas por três vezes, seguida da adição do substrato específico e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A densidade óptica foi medida a 450 nm, com correção de imperfeições ópticas na placa para 540 nm. Os resultados foram expressos em relação à curva padrão pré-determinada em unidades de Bcl-2/mL.

III.6.2.7. Medida de Cálcio (Ca^{2+}) intracelular

A determinação do nível de Cálcio (Ca^{2+}) intracelular foi realizada conforme descrito por Burchiel e colaboradores (2000), com algumas modificações. Após cada período de tratamento $1,0 \times 10^6$ células/mL foram incubadas por 90 minutos em meio de cultura RPMI contendo o éster Fura-2-acetoximetil (AM) 5µM a 4°C em câmara escura. Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP) utilizando comprimento de onda de excitação de 472 nm e de emissão de 637 nm (vermelho, para Fura-2). Os dados foram obtidos utilizando o software Cell Quest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de

10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI versão 2.8.

III.6.2.8. “Swelling” mitocondrial

Para detecção de entumescimento (“swelling”) mitocondrial, as mitocôndrias foram isoladas de células HL60 após os tratamentos descritos anteriormente. As células foram centrifugadas a 12100 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi resuspenso em solução de sacarose 250 mM contendo EGTA 0,3 mM tamponada com HEPES 1,0 mM e em seguida centrifugado nas mesmas condições descritas. O sedimento foi resuspenso em solução de sacarose 250 mM, obtendo uma suspensão mitocondrial com concentração de 100 µg de proteína/mL, determinada pelo método de Bradford. O entumescimento mitocondrial foi determinado conforme descrito por Araragi e colaboradores (2003) com algumas modificações. As mitocôndrias foram resuspensas em tampão CFS (manitol 220 mM; sacarose 68 mM; NaCl 2 mM; KH₂PO₄ 5 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES-NaOH 10 mM, pH 7,4; succinato 5 mM; rotenona 2 µM). A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 520 nm em 15 minutos a 25°C. Uma redução da absorbância é consistente com um aumento no entumescimento mitocondrial (Araragi *et al.*, 2003).

III.6.2.9. Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizado o kit MitoScreen BD™, que consiste na aplicação do fluorocromo lipofílico catiônico, JC-1 (iodeto 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina) para citometria de fluxo. Este corante penetra nas células e sua fluorescência é uma reflexão do $\Delta\psi_m$. Inicialmente, as células da leucemia foram previamente tratadas conforme descrito acima. Após este período, $1,0 \times 10^6$ células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos, temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado,

enquanto o sedimento foi resuspenso em 0,5 mL de uma solução corante contendo 1 % de JC-1 (2,5 µg/mL) em tampão para citometria (tampão de ensaio) fornecido pelo kit, sob agitação. Em seguida, as células foram incubadas por 10-15 min a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e subseqüentemente lavadas 2 vezes com tampão de ensaio. Após as lavagens, as células foram submetidas à análise em citômetro de fluxo FACS Calibur (Laboratório de Marcadores Celulares-Hemocentro-UNICAMP). A fluorescência de emissão utilizada foi de 530 nm (atribuída aos monômeros de JC-1, que indicam perda de potencial de membrana mitocondrial) e a de excitação foi de 585 a 650 nm (atribuída aos agregados de JC-1, correspondentes às mitocôndrias polarizadas). Os dados foram obtidos utilizando o software CellQuest, versão 3.3 (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI versão 2.8.

III.6.2.10. Determinação de GSH total

A concentração de GSH em células da leucemia foi determinada utilizando o reativo de Elmann, DTNB (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico-DTNB em citrato trissódico 1%), conforme descrito por Torsoni e colaboradores (1998), com algumas modificações (Anazetti *et al.*, 2004). Após o período de exposição, $5,0 \times 10^6$ células foram lavadas com solução fisiológica e lisadas com 2,0 mL de água. A 2,0 mL do lisado foi adicionado 3,0 mL de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl em 100 mL de água q.s.p.). Após 5 minutos, esta mistura foi centrifugada a 350 x g por 5 minutos e 0,4 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,6 mL do meio de reação (tampão Na₂HPO₄ 0,2 M, pH 8,0, contendo DTNB 0,5 mM, dissolvido em citrato de sódio 1 %). A reação da GSH com o DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela, cuja leitura de absorvância foi

realizada a 412 nm (Beutler *et al.*, 1963). A concentração de GSH foi calculada utilizando seu coeficiente de extinção $\epsilon = 13,6 \text{ mM}$ (Torsoni *et al.*, 1998). A concentração de GSH é dada em $\text{nmol}/10^6$ células viáveis, determinadas pela contagem utilizando o corante de exclusão de viabilidade celular, azul de tripan. Células que captaram azul de tripan foram consideradas com perda de GSH (Xu and Thornalley, 2001).

III.7. Análise estatística

Cada experimento foi realizado pelo menos três vezes (quatro replicatas cada) e os resultados foram expressos como porcentagens (média \pm SD) dos controles, em relação aos ensaios de citotoxicidade. Para as análises estatísticas foram utilizados teste de uma via ANOVA ou teste-t de Student, calculado pelo programa Origin versão 7.0. Uma probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Caracterização das partículas de PLGA contendo desidrocrotonina (DHC)

O controle da liberação de fármacos através da utilização de vetores capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem de substâncias tem sido uma área de intensa pesquisa na última década. Dentre os vetores empregados, estão os sistemas coloidais constituídos por lipossomas e micro/nanopartículas poliméricas têm se mostrado uma forma promissora de liberação controlada de fármacos (Schaffazick *et al.*, 2003). Atenção especial tem sido direcionada ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos parenterais como formulações potenciais para liberação de fármacos sítio-específicos, no que consiste o principal objetivo em se tratando de vetorização de antitumorais, como a DHC, por exemplo. (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

As partículas de PLGA contendo DHC foram preparadas pelo método de precipitação do polímero pré-formado por emulsificação/difusão espontânea, seguida pela evaporação de solvente (Ferdous *et al.*, 1998); Murakami *et al.*, (1999), com algumas modificações conforme descrito por Quintanar-Guerrero e colaboradores (1996, 1998a). A metodologia proposta envolve uma seqüência de fenômenos interfaciais complexos, nos quais as concentrações de estabilizantes (tensoativos) apresentam um papel importante durante a formação das partículas. Trabalhos anteriores sugerem um mecanismo para a formação das nanopartículas utilizando a metodologia adotada, conforme esquematizado na **figura 9** (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). Após a saturação mútua das fases aquosa, contendo os tensoativos PVA e Pluronic F68 e oleosa, contendo PLGA e DHC em acetona, os líquidos entraram em um estado de equilíbrio termodinâmico (**Figura 9 (a)**). A agitação causou dispersão da solução oleosa sob a forma de glóbulos em equilíbrio com a fase contínua

(aquosa). Nessa etapa os tensoativos foram adsorvidos em uma ampla área interfacial (**Figura 9 (b)**). A formação da emulsão óleo/água foi possível, pois solventes miscíveis em água (acetona, por exemplo) emulsificam espontaneamente em água durante processos de nanoprecipitação (Fessi *et al.*, 1989; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Adição de água ao sistema (**Figura 9 (c)**) desestabiliza o equilíbrio, causando a difusão da acetona à fase externa. Durante esse processo de transporte, novos glóbulos da ordem nanométrica foram produzidos e estes gradualmente perderam a acetona (**Figura 9 (d)**). Segundo Quintanar-Guerrero e colaboradores (1996), a turbulência interfacial gerada durante a difusão

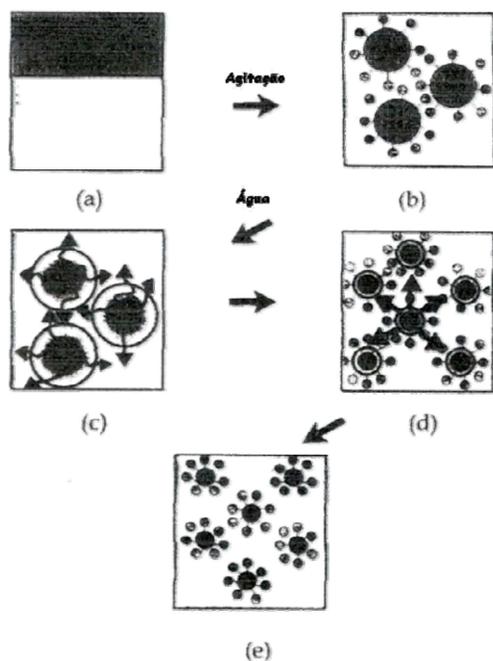


Figura 9. Descrição esquemática do mecanismo de formação das nanopartículas de PLGA proposto pela metodologia de emulsificação-difusão.

contribui com a redução do tamanho dos glóbulos. Dumitriu e colaboradores (2002) sugerem que a estabilidade das gotas pode ser alterada pela difusão, colidindo e coalescendo entre si. Portanto, os tensoativos permanecendo na interface líquido-líquido durante o processo de difusão e mantendo seu efeito protetor adequado, propicia a formação das partículas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996) (**Figura 9 (e)**).

A estabilidade físico-química de partículas têm sido um dos principais problemas tecnológicos a serem superados no desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos. Dentre as

limitações pode-se citar a tendência à agregação das partículas e estabilidade química do polímero e do fármaco (Magenheim & Benita, 1991). Várias alternativas estão em estudo na tentativa de contornar estes obstáculos. Dentre estas, destacam-se a otimização dos

componentes da formulação e os processos de secagem, tal como a liofilização (Roy *et al.*, 1997; Schaffazick *et al.*, 2003; Beck, 2005). Os métodos de secagem têm como objetivo obter formulações farmacêuticas sólidas, que permitem maior conveniência na administração do fármaco, precisão na dosagem, estabilidade físico-química, microbiológica, entre outras (Muller *et al.*, 2001; Beck, 2005).

As nanopartículas constituem sistemas coloidais de grande importância tecnológica. Porém, a instabilidade termodinâmica requer análise precisa do estado físico-químico das preparações e controle rigoroso de sua estabilidade durante o armazenamento. Ambos os critérios são cruciais para futuras aplicações em sistemas de longa duração. Partículas com “alta estabilidade físico-química” consiste em um sistema que apresenta determinadas características, tais como: distribuição homogênea de tamanho médio, baixa tendência à agregação ao longo do tempo, valores relativamente altos de potencial zeta (em módulo), assim como estabilidade físico-química, tanto do polímero, quanto do fármaco, não interferindo na atividade farmacológica desejável ou na liberação controlada do mesmo a partir da matriz polimérica.

As partículas são obtidas como suspensões coloidais aquosas, que em geral passam por um processo de secagem. Portanto a preparação e o tempo de armazenamento podem provocar a agregação de partículas e alterar a estabilidade físico-química, o que pode ser minimizado através da adição de um crioprotetor ou lioprotetor durante a desidratação por sublimação (liofilização). Geralmente utiliza-se um carboidrato tal como a sacarose, que foi adicionada nas preparações. Em função da natureza coloidal das partículas, encontramos dificuldades técnicas quanto à caracterização físico-química das preparações. Tal caracterização inclui a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho das partículas, a determinação do potencial zeta e a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento. Esta

última avaliação refere-se à análise física e química das partículas após diferentes tempos de armazenamento, utilizando as mesmas técnicas de caracterização citadas acima (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

Inicialmente, preparou-se nanopartículas de PLGA (50:50), poli (L-láctico-co-glicólico) e, como parte das perspectivas do presente estudo as partículas foram preparadas utilizando PLGA (65:35) com maior proporção de ácido láctico em relação ao glicólico, com objetivo de aumentar o tempo de degradação, prolongando o tempo de liberação da DHC. A **tabela 1** mostra a obtenção de alta eficiência de encapsulamento, provavelmente em função da utilização das preparações em suspensão, que impede a perda de DHC nas centrifugações de lavagem.

Tabela 1. Eficiência de encapsulamento das nanopartículas de PLGA e PLGA-AE contendo DHC

Partícula	Eficiência de encapsulamento
DHC-PLGA	85±4%
DHC-PLGA-AE	88 ± 2%

A **tabela 2** mostra as propriedades físico-químicas analisadas nas nanopartículas obtidas, tais como, diâmetro médio das partículas e potencial zeta (ζ). As preparações de micro/nanopartículas de PLGA e PLGA/DHC obtidas apresentaram diâmetro 390 nm e 310 nm, com span (índice de polidispersão) de 0,70 e 0,32, respectivamente. Portanto, as partículas apresentaram-se como nanoesferas.

O índice de polidispersão consiste em uma medida indireta da uniformidade da amostra em relação ao diâmetro médio, diretamente proporcional à faixa de variação de tamanho das partículas ou distribuição granulométrica.

Tabela 2. Caracterização físico-química de nanoesferas de PLGA contendo DHC.

Span: medida indireta da dispersão ou da largura da distribuição granulométrica = $[(d(v,0,9) - d(v,0,1)) / d(v,0,5)] d(4,3)$: diâmetro médio em volume (μm).

$d(v,0,1)$: diâmetro da partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada.

Formulações	Proporção PLGA:DHC	Potencial Zeta (ζ) (mV)	$d_{(4,3)}$	Faixa de diâmetros das nanoesferas			Span
				$d_{(v,0,5)}$	$d_{(v,0,1)}$	$d_{(v,0,9)}$	
PLGA	1:0	-33,10 \pm 4,6	0,29	0,27	0,67	0,86	0,70
PLGA/DHC	10:1	-36,80 \pm 1,8	0,31	0,28	0,71	0,80	0,32

$d(v,0,5)$: diâmetro da partícula correspondente a 50% da distribuição acumulada.

$d(v,0,9)$: diâmetro de partícula correspondente a 90% da distribuição acumulada.

A composição quali-quantitativa (concentração de tensoativos e do polímero), o método de preparação (velocidade de agitação), a concentração de fármaco, polímero e tensoativos são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas. De acordo com os resultados obtidos quanto às medidas de tamanho e uniformidade das partículas, podemos sugerir que a redução da proporção polímero: fármaco e da concentração de tensoativos, assim como, o aumento na velocidade de agitação utilizada no ultra-turrax influenciou na obtenção de nanopartículas com diâmetro médio menor e mais homogêneas, possivelmente por induzir rápida difusão da acetona através da interface, produzindo a emulsão oleo/água, conforme proposto acima (Ferdous *et al.*, 1998; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996; 1998; Molceperes *et al.*, 2000; Vandervoort & Ludwig, 2001; Schaffazick *et al.*, 2003).

A **tabela 3** mostra a relação entre o volume da suspensão e o potencial zeta das nanopartículas. Comparando as nanoesferas de PLGA e PLGA-AE, observam-se diferenças

Tabela 3: Influência do volume da suspensão no potencial Zeta (mV)

% de H ₂ O na suspensão final	PLGA	PLGA-AE	PLGA-DHC	PLGA-DHC-AE
100	-28,4 \pm 2,097	-34,5 \pm 3,051	-26,3 \pm 2,064	-27 \pm 2,114
50	-28,5 \pm 2,205	-35,8 \pm 2,829	-27 \pm 2,117	-25,4 \pm 2,356
25	-27,8 \pm 1,797	-30,5 \pm 2,176	-19,9 \pm 1,562	-28,8 \pm 1,859
10	-26,9 \pm 2,154	-29,7 \pm 2,176	-16,6 \pm 1,284	-28 \pm 2,456
5	-26,5 \pm 1,52	-28,5 \pm 1,85	-16,8 \pm 2,268	-28,5 \pm 3,577

de carga superficial devido à incorporação do derivado lipofílico na superfície externa quando o volume da suspensão é reduzido para 25% (**tabela 3** e **figura 10**). Esse efeito pode ser explicado pela incorporação da DHC na superfície externa das partículas. Porém, não se pode afirmar que o AE foi incorporado na superfície externa. Para a detecção do AE fisicamente, deve-se utilizar microscopia eletrônica de transmissão, pois a metalização com tetróxido de ósmio revela as duplas ligações da cabeça polar do ascorbil-éster.

Conforme se observa na **tabela 3**, houve redução do potencial Zeta, em módulo, com a redução do volume da suspensão, o que se deve à presença do surfactante Pluronic concentrado na superfície externa induzindo redução da carga superficial devido a sua natureza não-iônica. Além disso, a presença do tensoativo pode promover estabilização na

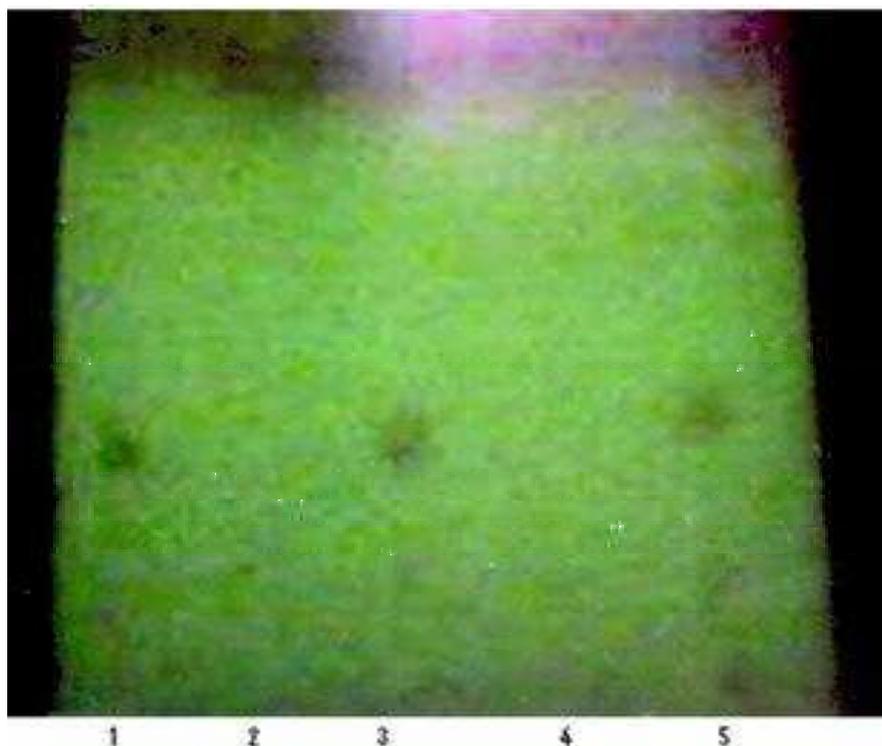


Figura 10. Detecção do ascorbil-éster (AE) remanescente nas partículas por cromatografia de camada delgada: 1- AE livre; 2-partículas sem DHC e sem AE; 3- partículas sem DHC com AE; 4- partículas com DHC e sem AE; 5- partículas com DHC e com AE. O eluente de corrida foi padronizado para obter máximo de retenção de AE e de eluição do polímero e da DHC. Fator de retenção do AE detectado nas preparações (R_f) = 0,431.

estocagem da suspensão por longos períodos sem alterações no tamanho das partículas devido à coalescência (Maia *et al.*, 2004).

A tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas suspensas em função do tempo pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (Guterres *et al.*, 1995, 2000; Calvo *et al.*, 1996; Molpeceres *et al.*, 1997; Schaffazick *et al.*, 2003). De acordo com Panyam e colaboradores (2003), o comportamento dos sistemas de liberação são dependentes da taxa de degradação do polímero. Segundo Soppimath e colaboradores (2001), a liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores: a) Dessorção do fármaco da superfície das partículas; b) Difusão do fármaco através da matriz polimérica; c) Erosão da matriz polimérica ou d) Combinação dos processos de difusão e erosão. Estes autores relatam que durante a fase inicial, a liberação do agente terapêutico adsorvido ocorre principalmente através de sua difusão na matriz polimérica, enquanto, durante a fase final, a liberação é mediada por ambos, difusão do agente terapêutico pela matriz polimérica e degradação da mesma. Desta forma, propõe-se que a degradação do PLGA ocorra através de um processo autocatalítico de suas ligações éster (Panyam *et al.*, 2003). Os grupos carboxílicos terminais presentes nas cadeias de PLGA aumentam em número durante o processo de biodegradação conforme as cadeias sejam clivadas (Jain, 2000). Vários fatores, incluindo a morfologia, composição, hidrofobicidade/hidrofilicidade e massa molar do polímero, assim como a presença de outros aditivos, mostraram afetar a taxa de degradação da matriz polimérica (Panyam *et al.*, 2003). Portanto, a análise da associação e liberação da DHC a partir das nanopartículas ao longo do tempo deve constituir parte da continuidade deste estudo.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (Mosqueira *et al.*, 2000). As preparações de nanoesferas de PLGA e PLGA/DHC obtidas não sofreram alterações significativas quanto ao valor, em módulo, do potencial zeta, após 6 meses de armazenamento (para nanopartículas de PLGA e PLGA/DHC antes e depois do armazenamento, -32 e -25 mV e -33 e -24 mV, respectivamente). O valor de potencial zeta, em módulo, é diretamente proporcional à estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Schaffazick *et al.*, 2003). Os polaxamers (copolímeros de óxidos de etileno e propileno), como o pluronic, e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Especialmente os poliésteres, como o PLA e lecitinas fornecem um potencial zeta negativo à interface, enquanto os polaxamers (tensoativos não-iônicos) tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (Legrand *et al.*, 1999). Desta forma, podemos sugerir que as preparações apresentaram características físico-químicas representativas de partículas estáveis com baixa tendência a agregação entre as mesmas. Em relação aos processos de evaporação do solvente, pode-se observar que o processo de rotaevaporação não provoca diferenças significativas no diâmetro médio das partículas, pois a redução do volume da suspensão induz aumento na concentração de tensoativo na amostra, formando-se uma matriz amorfa ao redor das partículas, que impedem agregação, conforme mostrado na **tabela 4**. Consequentemente, não há formação de grandes partículas por coalescência.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) complementa as informações sobre as características físico-químicas em relação à morfologia de superfície e ao tamanho das nanopartículas (Jeon *et al.*, 2000). As micrografias eletrônicas apresentadas na **figura 11 ((a-k)) e 12**, mostram o padrão esférico e o tamanho nanométrico médio das nanoesferas obtidas utilizando o processo de liofilização como secagem.

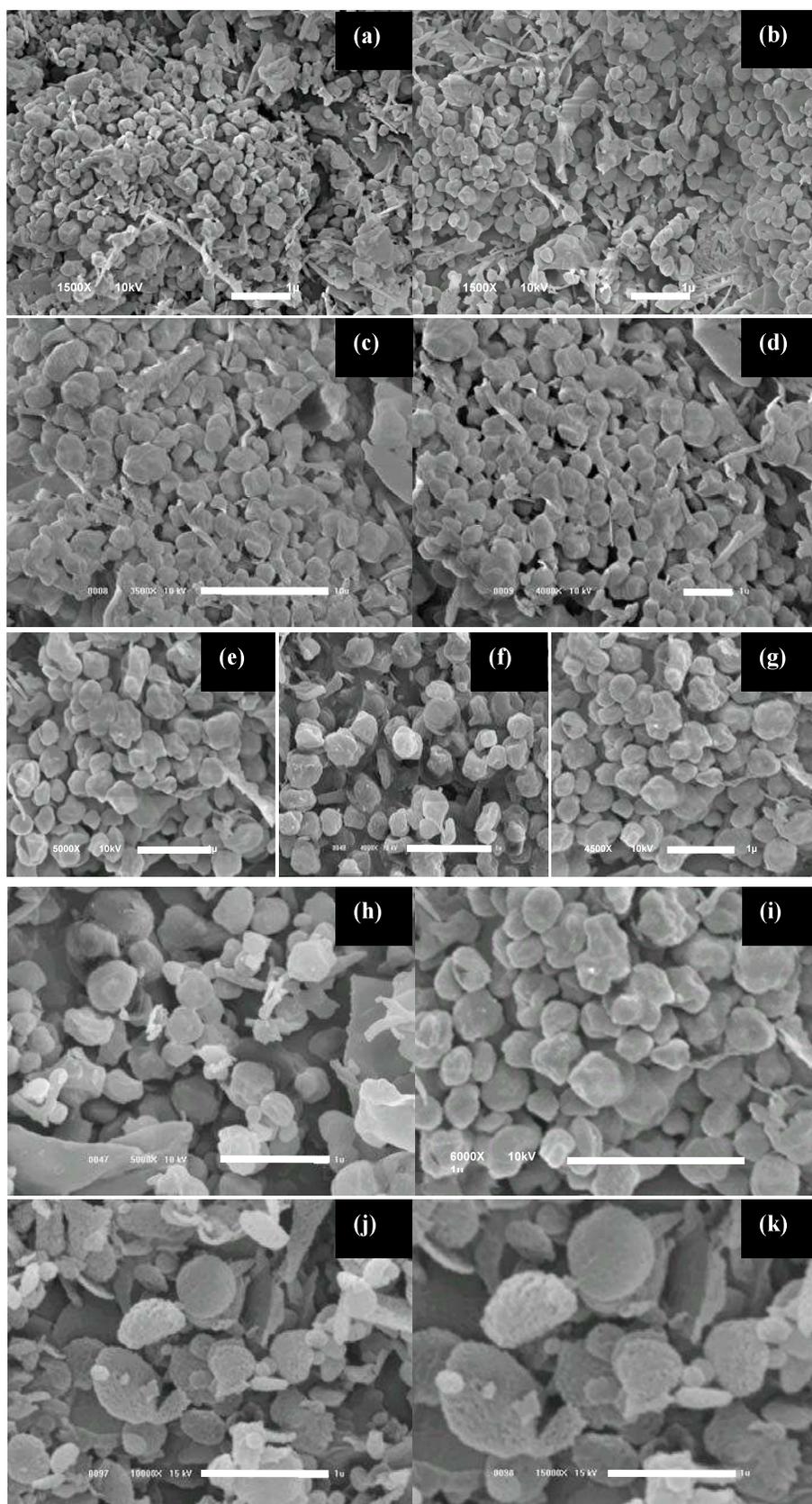


Figura 11. Imagens de Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) mostrando a morfologia de superfície das nanoesferas **(a, c)** de PLGA, **(b, d-k)** de PLGA contendo DHC, (1.500, 3.500, 4.000, 5.000, 10.000 e 15.000 x). A barra horizontal indica 10 ou 1 μ m.

Nas primeiras preparações, obtivemos micropartículas com forte tendência à agregação, utilizando como tensoativo, apenas o PVA de alta massa molar (127.000 Da), quanto o PVA (127.000 Da e ou/ 30.000-70.000 Da) associado ao polaxamer (Pluronic® F68, copolímero tribloco PEG-PPG-PEG, massa molar 8.400 Da). Durante a padronização da metodologia de preparação das partículas, obtivemos redução significativa na formação de agregados, como mostra as **figuras 11 ((a-k)) e 12**, portanto a dispersão coloidal ficou mais homogênea.

Morfologicamente, foram obtidas partículas discretas e esféricas com diâmetro da ordem de 300 nanômetros. Podemos sugerir que a redução no tamanho médio das partículas e maior uniformidade na distribuição de tamanho das mesmas devem-se à utilização de a alta velocidade de agitação (ultra-rotação) e redução em 68 % na concentração de estabilizantes tensoativos na fase aquosa (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996).

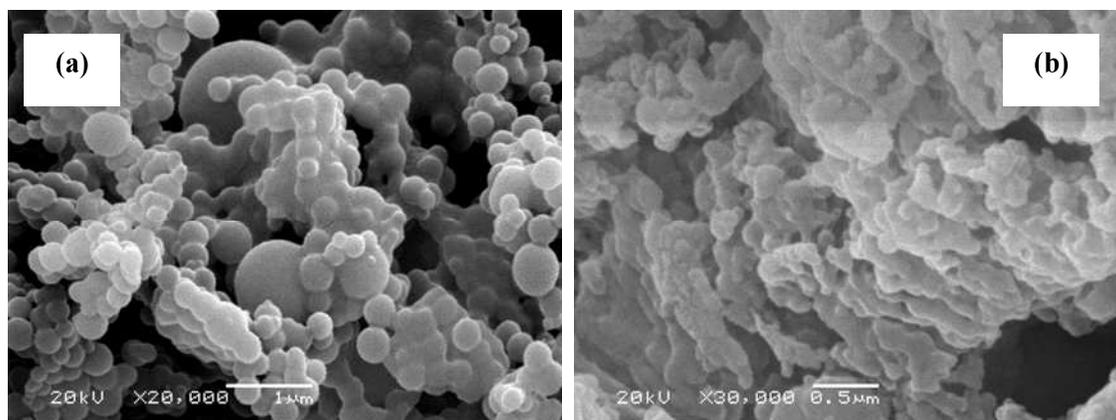


Figura 12. Imagens de Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) mostrando a morfologia de superfície das nanoesferas de PLGA contendo DHC **(a)** antes da liofilização e **(b)** agregação das partículas após processo de liofilização. (15.000 x).

Tabela 4. Influência do volume da suspensão na distribuição de tamanho (nm)

% H ₂ O na suspensão final	PLGA	PLGA-AE	PLGA-DHC	PLGA-DHC-AE
100	116,5	132,5	102,9	109,9
50	116,8	134,5	93,78	93,78
25	116,7	134,5	92,92	92,92
10	116,8	134,8	94,59	94,59
5	116,5	134,8	93,5	94,8
0 (liofilizado)	5.233	7.678	3.589	4.895

Em geral, acredita-se que a degradação de partículas de poliésteres alifáticos (PLGA, por exemplo), ocorra por mecanismos hidrocatalíticos (Vert *et al.*, 1994; Anderson & Shive, 1997). Dentre os fatores que podem modular o comportamento da degradação hidrolítica de nano/micropartículas de homopolímeros ou copolímeros de ácido láctico/glicólico estão a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade (permeabilidade e solubilidade em água), composição química, mecanismos de hidrólise (não-catalítico, auto-catalítico e enzimático), aditivos (fármaco, solventes, e outros), morfologia (cristalina ou amorfa), dimensões (tamanho, proporção superfície:volume, forma), porosidade, massa molar e distribuição da mesma, fatores físico-químicos (força iônica, pH, alteração iônica, carga de superfície) e esterilização. Dentre estes a porosidade pode apresentar maior relevância quanto à velocidade de biodegradação, de forma diretamente proporcional ao tamanho dos poros.

Em relação à associação do fármaco ao sistema nanoestruturado, vários estudos mostram que diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de fármaco associada ao sistema, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do fármaco (Guterres *et al.*, 1995, 2000; Calvo *et al.*, 1996), as características da superfície das partículas ou a natureza do polímero (Vila *et al.*, 2002), a quantidade de fármaco adicionada à formulação (Brasseur *et al.*, 1991), a ordem de adição do fármaco na formulação, ou seja, antes (incorporação) ou após (incubação) à formação das nanoestruturas (Bapat & Boroujerdi, 1992; Fresta *et al.*, 1995) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (Marchal-Heussler *et al.*, 1990; Fontana *et al.*, 1998).

A determinação do potencial zeta pode ser útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas. Segundo Alonso e colaboradores (1991), o potencial zeta de nanopartículas de poli (cianoacrilato de butila) foi determinado como forma de investigar o mecanismo pelo qual o fármaco, sulfato de amicacina, e este polímero interagem. Assim,

foi observado que ao adicionar o fármaco às nanopartículas em quantidades crescentes, a redução, em módulo, do potencial zeta foi concordante com o aumento da taxa de associação do fármaco, sugerindo uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero. A dificuldade de desenvolver sistemas de liberação controlada utilizando micro/nanopartículas poliméricas para aplicações biomédicas deve-se à grande variedade de fatores de interferência na degradação de micro/nanopartículas e portanto na estabilidade das mesmas, como foi mencionado anteriormente. Esses fatos ressaltam a importância nas mudanças na padronização da metodologia de preparação na tentativa de obter uma formulação que tenha um futuro promissor em relação às aplicações terapêuticas da DHC.

IV.2. Citotoxicidade

IV.2.1. Citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA e DHC/PLGA-AE em células HL60

Os resultados de citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA e DHC/PLGA-AE estão representados na **figura 13 ((c,d-e), respectivamente)**. Conforme mostra a **figura 13 (a)**, o ascorbil éster (AE) livre não foi citotóxico em células HL60, obtendo-se 80 % de viabilidade até 4 μ M. Com a adição de AE (0 a 4 μ M) e DHC (250 μ M) ao meio de cultura RPMI, obteve-se 80 % de viabilidade celular, indicando significativa proteção do efeito citotóxico da DHC em sua forma livre (**figura 13 (b)**). Estes resultados sugerem que o AE atua como antioxidante, efeito conhecido de seu precursor, Vitamina C; sendo que a proteção máxima foi atingida na concentração de 4 μ M de AE. Portanto, a citotoxicidade da DHC foi reduzida na presença de AE, pois o estresse oxidativo é parte importante do mecanismo de ação deste composto.

Foram realizados ensaios de citotoxicidade após tratamento das células HL60 com nanoesferas de DHC/PLGA que passaram pelo processo de liofilização (**figura 13 (c)**), porém não foi obtido IC_{50} , mantendo em média 70% de viabilidade celular até 800 μM de DHC encapsulada. Em seg, cuida, confirmou-se a agregação das nanopartículas por microscopia eletrônica (**figura 12 (b)**), o que provavelmente interferiu na citotoxicidade da DHC encapsulada. Este estado de coalescência não permite um controle da liberação do fármaco, assim como internalização das partículas, devido a sua deformicidade e maior tamanho.

Após substituição do processo de liofilização pelo de rotaevaporação, foi possível atingir a estabilidade do sistema e obter partículas confiáveis para testes biológicos. A **figura 13 (d) e (e)** mostra os resultados de citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA e DHC/PLGA-AE, respectivamente em suspensão em células da leucemia HL60. Pode-se observar que houve significativo aumento da citotoxicidade da DHC em sua forma encapsulada em nanoesferas de PLGA, se comparado à forma coalescida, obtendo um valor de IC_{50} próximo de 550 μM . No entanto, este é superior ao valor de IC_{50} da DHC em sua forma livre (próximo de 170 μM). Esta redução no efeito citotóxico da DHC ao ser encapsulada pode ser atribuído à rápida liberação do composto pelo polímero e/ou à ação do tensoativo Pluronic, que pode formar uma barreira selante na mitocôndria e assim proteger a célula do efeito tóxico. Uma alternativa para solucionar este inconveniente seria a utilização de Vitamina E esterificada como tensoativo, pois esta forma orgânica pode ser mais facilmente lavada e teria efeito mais vantajoso, o que foi comprovado, obtendo-se IC_{50} próximo de 150 μM (**figura 13 (e)**).

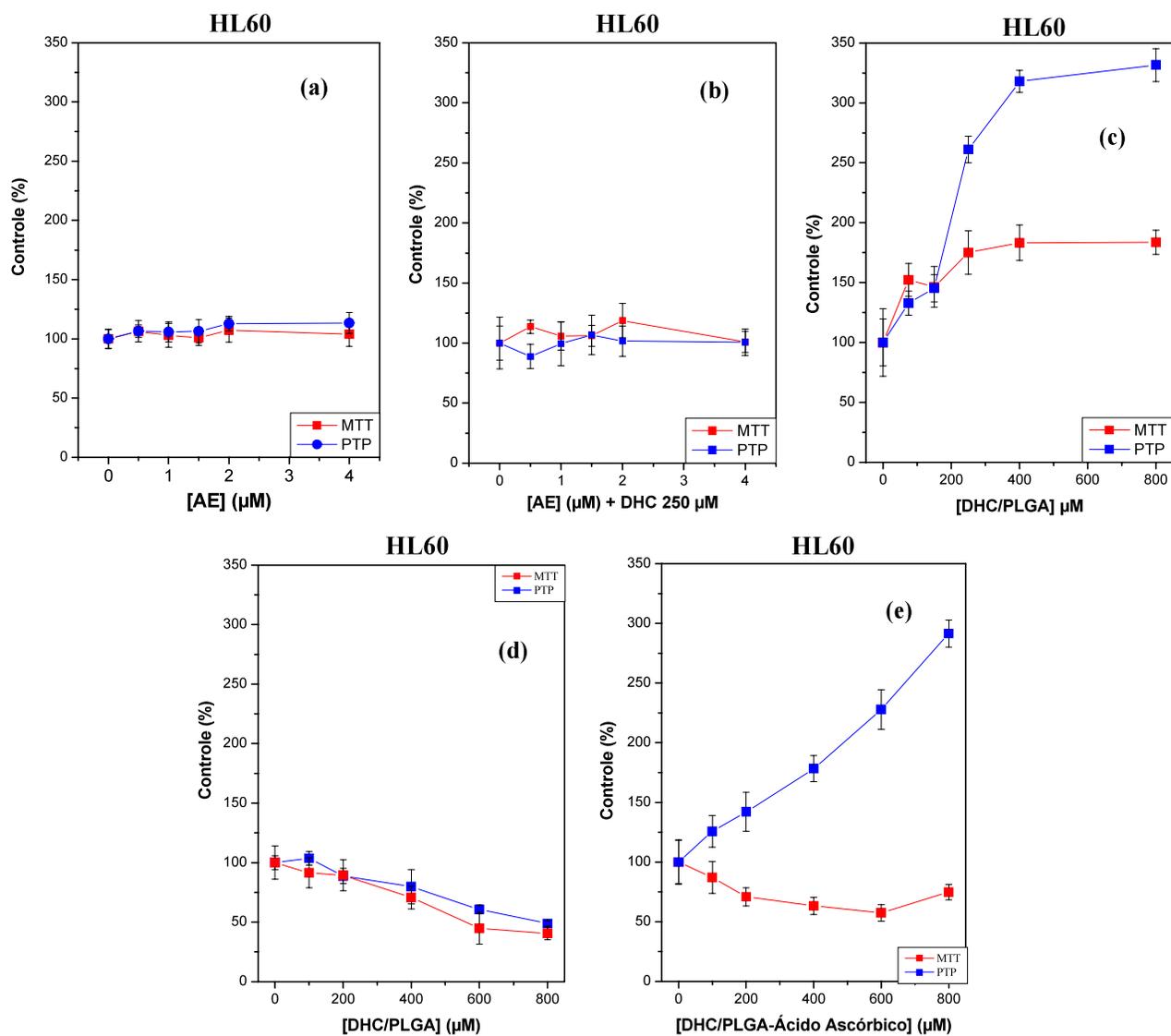


Figura 13. Citotoxicidade do Ascorbil-éster (a), citotoxicidade do Ascorbil-éster na presença de DHC (250 μM) (b), citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA após liofilização (partículas coalescidas) (c) e citotoxicidade das nanoesferas de DHC/PLGA (d) e DHC/PLGA-AE (e) em suspensão (antes da liofilização) em células HL60, utilizando ensaios de redução do MTT e atividade fosfatásica como parâmetros de viabilidade celular.

IV.2.2. Citotoxicidade da DHC e de seus complexos de inclusão em β CDs em das células da leucemia (HL60, U937, K562, K562 Lucena)

A **tabela 5** mostra os resultados de viabilidade das células HL60, U937 e K562, K562 Lucena, obtidos após tratamentos por 72 h com a DHC em sua forma livre e complexada em ciclodextrinas (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD), utilizando os ensaios de atividade de redução do MTT e atividade fosfatásica (PTP) representados na **figura 14**.

Comparando os efeitos citotóxicos da DHC livre e complexada em β CD, Me β CD e em HP β CD nas células da leucemia (HL60, U937, K562 e K562 Lucena), utilizando resultados obtidos para os ensaios de redução do MTT e atividade fosfatásica (PTP), podemos observar que o padrão dose-dependente de citotoxicidade da DHC não se manteve, principalmente ao ser complexada em β CD em células U937.

Entretanto, os complexos de inclusão DHC/Me β CD e DHC/HP β CD apresentaram citotoxicidade significativa, principalmente segundo o ensaio de redução do MTT. Os complexos de inclusão de DHC em β CDs foram testados em concentrações de 0 a 500 μ M (**figura 14**), utilizando como controle, tanto o tratamento com β CDs puras (branco) a 500 μ M, quanto células em meio de cultura RPMI-1640, contendo 0,25 % de DMSO (controle negativo). As β CDs puras não foram citotóxicas às células em estudo, apresentando

Tabela 5. Citotoxicidade da DHC em sua forma livre e complexada com β CDs em células da leucemia humana.

Tratamentos (0-500 ou 1000 μ M) por 72 h	IC ₅₀ (μ M)							
	HL60		U937		K562		K562 Lucena	
	MTT	PTPP	MTT	PTPP	MTT	PTPP	MTT	PTPP
DHC	166 ± 1,6	138 ± 2,3	150 ± 2,2	300 ± 1,7	NE	200 ± 3,7	150 ± 1,6	
DHC/ β CD	50 ± 2,7	NE	NE	50 ± 2,8	150 ± 4,1	400 ± 2,9		
DHC/Me β CD	125 ± 3,2	175 ± 1,9	NE	400 ± 1,8	260 ± 2,4	NE	330 ± 3,4	400 ± 1,7
DHC/HP β CD	40 ± 1,5	400 ± 1,7	375 ± 2,6	170 ± 4,2	100 ± 1,9	NE	140 ± 2,8	

Cada valor representa a média ± S.D. de três experimentos em quatro replicatas. *NE = não foi obtido IC₅₀.

viabilidade semelhante ao controle negativo.

Segundo Corrêa e colaboradores, (2005), a inclusão da DHC em β CD reduziu em 40 % a citotoxicidade em células normais, fibroblastos V79 e hepatotoxicidade. Além disso, o complexo de inclusão DHC/ β CD foi 3 vezes mais citotóxico do que a forma livre da DHC em células HL60, segundo a atividade de redução do MTT, com valores de IC_{50} de 166 μ M e 50 μ M, respectivamente (**tabela 5**). As β CDs metiladas e hidroxipropiladas apresentam vantagens quanto à solubilidade, menor toxicidade e possibilidade de interação com membranas celulares. Portanto a complexação da DHC em Me β CD e em HP β CD poderia ser ainda mais promissora quanto à atividade antitumoral da DHC complexada em β CDs (Kang *et al.*, 2002; Uekama, 2004).

A **figura 14** mostra que os complexos DHC/Me β CD e DHC/HP β CD também se apresentaram significativamente mais citotóxicos em relação à DHC livre em células HL60, segundo o ensaio de redução do MTT, obtendo-se valores de IC_{50} de 125 μ M, 40 μ M e 166 μ M, respectivamente (**tabela 5**). Baseando-se nos ensaios de atividade fosfatásica (PTPP), os complexos DHC/Me β CD e DHC/HP β CD exibiram semelhante ou menor citotoxicidade em células HL60 (IC_{50} próximo de 175 μ M e 400 μ M, respectivamente), quando comparado com a DHC em sua forma livre e complexada à β CD (IC_{50} próximos de 140 e 580 μ M, respectivamente). Quanto às células U937 (**figura 14**), como pode ser observado na **tabela 5**, tanto o complexo DHC/Me β CD, quanto a DHC complexada em HP β CD apresentaram-se pelo menos 50 % menos citotóxicos, se comparados com a DHC livre (IC_{50} de 150 μ M para ambos os ensaios, MTT e PTPP). Para o ensaio de redução do MTT, após exposição das células U937 ao complexo DHC/Me β CD não foi obtido IC_{50} até 500 μ M e para o a redução 400 μ M e 375 e 170 μ M, respectivamente (**tabela 5**). Em adição, as

células U937 apresentaram cerca de 70 % de viabilidade até 500 μM de DHC/BCD, não obtendo IC_{50} até a concentração máxima (**figura 14**).

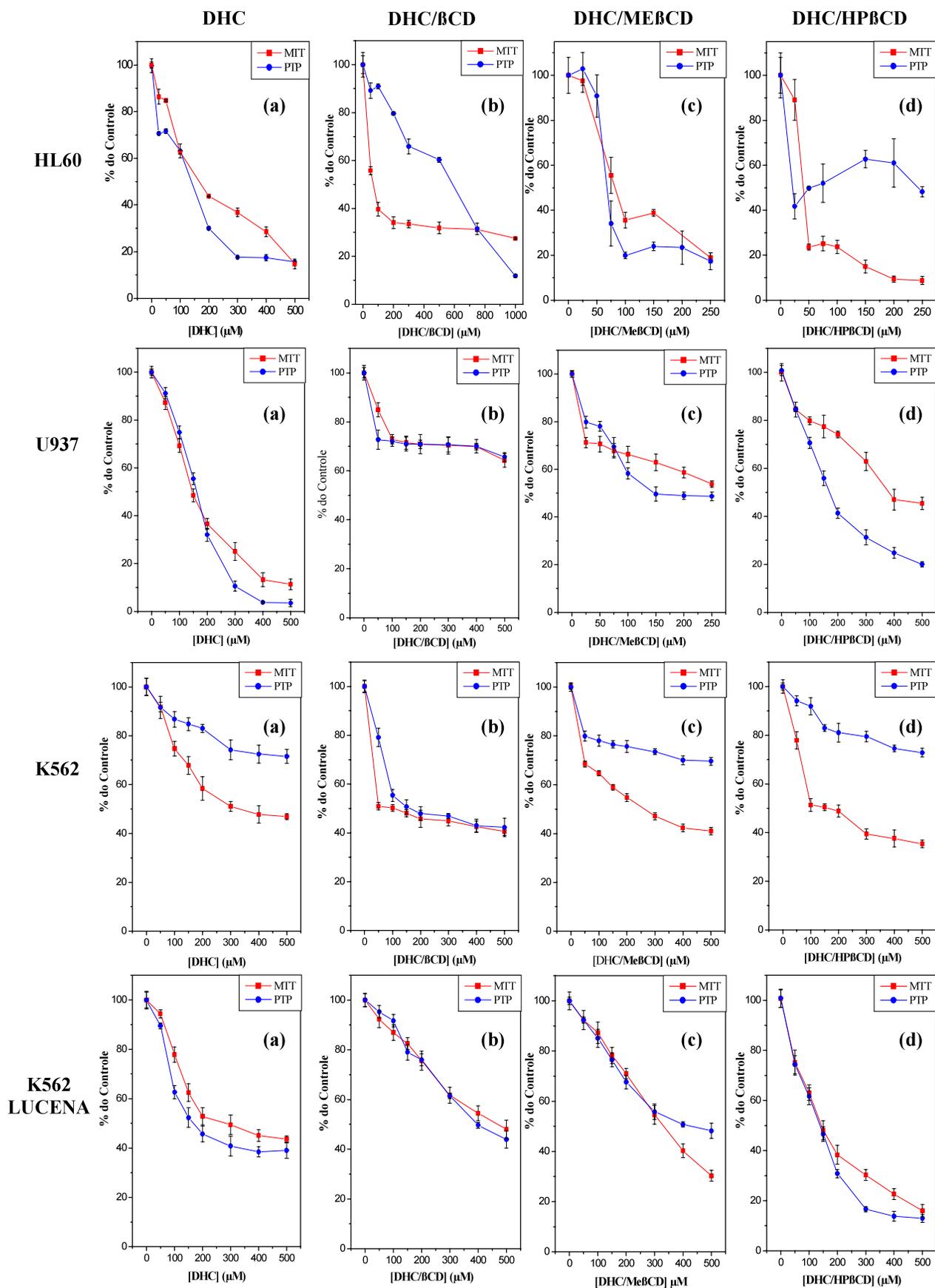


Figura 14. Citotoxicidade da DHC (a), complexos de inclusão DHC/BCD (b), DHC/MeBCD (c) e DHC/HPBCD (d) em meio de cultura RPMI-1640 em células HL60, U937, K562 e K562 Lucena tratadas durante 72 h. Cada ponto representa a média ± SD de três experimentos em quatro replicatas.

Em relação às células da leucemia mielogenosa crônica K562, os complexos DHC/ β CD e DHC/HP β CD (**Figura 14**) mostraram-se mais citotóxicos segundo o ensaio de redução do MTT (IC_{50} de 50 e 100 μ M, respectivamente). Para o ensaio de atividade PTPP, o complexo DHC/ β CD mostrou-se mais citotóxico (IC_{50} de 150 μ M), quando comparado ao complexo DHC/HP β CD, pois cerca de 75 % das células K562 apresentaram-se viáveis após exposição a este em concentrações de até 500 μ M, concentração máxima utilizada. Por outro lado, a DHC livre apresentou citotoxicidade semelhante ao complexo DHC/Me β CD em células K562, obtendo-se cerca de 70 % de viabilidade celular segundo atividade PTPP e IC_{50} próximo de 300 μ M para o ensaio de MTT em ambos os tratamentos (**figura 14**). As células K562 Lucena, caracterizadas como resistentes a multi-drogas, apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos com os complexos DHC/HP β CD semelhantemente à DHC livre (**figura 14**). Conforme mostrado na **tabela 5**, os valores de IC_{50} obtidos após exposição das células K562 Lucena à DHC e seu complexo de inclusão em HP β CD, segundo o ensaio de redução do MTT foram de 200 μ M e 140 μ M, respectivamente e segundo a atividade PTPP foram de 150 μ M e 140 μ M, respectivamente. Os valores IC_{50} obtidos após tratamentos das células K562 Lucena com os complexos DHC/ β CD e DHC/HP β CD foram de 400 μ M e 330 μ M, respectivamente, analisado pela redução do MTT. Segundo atividade PTPP, foi obtido IC_{50} de 400 μ M, para ambos os tratamentos. Portanto, os complexos DHC/ β CD e DHC/HP β CD mostraram-se 50 % menos citotóxicos em células K562 Lucena em comparação à forma livre da DHC. De maneira geral, segundo os resultados de citotoxicidade em células da leucemia obtidos, podemos sugerir que a complexação da DHC com β CDs mostrou maior ou semelhante eficácia em comparação à DHC livre em células da leucemia. Um detalhe importante refere-se à citotoxicidade

significativa complexo DHC/HPβCD em células K562 Lucena, reduzindo sua resistência em relação aos outros complexos testados.

Portanto, esses resultados mostram-se promissores quanto à atividade antitumoral da DHC complexada a βCDs em células da leucemia, quanto a citotoxicidade. Neste contexto, pode-se concluir que a atividade citotóxica da DHC em células da leucemia foi intensificada ou mantida ao ser complexada em βCDs, com a vantagem de apresentar efeitos citotóxicos significativamente reduzidos em fibroblastos V79 e em hepatócitos (Corrêa *et al.*, 2005).

IV.2.2.1. Citotoxicidade da DHC livre e de seus complexos de inclusão em βCDs na presença de antioxidantes ou depletor de GSH em células leucêmicas (HL60, U937, K562 e K562 Lucena)

A **tabela 6** mostra os valores de IC₅₀ obtidos pelo ensaio de redução do MTT após 72 h de tratamento das células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena com concentrações de 0 a 800 μM de DHC em sua forma livre e em complexos de inclusão em βCDs, na presença e ausência de antioxidantes (GSH 1mM, NAC 1 mM, GSH 0,5 mM associado ao NAC 0,5 mM ou DEM 0,5 mM) e/ou 1 μM de ciclosporina A (CsA), respectivamente, obtidos dos dados apresentados na **figura 15 (1-4)**.

Tabela 6. Citotoxicidade da DHC em sua forma livre e complexada com βCDs em células da leucemia humana: HL60, U937, K562 e K562 LUCENA, após pré-incubação com 1 μM de ciclosporina A (CsA) na presença de antioxidantes e ou agente indutor de depleção de GSH (DEM).

IC ₅₀ de Células Leucêmicas (μM)										
TRATAMENTOS	s/ antioxidantes		GSH 1mM		NAC 1mM		GSH 0,5mM + NAC 0,5mM		DEM 0,5mM	
Pré-incubação por 1 h com CsA 1 μM	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/	s/	c/
IC₅₀ de Células HL60 (μM)										
DHC	380± 3.00	NE (70%)	NE	NE	665 ± 3.41	NE (73%)	NE (80%)	NE (60%)	160± 1.34	NE
βCD/DHC	117± 2.50	NE (60%)	NE (55%)	NE (70%)	380 ± 2.60	NE (50%)	NE	NE (55%)	115± 2.30	NE
MeβCD/DHC	585± 3.05	NE (76%)	NE	NE	665 ± 3.41	NE (73%)	NE (85%)	NE (65%)	168± 1.34	NE
OHpβCD/DHC	117± 2,81	NE (63%)	NE (65%)	NE (76%)	400 ± 2,65	NE (55%)	NE	NE (55%)	123± 2,34	NE
IC₅₀ de Células U937 (μM)										

DHC	335 ± 2,36	NE	NE (60%)	NE	NE (71%)	NE	NE (59%)	NE (85%)	150 ± 4,23	NE
βCD/DHC	200 ± 3,86	NE (75%)	NE (84%)	NE (90%)	NE (73%)	NE	240 ± 2,15	NE (65%)	226 ± 3,35	800 ± 2,54
MeβCD/DHC	250 ± 2,57	320 ± 3,44	212 ± 4,32	385 ± 2,85	NE (54%)	690 ± 2,47	250 ± 3,05	250 ± 3,64	210 ± 4,23	508 ± 3,55
OHpβCD/DHC	112 ± 3,21	NE (77%)	NE (74%)	NE (80%)	NE (90%)	NE	NE (76%)	NE	NE (63%)	NE (72%)
IC₅₀ de Células K562 (μM)										
DHC	NE (80%)	NE	NE	NE (80%)	675 ± 3.60	NE	NE (60%)	NE (83%)	NE (80%)	325 ± 2.25
βCD/DHC	NE (60%)	NE (70%)	400 ± 2.70	NE	700 ± 2.50	NE	250 ± 2.70	300 ± 2.15	NE (61%)	NE (80%)
MeβCD/DHC	NE (81%)	NE	NE	NE (84%)	675 ± 4.16	NE	NE (60%)	NE (85%)	NE (86%)	325 ± 2.25
OHpβCD/DHC	NE (61%)	NE (80%)	400 ± 3.74	NE	800 ± 3.85	NE	230 ± 2.69	400 ± 4.05	NE (61%)	NE (80%)
IC₅₀ de Células K562 LUCENA (μM)										
DHC	590 ± 2,35	NE (80%)	NE	NE	NE (60%)	NE (80%)	360 ± 4,03	NE (60%)	400 ± 2,56	NE
βCD/DHC	589 ± 2,79	NE	NE	NE	NE (70%)	NE	NE (68%)	NE (75%)	235 ± 4,12	NE
MeβCD/DHC	250 ± 3,54	NE	370 ± 3,39	NE (66%)	800 ± 2,14	NE	800 ± 2,43	NE (55%)	NE (67%)	NE (80%)
OHpβCD/DHC	340 ± 1,98	NE (72%)	NE (55%)	NE (65%)	NE (73%)	NE	NE (75%)	800 ± 3,09	800 ± 3,42	NE (65%)

Cada valor representa a média ± S.D. de três experimentos em quatro replicatas. *NE = não foi obtido IC₅₀; Os valores entre parênteses em porcentagem expressam a viabilidade das células na concentração máxima utilizada (800μM).

O estado redox intracelular é regulado por tíois celulares, incluindo GSH, que é um dos fatores intracelulares antagonistas à oxidação excessiva. O envolvimento de estresse oxidativo no mecanismo de ação da DHC foi anteriormente demonstrado por Anazetti e colaboradores, (2004). Com intuito de investigar a participação de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de citotoxicidade da DHC e de seus complexos de inclusão em βCDs, as células da leucemia (HL60, U937, K562 e K562 Lucena) foram tratadas com a DHC em sua forma livre e complexada em CDs em concentrações de 0 a 800 μM, na presença ou ausência de 1 μM de CsA e/ou antioxidantes, tais como 1 mM de glutathiona reduzida (GSH), 1 mM de n-acetil cisteína, (NAC) e/ou 0,5 mM de dietil maleato (DEM), depletor de GSH intracelular, seguidas de incubação durante 72 h. As concentrações dos agentes utilizados foram previamente determinadas, portanto nas condições experimentais não foram tóxicas às células.

A **tabela 6** mostra os valores de IC₅₀ obtidos por redução do MTT após os tratamentos, representados na **figura 15**. Os dados mostram que a citotoxicidade da DHC e de seus

complexos de inclusão em ciclodextrinas DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD foi reduzida em células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena (**figura 15 (1), (2), (3) e (4)**, respectivamente) na presença de CsA, sendo que esta proteção foi mais significativa contra os efeitos citotóxicos dos complexos de inclusão DHC/Me β CD e DHC/HP β CD em células HL60, K562 e K562 Lucena (**figura 15 (1), (3) e (4)**, respectivamente). Entretanto, estas células quando expostas à DHC e DHC/ β CD, tanto na presença, quanto ausência de CsA foram obtidos valores de IC₅₀ próximos, indicando que não houve proteção à citotoxicidade. Por outro lado, os efeitos citotóxicos da DHC e do complexo DHC/ β CD em células U937 foram reduzidos significativamente na presença de CsA. Após tratamento destas células com o complexo DHC/Me β CD (**figura 15 (2)**), obteve-se IC₅₀ próximo de 300 μ M, independentemente da presença de CsA. A CsA é um inibidor da abertura de poros de transição de permeabilidade (PTPP) de membrana mitocondrial interna (MMI), evento inicial envolvido na via mitocondrial de indução de apoptose, resultando na liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, dentre as quais citocromo c, que pode estar associado ao “swelling” osmótico da mitocôndria, alta concentração de proteínas na matriz mitocondrial e ruptura de MME. A permeabilização da MME pode ser obtida por dois mecanismos principais, incluindo formação de poros por proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e ruptura da MMI como resultado de swelling mitocondrial. Este mecanismo pode ser inibido pela ação da CsA, portanto a redução nos efeitos citotóxicos observados sugerem a participação da via mitocondrial de indução apoptótica. Porém a CsA também pode estar envolvida em outras vias de indução de apoptose, o que poderia explicar os resultados obtidos em células onde a presença deste inibidor não induziu redução de citotoxicidade.

A citotoxicidade induzida pela DHC e seus complexos em células leucêmicas foi inibida pela presença dos antioxidante GSH e NAC, separadamente. Porém, a presença de antioxidantes associada à CsA induziu proteção total a indução de morte nas células da leucemia. Os antioxidantes GSH (1mM) e NAC (1mM) recuperaram significativamente a viabilidade celular a cerca de 80 % (**figura 15 (1-4 (a-d))**). A perda de GSH intracelular, causada pelo DEM foi inibida pela presença de CsA, obtendo cerca de 80 % de viabilidade celular até 800 μ M em todos os tratamentos (**figura 15 (d)**). Além disso, as células HL60 pré-incubadas com GSH na presença de CsA e expostas por 72 h à Me β CD/DHC e HP β CD/DHC apresentaram um estímulo de até 70% na redução do MTT, o que pode estar associado a um aumento na produção de GSH pelas células, como forma de proteção à presença do fármaco (**figura 15 (1)**). GSH apresenta um papel chave na proteção de células contra toxicidade pela manutenção do estado redox intracelular através da conjugação com xenobióticos eletrofilicos e radicais livres, prevenindo a formação de peróxidos reativos. A depleção de GSH permite aumentar a atividade citotóxica de agentes anticâncer uma vez que há redução na proteção contra estresse oxidativo. A depleção de GSH observada em células da leucemia tratadas com DHC e seus complexos em β CDs pode contribuir significativamente com o envolvimento de EROS no efeito citotóxico, induzindo morte celular, inclusive na formação de poros inespecíficos na membrana mitocondrial interna.

HL60 (1)

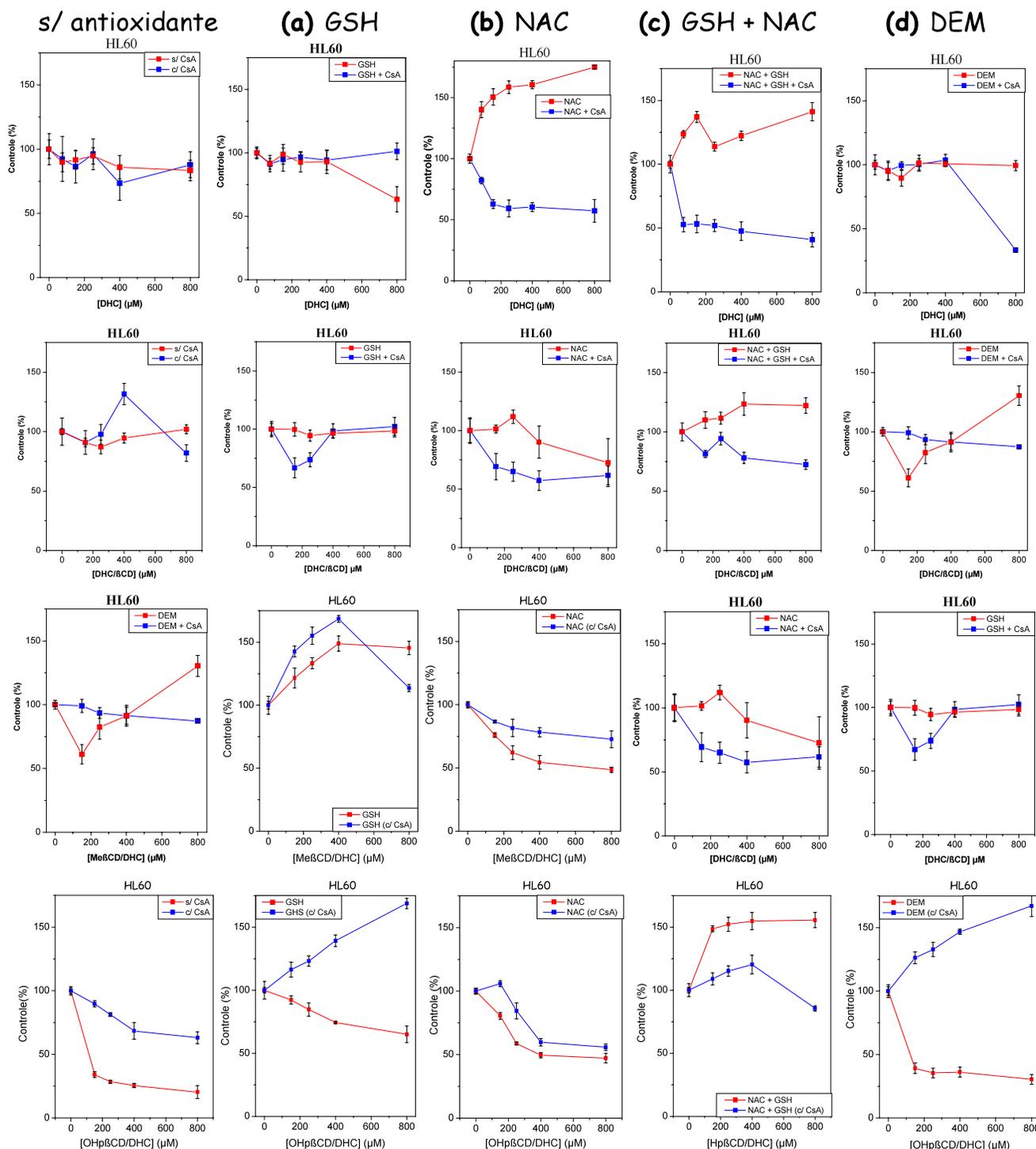


Figura 15. Citotoxicidade de células HL60 (1); U937 (2); K562 (3) e K562 Lucena (4) após 72 h de exposição à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/BCD, DHC/MeβCD e DHC/HPβCD em diferentes concentrações (0 a 800 μM). Os tratamentos foram realizados após prévia incubação das células na presença e ausência de ciclosporina A (CsA) 1,0 μM e/ou antioxidantes: glutatona reduzida, GSH 1,0 mM (a); n-acetil cisteína, NAC 1,0 mM (b); e GSH 0,5 mM associado ao NAC 0,5 mM (c), assim como, um agente indutor de depleção de GSH, dietil-maleato, DEM 0,1 mM (d). Cada valor representa média ± SD de três experimentos em quadruplicata. **Continuação da figura na página seguinte.**

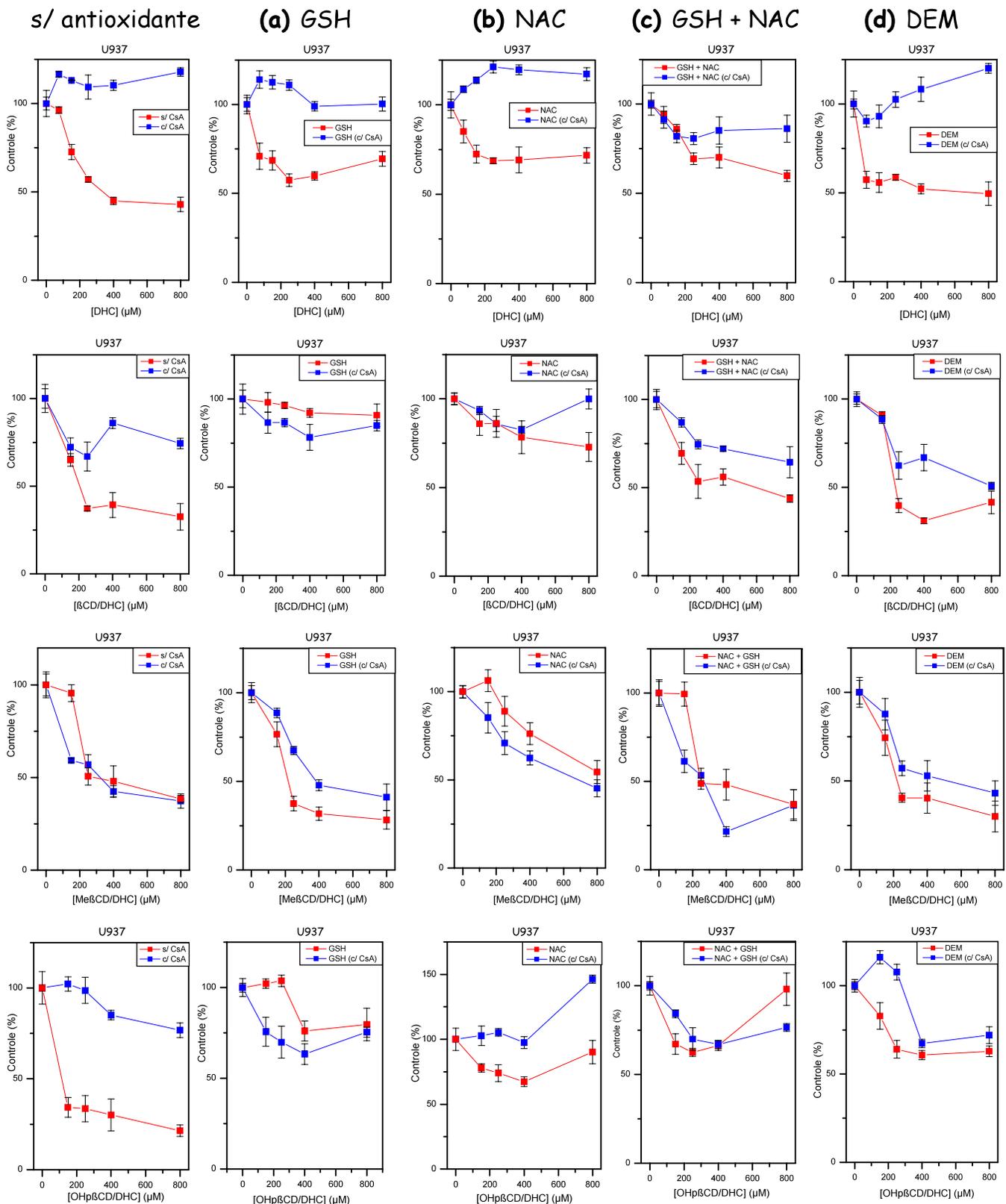


Figura 15. Citotoxicidade de células HL60 (1); U937 (2); K562 (3) e K562 Lucena (4) após 72 h de exposição à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/ βCD , DHC/Me βCD e DHC/HP βCD em diferentes concentrações (0 a 800 μM). Os tratamentos foram realizados após prévia incubação das células na presença e ausência de ciclosporina A (CsA) 1,0 μM e/ou antioxidantes: glutatona reduzida, GSH 1,0 mM (a); n-acetil cisteína, NAC 1,0 mM (b); e GSH 0,5 mM associado ao NAC 0,5 mM (c), assim como, um agente indutor de depleção de GSH, dietil-maleato, DEM 0,1 mM (d). Cada valor representa média \pm SD de três experimentos em quadruplicata. **Continuação da figura na página seguinte.**

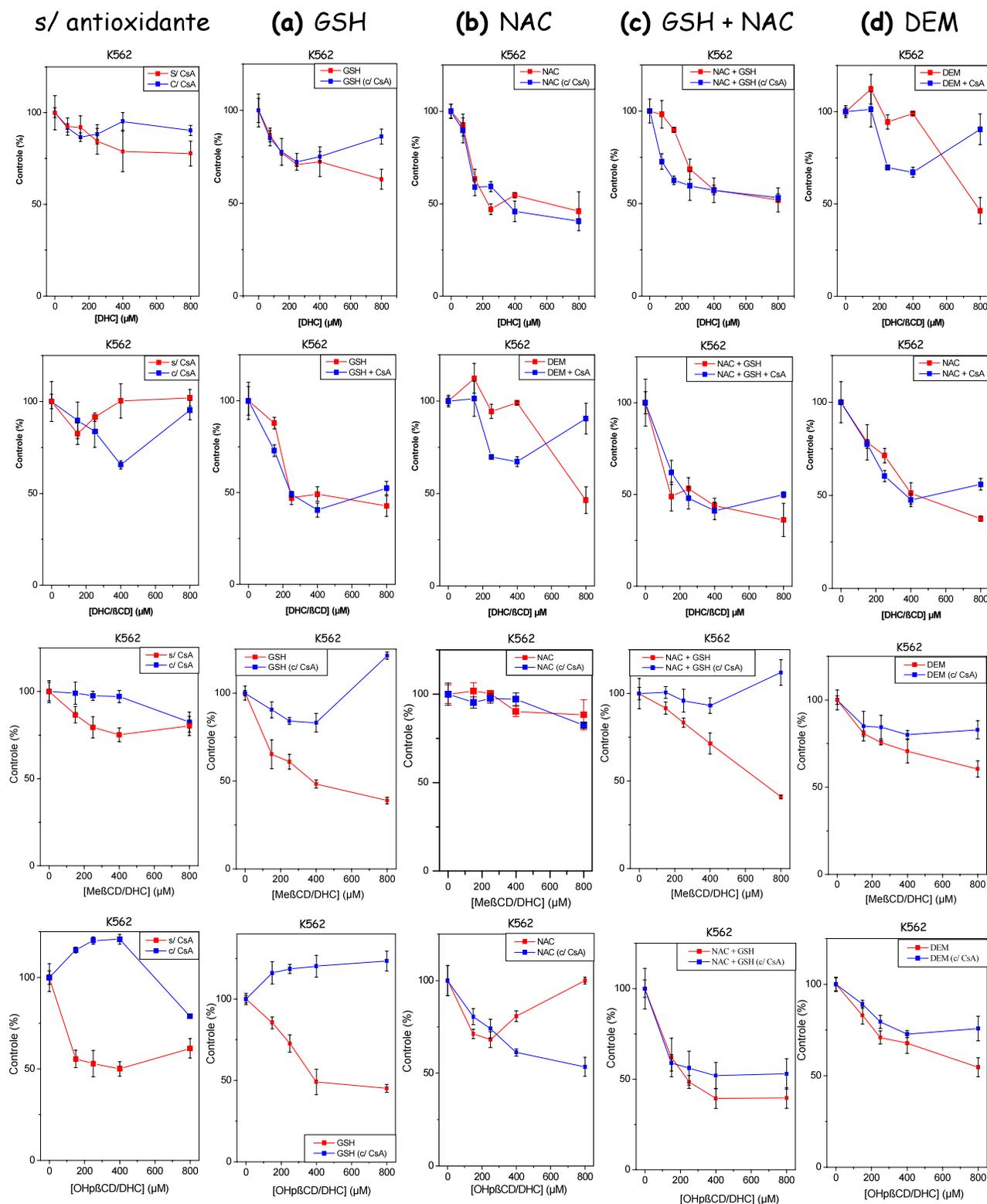


Figura 15. Citotoxicidade de células HL60 (1); U937 (2); K562 (3) e K562 Lucena (4) após 72 h de exposição à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/BCD, DHC/MeβCD e DHC/HPβCD em diferentes concentrações (0 a 800 μM). Os tratamentos foram realizados após prévia incubação das células na presença e ausência de ciclosporina A (CsA) 1,0 μM e/ou antioxidantes: glutatona reduzida, GSH 1,0 mM (a); n-acetil cisteína, NAC 1,0 mM (b); e GSH 0,5 mM associado ao NAC 0,5 mM (c), assim como, um agente indutor de depleção de GSH, dietil-maleato, DEM 0,1 mM (d). Cada valor representa média ± SD de três experimentos em quadruplicata. **Continuação da figura na página seguinte.**

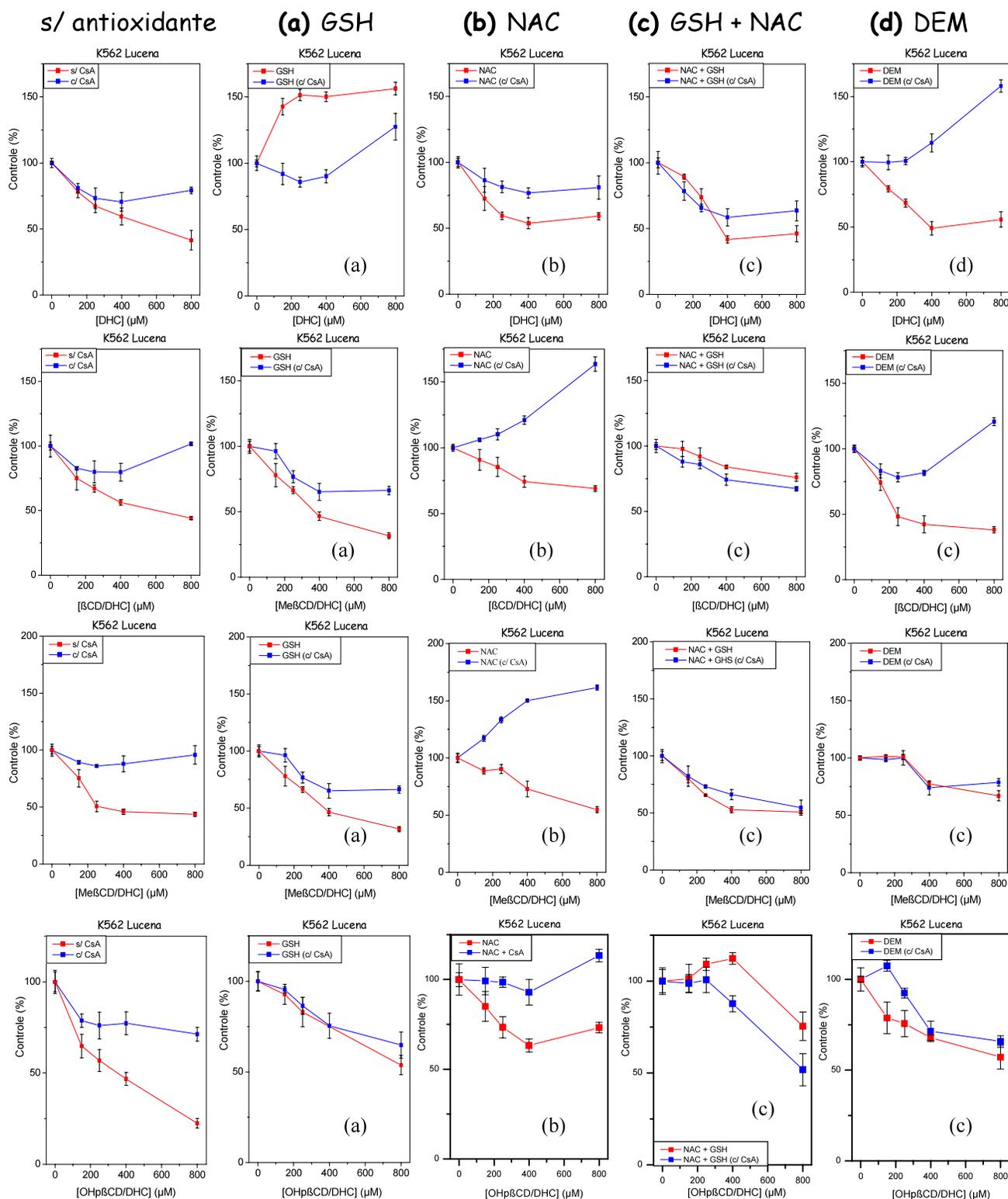


Figura 15. Citotoxicidade de células HL60 (1); U937 (2); K562 (3) e K562 Lucena (4) após 72 h de exposição à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/BCD, DHC/MeβCD e DHC/HPBCD em diferentes concentrações (0 a 800 μM). Os tratamentos foram realizados após prévia incubação das células na presença e ausência de ciclosporina A (CsA) 1,0 μM e/ou antioxidantes: glutatona reduzida, GSH 1,0 mM (a); n-acetil cisteína, NAC 1,0 mM (b); e GSH 0,5 mM associado ao NAC 0,5 mM (c), assim como, um agente indutor de depleção de GSH, dietil-maleato, DEM 0,1 mM (d). Cada valor representa média ± SD de três experimentos em quadruplicata.

IV.2.1. Citotoxicidade da DHC em sua forma livre e seus complexos de inclusão em β CDs em linfócitos humanos

O efeito da DHC livre e de seus complexos em β CDs (DHC/ β CD; DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) na viabilidade de linfócitos (células mononucleares de sangue periférico humano) podem ser observados na **figura 16 (a-d)**, respectivamente). Os linfócitos foram incubados com fitohemaglutinina (PHA, 5 μ g/mL) como mitógeno e concentrações de 0 a 1000 μ M de DHC em sua forma livre e complexada em β CD, Me β CD e HP β CD, por 72 h. Observação das células ao microscópio óptico permitiu verificar que não houve alterações morfológicas características de apoptose e nem citotoxicidade significativa após exposição aos complexos na presença ou ausência de PHA, conforme **figura 16 (b-d)**, após os tratamentos com os complexos de inclusão, em média 70 % das células apresentaram-se viáveis, segundo ensaios de atividade de redução do MTT e PTP. A DHC livre não foi citotóxica até 1000 μ M, obtendo-se aproximadamente de 70 % de viabilidade celular após 72 h de exposição (**figura 16 (a)**), corroborando com os resultados anteriormente mostrados por Anazetti e colaboradores (2003). Dentre os complexos entre DHC e β CDs, o DHC/HP β CD mostrou ser o menos citotóxico a linfócitos normais, pois as células

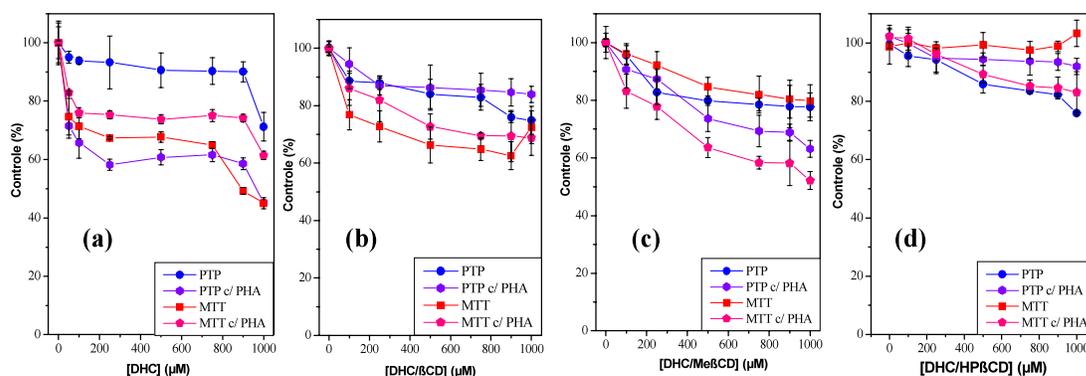


Figura 16. Citotoxicidade da DHC (a), complexos de inclusão DHC/ β CD (b), DHC/Me β CD (c) e DHC/HP β CD (d) em meio de cultura RPMI-1640 em Linfócitos humanos tratados por 72 h. Cada ponto representa a média \pm SD de três experimentos em quatro replicatas.

apresentaram, em média, 90 % de viabilidade segundo os ensaios de redução do MTT e atividade PTP na presença e ausência de PHA. Portanto, analisando os resultados de citotoxicidade dos complexos de β CDs contendo DHC em células da leucemia e em linfócitos podemos sugerir que o complexo DHC/HP β CD inibiu mais eficientemente o crescimento de células da leucemia HL60, U937 e K562 *in vitro*, sendo o complexo menos citotóxico a células do sistema imune, conforme nossas condições experimentais.

IV.3. Atividade antitumoral da DHC e de seus complexos em β CDs

IV.3.1. Indução de Diferenciação Celular

IV.3.1.1. Atividade de Redução do NBT

Em trabalhos anteriores Anazetti e colaboradores (2003) mostraram que a DHC induz diferenciação em células HL60. Com intuito de verificar se esta atividade foi mantida após complexação em β CDs (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD), células HL60 e U937 foram incubadas por 12, 48 e 72 h com concentrações próximas ao IC₅₀ dos complexos e da DHC livre. Além disso, células K562 e K562 Lucena foram incubadas por 12 h nas mesmas condições. Após os períodos de tratamentos, as células foram avaliadas quanto à atividade redutora, utilizando TPA (12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato) como estímulo e NBT (nitro blue tetrazolium) como agente oxidante, um marcador típico de diferenciação de células da leucemia mielóide (Theodore *et al.*, 1990).

A **tabela 7** representa os valores de produção relativa de NBD/10⁶ células, observados na **figura 17**. Após 48 h de exposição das células HL60 e U937 ao complexo DHC/Me β CD 150 μ M foi obtido um aumento de 2,7 vezes na produção relativa de NBD e, portanto na indução de diferenciação celular. Após 72 h de tratamento com DHC/Me β CD 250 μ M obteve-se cerca de 3,4 e 3,0 vezes aumentada indução de diferenciação aumentada cerca de 3 vezes. O complexo DHC/ β CD na concentração de 250 μ M induziu aumento de 3,2 e 2,5 vezes na produção de NBD, em relação ao controle, após 72 h de incubação. Por outro lado

Tabela 7. Produção relativa de NBD/10⁶células determinada através da atividade de redução do NBT após estimulação de células HL60, U937, K562 e K562 Lucena tratadas com DHC em sua forma livre e complexada com β CDs. Cada valor representa a média \pm S.D. de três experimentos em quatro replicatas (*P<0,05 comparados ao controle).

TRATAMENTOS (μ M)	CÉLULAS							
	HL60			U937			K562	K562 Lucena
	12 h	48 h	72 h	12 h	48 h	72 h	12 h	12 h
1)Controle	1,01 \pm 0,017	1,04 \pm 0,065	1,13 \pm 0,133	1,04 \pm 0,065	1,05 \pm 0,086	1,02 \pm 0,021	1,02 \pm 0,035	1,02 \pm 0,035
2) DHC 150	1,54 \pm 0,014*	1,90 \pm 0,049*	2,48 \pm 0,100*	1,91 \pm 0,493*	2,29 \pm 0,011*	1,07 \pm 0,048	1,87 \pm 0,107*	1,77 \pm 0,073*
3) DHC 250	2,14 \pm 0,011*	1,92 \pm 0,036*	2,42 \pm 0,080*	1,93 \pm 0,364*	2,53 \pm 0,170*	1,39 \pm 0,023*	2,49 \pm 0,126*	2,39 \pm 0,106*
4) β CD 250	1,07 \pm 0,016	1,06 \pm 0,079	1,18 \pm 0,185	1,05 \pm 0,078	0,81 \pm 0,087	1,98 \pm 0,200*	1,07 \pm 0,021	1,07 \pm 0,014
5) DHC/ β CD 150	2,12 \pm 0,033*	2,26 \pm 0,038*	2,72 \pm 0,109*	2,26 \pm 0,385*	2,13 \pm 0,086*	2,04 \pm 0,129*	1,35 \pm 0,048*	1,15 \pm 0,021
6) DHC/ β CD 250	2,19 \pm 0,048*	2,46 \pm 0,058*	3,27 \pm 0,104*	2,46 \pm 0,580*	2,23 \pm 0,088*	1,08 \pm 0,067	1,39 \pm 0,089*	1,29 \pm 0,099
7) DHC/ β CD 400	2,46 \pm 0,070*	2,55 \pm 0,208*	2,87 \pm 0,106*	2,55 \pm 0,283*	2,50 \pm 0,052*	1,46 \pm 0,012*	1,53 \pm 0,054*	1,53 \pm 0,048*
8) Me β CD 250	1,03 \pm 0,019	1,21 \pm 0,107	1,36 \pm 0,103	1,22 \pm 0,183	1,09 \pm 0,106	1,44 \pm 0,022*	1,07 \pm 0,065	1,07 \pm 0,014
9) DHC/Me β CD 150	1,91 \pm 0,075*	2,72 \pm 0,021*	3,10 \pm 0,105*	2,72 \pm 0,216*	2,76 \pm 0,107*	1,90 \pm 0,076*	1,47 \pm 0,037*	1,07 \pm 0,038
10)DHC/Me β CD 250	2,19 \pm 0,027*	2,22 \pm 0,799*	3,37 \pm 0,108*	3,02 \pm 0,505*	2,75 \pm 0,065*	1,07 \pm 0,014	1,48 \pm 0,046*	1,08 \pm 0,046
11)DHC/Me β CD 400	2,20 \pm 0,056*	2,76 \pm 0,083*	2,90 \pm 0,109*	2,77 \pm 0,083*	2,66 \pm 0,048*	1,42 \pm 0,007*	1,52 \pm 0,079*	1,20 \pm 0,024
12)HP β CD 250	1,03 \pm 0,035	1,27 \pm 0,095	1,43 \pm 0,104	1,27 \pm 0,095	1,09 \pm 0,143	1,46 \pm 0,008*	1,08 \pm 0,014	1,07 \pm 0,014
13)DHC/HP β CD 150	2,01 \pm 0,010*	2,75 \pm 0,105*	2,88 \pm 0,107*	2,75 \pm 0,105*	2,62 \pm 0,014*	1,76 \pm 0,031*	1,38 \pm 0,026*	1,08 \pm 0,036
14)DHC/HP β CD 250	2,06 \pm 0,032*	2,55 \pm 0,389*	3,07 \pm 0,194*	2,56 \pm 0,389*	2,42 \pm 0,259*	2,42 \pm 0,021*	1,41 \pm 0,012*	1,11 \pm 0,052
15)DHC/HP β CD 400	2,15 \pm 0,034*	2,71 \pm 0,139*	2,83 \pm 0,208*	2,71 \pm 0,139*	2,41 \pm 0,219*	1,07 \pm 0,048	1,48 \pm 0,013*	1,18 \pm 0,014

a DHC complexada a HP β CD mostrou ser eficaz na indução de diferenciação em células HL60 e U937 em concentrações próximas e abaixo ao do IC₅₀, respectivamente, após 12 h de exposição mantendo a eficácia até 48 h em células U937 e até 72 h em células HL60 (**tabela 7**). Conforme **tabela 7** e **figura 17 (c-d)**, a redução do NBT por células K562 e

tratadas com DHC e seus complexos (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) aumentou cerca de 1,5 vezes em relação ao controle após 12 h de exposição. Em células K562 Lucena somente o complexo DHC/ β CD 400 μ M induziu diferenciação, porém a DHC livre mostrou maior eficácia, aumentando cerca de 2 vezes a indução de diferenciação celular.

Conforme mostrado na **figura 17 (a-d)**, a forma livre e complexada em β CDs da DHC induziu diferenciação celular eficientemente, chegando a aumentar em até 3 vezes a produção de NBD, produto da reação de redução do NBT, em relação às células controle. Os resultados evidenciam que os complexos de DHC e β CDs, principalmente DHC/HP β CD foram eficazes como indutores de diferenciação quando comparados à DHC livre nas células HL60 e U937, principalmente após 48 e 72 h de exposição. A leucemia, em geral, é uma malignidade heterogênea que têm sido classificada em sub-grupos de acordo com características morfológicas e citoquímicas, translocações cromossômicas características e expressão de imunofenótipo. A quimioterapia continua sendo uma importante estratégia terapêutica no tratamento de leucemias (James *et al.*, 1999). Inúmeros agentes podem

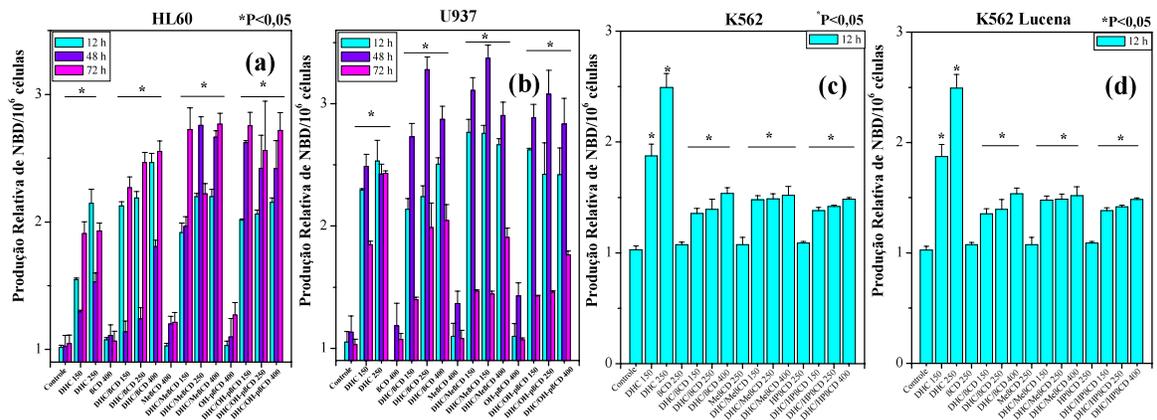


Figura 17. Diferenciação de células HL60 (a), U937 (b), K562 (c) e K562 Lucena (d) após diferentes períodos de exposição à DHC em sua forma livre e complexada às β CDs (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) em concentrações próximas ao IC₅₀. A diferenciação celular foi medida pela capacidade das células em reduzir NBT. Cada coluna representa a média \pm SD de três experimentos em quarto replicates (*P<0,05 em relação aos controles).

induzir diferenciação terminal em células da leucemia, indicando que a parada da maturação celular não é um processo irreversível e que, como consequência desta diferenciação há uma indução de morte celular por apoptose (Collins *et al.*, 1978; Anazetti *et al.*, 2003). De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que a DHC complexada à β CDs aumentou a capacidade de indução de diferenciação em células da leucemia, em relação à sua forma livre. Estudos posteriores serão necessários para determinar os tipos celulares diferenciados, utilizando marcadores de superfície específicos e também, para elucidar os mecanismos envolvidos na coordenação da expressão e regulação de fatores de transcrição que participam no processo de diferenciação dessas células. Com isso, podem-se almejar estratégias terapêuticas mais seletivas para leucemias.

IV.3.1.2. Marcadores celulares específicos para monócitos (CD14) e granulócitos (CD66b)

A leucemia, em geral, é uma malignidade que tem sido classificada conforme suas características morfológicas, citoquímicas, translocações cromossômicas e expressão de imunofenótipo. A quimioterapia continua sendo uma importante estratégia terapêutica no tratamento de leucemias. Muitos agentes podem induzir diferenciação terminal em células da leucemia, indicando que a parada da maturação celular não é um processo irreversível e que, como consequência do processo de diferenciação tem-se a indução de morte celular por apoptose (Anazetti *et al.*, 2003; Hakansson *et al.*, 2004).

As células HL60, linhagem da leucemia promielocítica humana, são frequentemente utilizadas como modelo de estudo de proliferação/diferenciação celular devido ao seu bipotencial em diferenciar-se a granulócitos ou a monócitos. Esta diferenciação é acompanhada por uma alteração na expressão de antígenos de superfície e aquisição de várias funções, tais como, geração de ânion superóxido e capacidade de aderência à parede

de frascos de cultura de células. Para determinação dos tipos celulares diferenciados e elucidação das diferenças nos mecanismos de ação da DHC em sua forma livre em comparação aos seus complexos em ciclodextrinas utilizamos marcadores específicos de diferenciação granulocítica e monocítica.

Os antígenos de superfície utilizados como marcadores de diferenciação de células HL60 a granulócitos ou monócitos, CD14 e CD66b, respectivamente, foram medidos em porcentagem após 06, 12, 24, 48 e 72 h de exposição das células à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD (**tabela 8**).

Conforme mostra a **tabela 8**, a expressão de CD 14 em células HL60 aumentou significativamente após 12 h de tratamento com DHC, DHC/ β CD e DHC/Me β CD, chegando a 25,59 %; 31,99 % e 23,53 %, respectivamente. Este aumento de aproximadamente 10 %, comparando ao controle, manteve-se após 24 h de exposição à DHC, atingindo 49,43% de células expressando CD14. Entretanto, a expressão de CD66b em células HL60 após 48 h e, principalmente, 72 h de exposição à DHC em sua forma livre e complexada em β CD, Me β CD e em HP β CD (400 μ M) atingiu 34,38%; 34,15% e 33,76%, respectivamente, correspondendo a um aumento de cerca de 20 % em relação ao controle. Os resultados apresentados na **tabela 8** e representados na **figura 18 (1-2 (a-d))**, mostram que a DHC e seus complexos de inclusão em β CDs induzem diferenciação granulocítica nas primeiras 12h de tratamento. Porém, dentre os complexos, DHC/ β CD parece ser mais eficiente na indução de diferenciação de células da leucemia humana HL60 a granulócitos e DHC/HP β CD induziu apenas diferenciação monocítica, desde 6h de exposição, chegando a um aumento de 26,24 % na população de células expressando o antígeno de superfície CD66b. Portanto, os resultados corroboram com os obtidos na atividade de redução do NBT, sugerindo que a complexação da DHC em β CDs provoca alterações na capacidade e,

portanto, nos mecanismos de indução de diferenciação celular, sendo que a sua forma livre induz predominantemente diferenciação granulocítica, assim como o complexo DHC/BCD. Entretanto, o complexo DHC/HPβCD mostrou ser eficaz na indução de diferenciação monocítica.

Tabela 8. Análise da expressão de antígenos de superfície, CD14 e CD66b após diferentes tempos de exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre e complexada com BCDs.

MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO GRANULOCÍTICA E MONOCÍTICA: CD14 e CD66b (%)										
TRATAMENTOS (μM)	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (h)									
	06		12		24		48		72	
	CD14	CD66b	CD14	CD66b	CD14	CD66b	CD14	CD66b	CD14	CD66b
Controle	12,02 ± 1,09	10,65 ± 2,88	13,99 ± 1,09	13,96 ± 1,78	10,06 ± 3,33	10,70 ± 1,96	9,60 ± 3,99	10,78 ± 1,95	13,37 ± 2,28	11,12 ± 1,86
DHC 150	12,23 ± 2,89	15,76 ± 3,27*	24,24 ± 1,25*	33,72 ± 2,56*	49,43 ± 2,89*	11,77 ± 1,07	13,31 ± 2,02	16,39 ± 2,19*	9,21 ± 2,01	27,67 ± 2,01*
DHC 250	12,15 ± 2,01	17,39 ± 2,62*	25,59 ± 3,56*	16,64 ± 1,09	45,85 ± 2,61*	14,84 ± 4,06	9,38 ± 2,88	13,74 ± 3,71	8,35 ± 2,23	25,16 ± 1,92*
βCD/DHC 150	13,45 ± 1,87	16,95 ± 2,33*	35,46 ± 1,67*	11,81 ± 2,77	11,92 ± 2,18	17,05 ± 2,56*	9,94 ± 2,45	16,08 ± 3,20*	8,89 ± 3,01	16,09 ± 2,09*
βCD/DHC 250	17,10 ± 1,03	15,70 ± 1,82*	23,12 ± 1,52*	11,97 ± 4,21	10,97 ± 3,27	13,63 ± 3,05	9,16 ± 3,73	20,89 ± 4,02*	11,08 ± 4,23	16,65 ± 3,07*
βCD/DHC 400	14,02 ± 3,06	15,36 ± 1,02*	31,99 ± 3,26*	13,68 ± 3,89	10,42 ± 2,36	20,26 ± 2,67*	11,67 ± 3,95	24,11 ± 4,04*	11,41 ± 4,38	34,38 ± 3,26*
MeβCD/DHC 150	15,50 ± 1,44*	20,35 ± 2,72*	18,90 ± 4,03*	13,94 ± 3,26	12,05 ± 2,41	13,17 ± 2,59	11,81 ± 3,02	13,30 ± 3,39	11,71 ± 3,08	13,76 ± 4,42
MeβCD/DHC 250	12,70 ± 1,36	18,38 ± 3,22*	20,54 ± 2,61*	15,66 ± 1,23	12,12 ± 2,39	24,11 ± 1,06*	16,86 ± 3,92*	14,34 ± 2,09	12,42 ± 2,72	15,24 ± 2,24
MeβCD/DHC 400	12,02 ± 2,10	19,76 ± 3,28*	23,53 ± 2,29*	23,87 ± 2,61*	11,82 ± 2,91	13,30 ± 2,35	7,70 ± 2,85	14,45 ± 2,53	13,27 ± 2,35	34,15 ± 3,29*
OHpβCD/DHC 150	11,01 ± 3,02	15,79 ± 4,01*	11,60 ± 2,37	16,04 ± 1,34	7,12 ± 2,69	14,34 ± 2,39	12,28 ± 1,99	13,86 ± 2,37	12,88 ± 2,33	15,62 ± 1,82
OHpβCD/DHC 250	14,66 ± 2,77	18,10 ± 1,91*	14,04 ± 2,82	16,08 ± 1,79	13,41 ± 2,09	14,45 ± 2,66	8,74 ± 1,03	16,44 ± 2,56*	11,99 ± 1,72	15,88 ± 2,06
OHpβCD/DHC 400	14,70 ± 1,62	26,24 ± 1,07*	13,55 ± 1,20	17,11 ± 3,01*	7,79 ± 2,04	13,61 ± 2,03	11,62 ± 2,78	21,66 ± 2,67*	12,45 ± 2,44	33,76 ± 3,04*

Cada valor representa a média ± S.D. de três experimentos em três replicatas (* P<0,05).

CD14 (1)

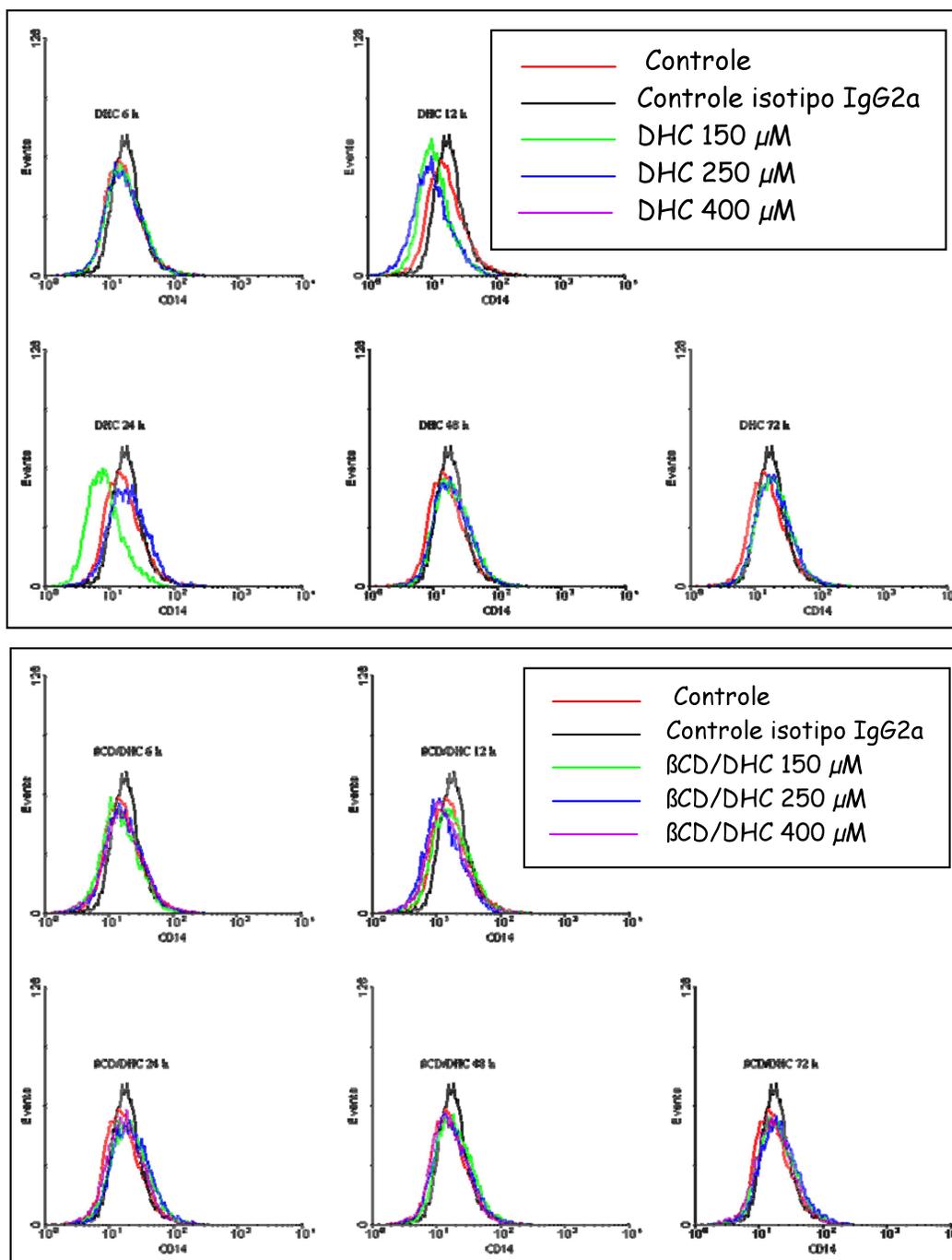


Figura 18. Análise da expressão de antígenos de superfície, CD14 (1) e CD66b (2) após exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre (a) e complexada com βCD (b), Me βCD (c) e HP βCD (d) durante 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8. **Continuação da figura na página seguinte.**

CD14 (1)

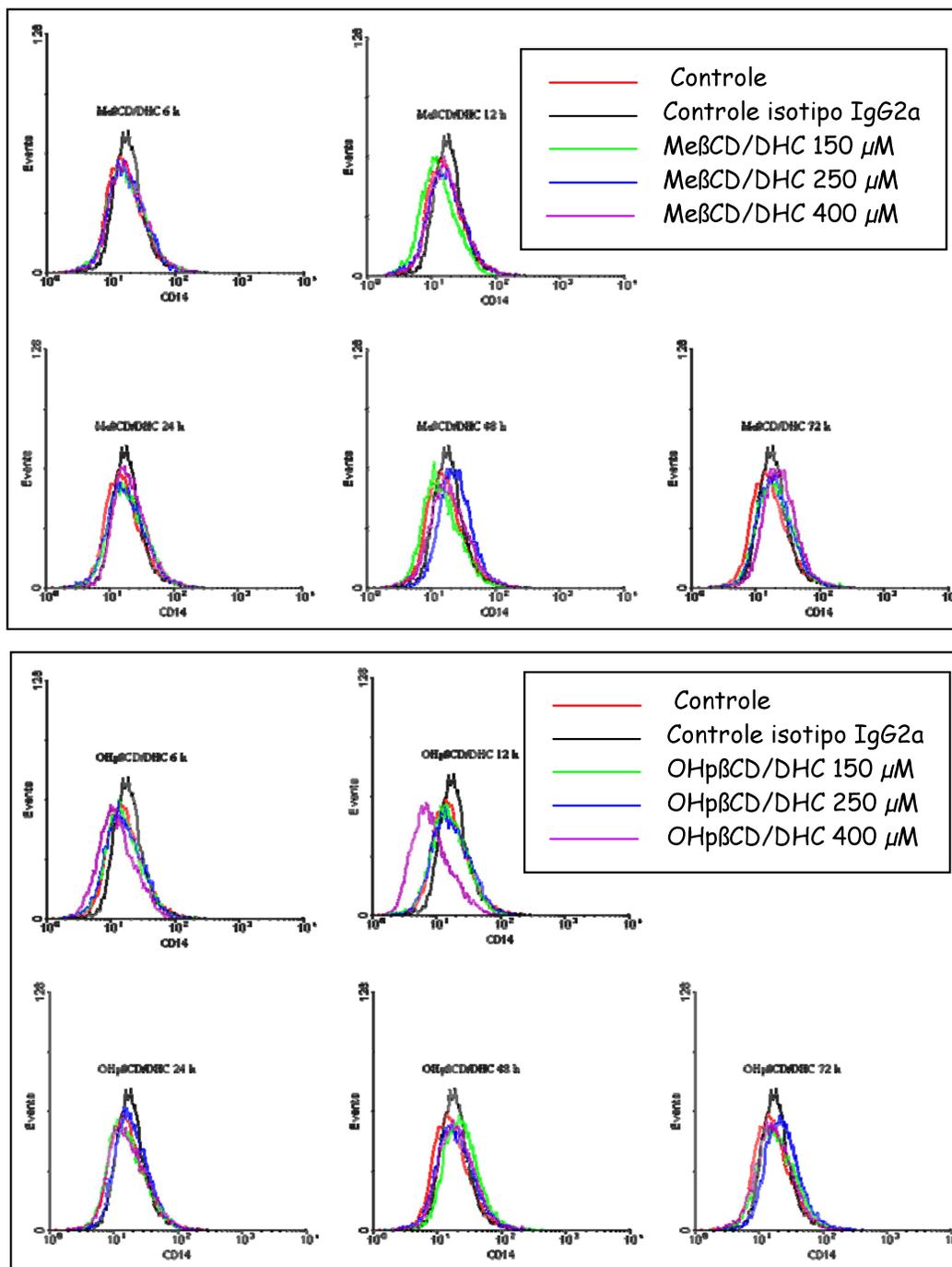


Figura 18. Análise da expressão de antígenos de superfície, CD14 (1) e CD66b (2) após exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre (a) e complexada com β CD (b), Me β CD (c) e HP β CD (d) durante 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8. **Continuação da figura na página seguinte.**

CD66b (2)

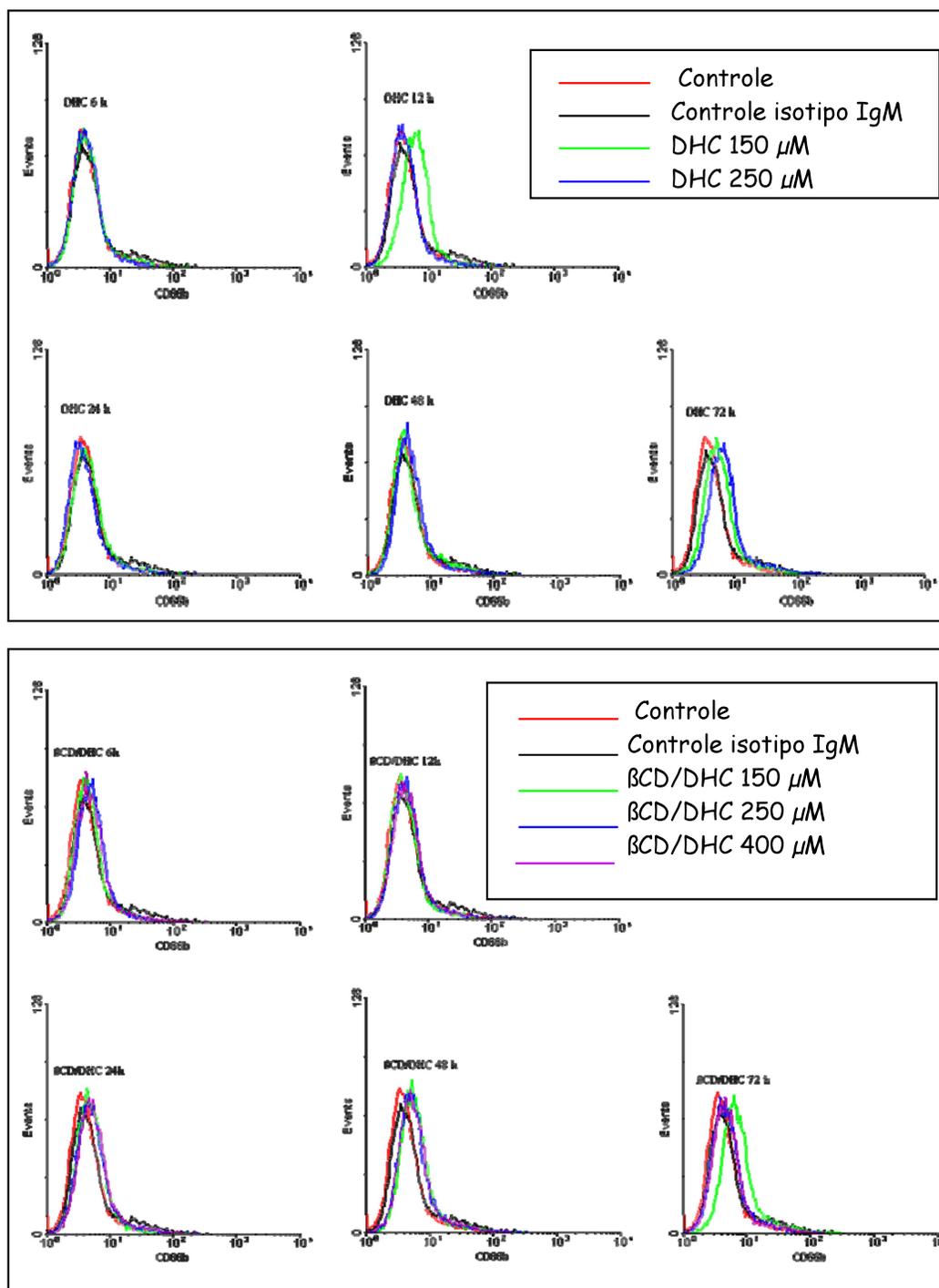


Figura 18. Análise da expressão de antígenos de superfície, CD14 (1) e CD66b (2) após exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre (a) e complexada com βCD (b), Me βCD (c) e HP βCD (d) durante 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8. **Continuação da figura na página seguinte.**

CD66b (2)

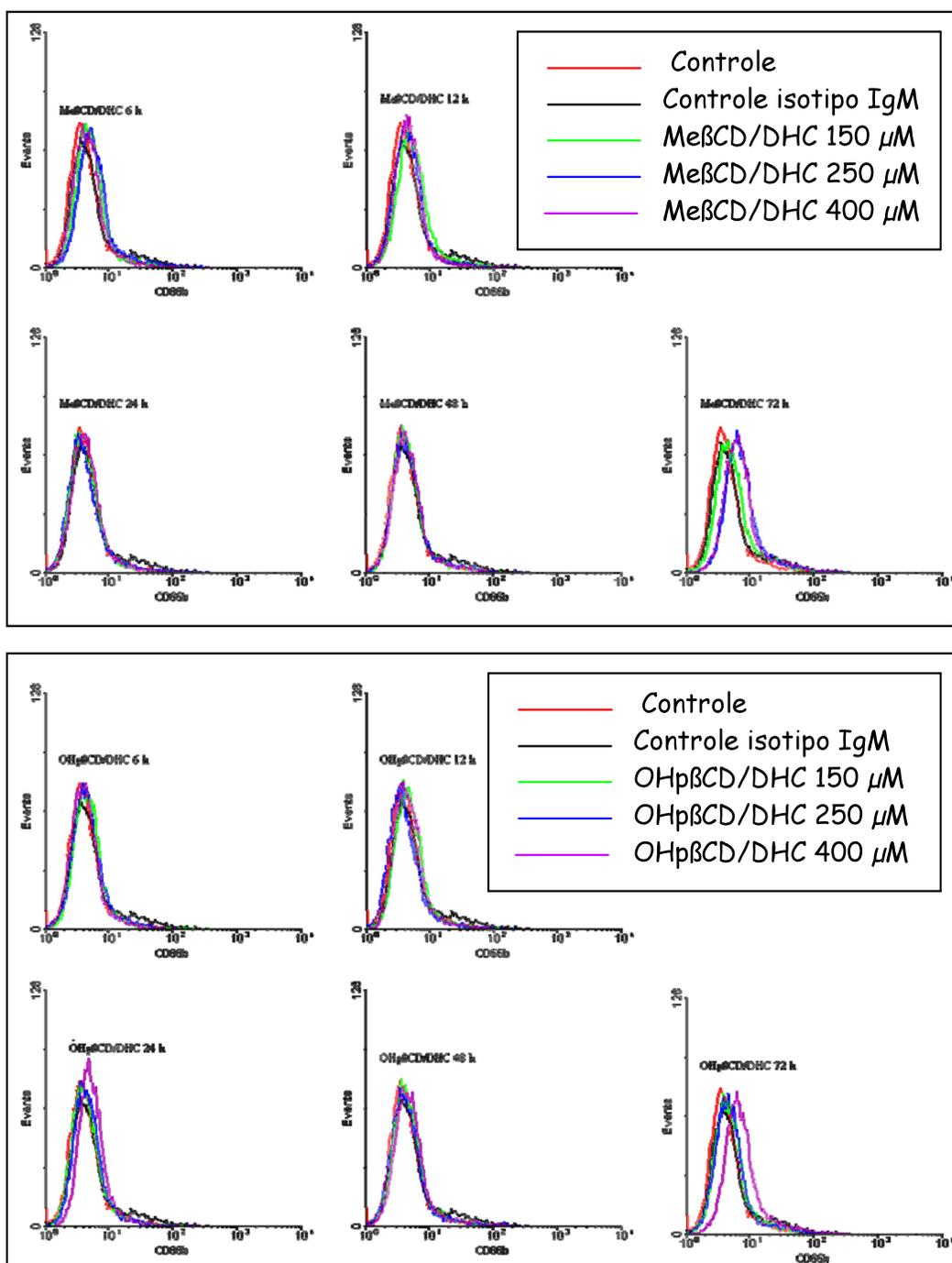


Figura 18. Análise da expressão de antígenos de superfície, CD14 (1) e CD66b (2) após exposição das células HL60 à DHC em sua forma livre (a) e complexada com β CD (b), Me β CD (c) e HP β CD (d) durante 6, 12, 24, 48 e 72 h. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8.

IV.3.2. Avaliação de indução de morte celular por apoptose

IV.3.2.1. Marcação com anexina V-FITC/PI

Em trabalhos recentes, Anazetti e colaboradores, (2003, 2004) mostraram que DHC é citotóxica, obtendo-se IC_{50} de 150 μ M e induz morte celular por apoptose em células HL60, evidenciada por alterações morfológicas características deste processo, incluindo condensação cromatínica, fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina. No entanto, Freire e colaboradores (2003), mostraram que a DHC 360 μ M induziu necrose em células HL60, provavelmente devido à alta concentração utilizada. Em trabalho recente, foi demonstrado que após 48 e 72 h de exposição das células HL60 à DHC em concentrações próximas ao valor de IC_{50} , 55 % das células estavam em processo de morte, detectadas e quantificadas utilizando a dupla marcação com anexina V-FITC/iodeto de propídeo (PI), seguida da análise em citometria de fluxo (Anazetti *et al.*, 2004).

Continuando os estudos de mecanismos de ação da DHC e de seus complexos em β CDs, com intuito de otimizar a atividade antitumoral deste fármaco, analisamos a eficácia dos complexos de inclusão em ciclodextrinas DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD na indução de morte celular por apoptose em células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena após diferentes tempos de tratamentos, na presença e ausência de 1 μ M de CsA, seguida de marcação com anexina V-FITC/PI e análise em citômetro de fluxo. As células da leucemia tratadas com DHC em sua forma livre e/ou complexada a β CDs foram marcadas com anexina V-FITC, com ou sem marcação simultânea por PI (Ann⁺/PI⁺ e Ann⁺/PI⁻, respectivamente). A medida das células marcadas por anexina V discrimina efetivamente entre células apoptóticas e necróticas quando marcadas simultaneamente com um corante de exclusão tal como o iodeto de propídeo. As células duplamente marcadas

representam um estágio tardio e até final de morte celular por apoptose, também chamado de necrose secundária (Vermes *et al.*, 2000).

A **tabela 9** mostra os resultados de indução de apoptose, dados em porcentagem de células apoptóticas após exposição por 12, 24, 48 e 72 h à DHC livre e seus complexos de inclusão DHC/BCD, DHC/MeBCD e DHC/HPBCD em células HL60 e U937. Para as células K562 e K562 Lucena os períodos de tratamentos foram de 48 e 72 h.

Os resultados obtidos (**tabela 9**) mostram que DHC em sua forma livre e complexada com BCDs, em concentrações próximas ao IC₅₀, induziram apoptose em células HL60, U937,

Tabela 9. Porcentagem de células em apoptose induzidas pela DHC, em sua forma livre e complexada com BCDs em diferentes tempos de exposição e concentrações.

Tratamentos (µM)	Células							
	HL60				U937			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Controle	12,0 ± 1	18,0 ± 2	20,6 ± 1	21,2 ± 1	15,9 ± 1	16,4 ± 1	17,4 ± 1	19,4 ± 2
DHC 150	27,3 ± 2*	28,1 ± 1*	38,1 ± 3*	44,5 ± 3*	25,1 ± 3*	26,9 ± 3*	29,6 ± 2*	37,6 ± 3*
DHC 250	28,9 ± 3*	32,0 ± 3*	45,4 ± 1*	51,9 ± 4*	28,6 ± 2*	29,8 ± 4*	37,1 ± 3*	41,9 ± 3*
BCD 250	16,3 ± 3	19,8 ± 1	18,0 ± 2	22,3 ± 2	16,9 ± 1	17,7 ± 2	19,9 ± 1	17,5 ± 2
DHC/BCD 150	21,9 ± 2*	23,8 ± 5*	24,3 ± 5	29,5 ± 6*	19,9 ± 1	23,7 ± 3*	23,4 ± 5*	24,2 ± 1
DHC/BCD 250	26,1 ± 1*	27,7 ± 4*	28,6 ± 5*	30,9 ± 4*	20,6 ± 3*	24,7 ± 4*	25,8 ± 5*	31,7 ± 4*
DHC/BCD 400	29,8 ± 3*	28,2 ± 5*	38,8 ± 4*	41,1 ± 5*	23,1 ± 3*	27,1 ± 3*	33,5 ± 6*	32,2 ± 5*
MeBCD 250	15,6 ± 1	17,3 ± 1	18,6 ± 2	23,5 ± 1	15,6 ± 2	17,5 ± 3	18,1 ± 2	18,4 ± 2
DHD/MeBCD 150	22,2 ± 3*	22,5 ± 3	23,8 ± 4	25,7 ± 3	21,3 ± 2*	24,1 ± 5*	24,3 ± 3	24,7 ± 4*
DHD/MeBCD 250	25,5 ± 2*	27,3 ± 4*	29,7 ± 5*	32,1 ± 2*	21,7 ± 4*	25,3 ± 6*	23,9 ± 4*	28,1 ± 5*
DHD/MeBCD 400	31,2 ± 2*	33,2 ± 5*	32,7 ± 3*	31,6 ± 4*	24,0 ± 1*	27,6 ± 2*	26,1 ± 4*	27,7 ± 5*
HPBCD 250	16,5 ± 4	19,4 ± 1	20,5 ± 1	19,5 ± 1	19,0 ± 2	18,5 ± 3	19,7 ± 2	19,4 ± 1
DHD/HPBCD 150	19,6 ± 3*	22,6 ± 2	24,8 ± 4*	31,8 ± 5*	19,8 ± 4	24,1 ± 2*	27,2 ± 4*	31,4 ± 3*
DHD/HPBCD 250	26,5 ± 1*	28,8 ± 3*	27,1 ± 2*	38,2 ± 5*	23,6 ± 6*	28,6 ± 2*	28,5 ± 3*	31,5 ± 1*
DHD/HPBCD 400	28,1 ± 2*	31,9 ± 2*	32,4 ± 1*	40,9 ± 3*	27,9 ± 4*	29,1 ± 4*	31,4 ± 1*	35,4 ± 3*
	K562				K562 LUCENA			
	48 h		72 h		48 h		72 h	
Controle	17,8 ± 1		19,5 ± 2		17,3 ± 2		20,1 ± 1	
DHC 150	51,7 ± 2*		84,2 ± 3*		44,1 ± 2*		52,1 ± 3*	
DHC 250	67,3 ± 2*		85,7 ± 2*		48,8 ± 1*		56,1 ± 2*	
BCD 250	19,9 ± 2		18,2 ± 1		17,5 ± 3		18,5 ± 4	
DHC/BCD 150	22,8 ± 3*		32,8 ± 2*		23,6 ± 4*		28,2 ± 2*	
DHC/BCD 250	28,0 ± 4*		48,3 ± 4*		24,1 ± 4*		29,5 ± 2*	
DHC/BCD 400	32,5 ± 4*		58,0 ± 4*		34,3 ± 3*		31,1 ± 3*	
MeBCD 250	19,0 ± 3		20,5 ± 2		18,6 ± 1		19,1 ± 1	
DHD/MeBCD 150	21,4 ± 5*		32,7 ± 3*		24,6 ± 2*		26,6 ± 2*	
DHD/MeBCD 250	26,4 ± 4*		41,4 ± 2*		25,1 ± 2*		25,7 ± 2*	
DHD/MeBCD 400	31,2 ± 4*		50,2 ± 3*		26,0 ± 4*		31,2 ± 3*	
HPBCD 250	18,5 ± 2		19,6 ± 2		19,5 ± 1		19,0 ± 1	
DHD/HPBCD 150	26,3 ± 3*		28,0 ± 3*		35,2 ± 2*		48,0 ± 3*	
DHD/HPBCD 250	36,8 ± 5*		43,4 ± 9*		38,5 ± 3*		50,9 ± 1*	
DHD/HPBCD 400	40,5 ± 5*		52,1 ± 4*		49,9 ± 4*		61,7 ± 2*	

Cada valor representa a média ± SD de três experimentos em quatro replicatas (*P<0,001 comparados ao controle).

K562 e K562 Lucena. Em todos os tratamentos, os complexos ou a DHC livre foram adicionados ao meio de cultura. Podemos observar, conforme **tabela 9**, que a DHC em sua forma livre foi mais eficiente quanto à indução de apoptose em células K562 após 48 e 72 h de exposição (cerca de 50 e 85 %, respectivamente) e sua menor eficiência foi em células U937, induzindo cerca de 25, 27, 30 e 38 % de apoptose após 12, 24, 48 e 72 h, respectivamente. Todas as β CDs puras (β CD, Me β CD e HP β CD) apresentaram indução semelhante aos controles negativos, o que corrobora com o comportamento das mesmas durante os experimentos de citotoxicidade. A DHC complexada em β CD apresentou eficácia semelhante nas células HL60, U937 e K562 Lucena em todos os tempos de tratamento, induzindo, em média, 21, 24, 24 e 27 %; 23, 26, 26 e 30 %; 26, 28, 35 e 35 % após 12, 24, 48 e 72 h de exposição a DHC/ β CD 150, 250 e 400 μ M, respectivamente, sendo que os tempos de 12 e 24 h correspondem somente às células HL60 e U937. Os complexos DHC/ β CD e DHC/Me β CD mostraram maior potencial com indutor de apoptose em células K562, chegando a cerca de 32 e 31 % de células em apoptose após 48 h e, em média, 60 e 50 % após 72 h de tratamento a 400 μ M, respectivamente.

Observando as porcentagens de células em apoptose após os tratamentos, pode-se observar que o complexo DHC/HP β CD, de forma semelhante aos experimentos de citotoxicidade, mostrou ser mais eficaz, se comparado aos outros complexos de inclusão contendo DHC, com potencial semelhante à DHC em sua forma livre, em todas as células em estudo, inclusive em células K562 Lucena, resistentes. A concentração mais efetiva na indução de apoptose pela DHC complexada em HP β CD foi semelhante à de DHC livre. Portanto, esses resultados mostram-se promissores em relação aos futuros estudos com a complexação de DHC em HP β CD.

IV.3.2.2. Conteúdo de DNA e análise do ciclo celular

Em estágios finais ou tardios de apoptose, as células liberam corpos apoptóticos, contendo organelas celulares e fragmentos de DNA, o que provoca a redução do conteúdo de DNA, restando nucleossomos remanescentes e fragmentos de DNA ainda associados à matriz nuclear (Sailer *et al.*, 1996). As células apoptóticas foram identificadas através da marcação deste DNA de conteúdo reduzido, como consequência da perda progressiva de DNA durante o processo apoptótico, utilizando o fluorocromo DNA específico, iodeto de propídeo (PI), seguido de análise por citometria de fluxo (Nicoletti *et al.*, 1991). No caso das células apoptóticas, a análise por citometria nos mostra uma subpopulação distinta precedendo a região G_0/G_1 de células diplóides normais (Nicoletti *et al.*, 1991). De maneira geral, esta técnica permite analisar a proporção de células em apoptose em cada fase do ciclo celular, assim como distinguir entre morte por apoptose e necrose induzida nas células após os diferentes tratamentos através da análise do conteúdo de DNA celular (Arends *et al.*, 1990; Vermes *et al.*, 2000).

A **tabela 10** mostra os resultados, dados em porcentagem, relativos à proporção de células em sub- G_1 (apoptose) após tratamento por 12 h com DHC e seus complexos DHC/BCD, DHC/MeBCD e DHC/HPBCD, com e sem pré-incubação por 1 h com ciclosporina A (CsA 1 μ M), inibidor da abertura de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTP).

Os resultados apresentados na **tabela 10** mostram que os complexos DHC/BCD, DHC/MeBCD e DHC/HPBCD induziram apoptose em células HL60 após 12 h de tratamento com eficiência semelhante à DHC livre, sendo que a proporção de células em sub- G_1 corresponde em média a 31, 32, 31 e 35 %, respectivamente. Esses resultados

corroboram com os obtidos anteriormente para marcação com anexina V-FITC. Por outro lado, em células U937, o complexo DHC/HPβCD mostrou maior eficácia na indução de apoptose (37 %) em relação aos outros complexos, DHC/βCD e DHC/MeβCD (proporção média de 29 e 34 %, respectivamente), aproximando-se à indução promovida pela ação da DHC em sua forma livre, que foi de 40 %, em média (**tabela 10**).

Tabela 10. Proporção de células em apoptose (sub-G₁) segundo análise do conteúdo de DNA após tratamentos por 0-12 h com (c/) e sem (s/) pré-incubação com ciclosporina A (CsA) marcação com PI, utilizando citometria de fluxo.

Tratamentos (μM)	CÉLULAS					
	HL60		U937		K562	
	s/	c/	s/	c/	s/	c/
1)Controle	19,01 ± 1,63	17,63 ± 1,63	18,74 ± 1,56	16,58 ± 1,55	18,41 ± 1,44	17,14 ± 2,30
2) DHC 150	29,80 ± 2,56*	26,44 ± 2,33*	31,31 ± 1,45*	20,32 ± 2,11	28,16 ± 2,25*	18,60 ± 2,50
3) DHC 250	39,80 ± 3,25*	27,81 ± 2,36*	44,44 ± 2,01*	22,47 ± 2,19*	40,85 ± 2,36*	21,56 ± 2,47*
4) βCD 250	20,14 ± 1,45	18,08 ± 2,22	17,59 ± 5,08	18,90 ± 2,10	19,28 ± 1,54	18,06 ± 2,19
5) DHC/βCD 150	25,88 ± 1,89	18,70 ± 3,05	ND			
6) DHC/βCD 250	27,46 ± 1,65*	23,53 ± 2,09*	29,07 ± 1,59*	20,46 ± 2,25	19,40 ± 1,47	19,54 ± 2,30
7) DHC/βCD 400	32,69 ± 1,47*	22,50 ± 2,11	26,67 ± 1,78*	23,84 ± 2,58*	22,08 ± 2,19	18,74 ± 2,15
8) MeβCD 250	19,08 ± 2,54	17,77 ± 3,06	18,57 ± 1,64	17,63 ± 2,14	19,23 ± 2,21	17,93 ± 2,66
9) DHC/MeβCD 150	26,92 ± 2,69*	22,74 ± 3,24	ND			
10)DHC/MeβCD 250	29,36 ± 2,47*	23,97 ± 3,89*	18,01 ± 4,51	19,29 ± 1,17	25,34 ± 2,06*	18,04 ± 2,77
11)DHC/MeβCD 400	33,83 ± 1,87*	24,91 ± 4,32*	33,80 ± 1,89*	22,12 ± 1,15*	30,56 ± 2,08*	19,63 ± 2,55
12)HPβCD 250	17,78 ± 1,40	17,85 ± 5,12	19,14 ± 1,42	19,21 ± 3,33	18,82 ± 3,09	16,86 ± 2,24
13)DHC/HPβCD 150	26,19 ± 1,56*	22,06 ± 2,47	ND			
14)DHC/HPβCD 250	29,58 ± 1,98*	21,38 ± 2,56	29,21 ± 3,20*	19,67 ± 2,18	19,45 ± 4,14	19,25 ± 2,06
15)DHC/HPβCD 400	32,76 ± 0,97*	24,56 ± 2,14*	36,89 ± 3,04*	22,06 ± 2,04*	25,68 ± 4,13*	20,43 ± 2,15

Cada valor representa a média ± S.D. de três experimentos em quatro replicatas. *ND = não foi realizado o tratamento nesta concentração (*P<0,001 comparado ao controle).

Dentre os complexos de inclusão em estudo, o mais eficaz na indução de apoptose em células K562, segundo análise do conteúdo de DNA, foi DHC/MeβCD (sub-G₁ corresponde à cerca de 30 %). Entretanto, a diferença em relação à indução promovida pelo complexo DHC/HPβCD, 26 % de células em apoptose, não foi significativa. Portanto, a indução de morte em ambos os tratamentos em células K562 foi semelhante, porém, menor

em relação à ação da DHC em sua forma livre (células em sub-G₁ correspondem, em média, a 40 %).

A CsA é inibidor da abertura de poros de PTP, que leva a dissipação do gradiente de prótons e, portanto, perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), assim como consequente liberação de citocromo c, que culmina na ativação de caspases efetoras do processo apoptótico. De acordo com os resultados mostrados na **tabela 10**, podemos observar que CsA não foi citotóxica, pois não houve diferença na proporção de células em apoptose nos controles quando pré-incubados ou não com a mesma. No entanto, o pré-cultivo das células com CsA induziu redução de cerca de 90 % na proporção de células U937 e K562 em sub-G₁, representando proteção significativa à indução de apoptose induzida pela DHC e por seus complexos na presença deste inibidor de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTP). Em células HL60 a proteção variou entre 66 a 85 % após tratamentos na presença de CsA, com DHC e DHC/HP β CD, respectivamente. Isto mostra que, de certa forma, os mecanismos envolvidos na indução de apoptose em células da leucemia, principalmente em células HL60, foram alterados após complexação, principalmente quanto a complexação com HP β CD. Como a ação da CsA está diretamente relacionada à inibição de PTP, a proteção à indução de apoptose após tratamentos na presença deste inibidor é diretamente proporcional ao envolvimento de PTP e consequentemente da via mitocondrial no mecanismo de ação dos complexos e DHC livre. Segundo Hirpara e colaboradores (2000) compostos com predileção pela via mitocondrial de indução de apoptose, incluindo a formação do complexo de poros de PTP e habilidade em translocar citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna, podem ser agentes antitumorais mais efetivos, pois a mitocôndria e moléculas envolvidas no processo

apoptótico podem constituir alvos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Portanto, estes resultados comprovam o total envolvimento da PTP e conseqüentemente da via mitocondrial na indução de apoptose pela DHC e seus complexos de inclusão.

A proporção de células em cada fase do ciclo celular após exposição à DHC e seus complexos está representada na **figura 19 (a-c)**. As **figuras 20, 21 e 22** contém os histogramas obtidos para as células HL60, U937 e K562, respectivamente, mostrando as alterações no ciclo celular após os tratamentos na presença e ausência de CsA, sendo que G₀-G₁, G₂-M e S indicam as fases do ciclo celular, e o conteúdo de DNA sub-G₁ refere-se à proporção de células em apoptose (**tabela 10**).

Falhas na maquinaria do ciclo celular e nos mecanismos apoptóticos apresentam papel importante tanto no desenvolvimento, quanto na resistência a agentes quimioterapêuticos. Um aumento nos conhecimentos dos eventos bioquímicos essenciais envolvidos na indução de apoptose por estresse citotóxico é importante para o desenvolvimento de formulações ou de fármacos quimioterapêuticos racionais. O tratamento de células tumorais com agentes citotóxicos, em geral, provoca alterações na maquinaria do ciclo celular resultando na indução de apoptose (Johnstone *et al.*, 2002). Os pontos de checagem do ciclo celular estabelecem o momento e a força de parada, reparo e respostas apoptóticas ao agente antitumoral (Liu *et al.*, 2004b). Estudos recentes sugerem que a indução de parada do crescimento celular na fase G₂/M e de apoptose, passo crítico na reversão de células tumorais, seja mediada por caspases, clivando proteínas com papel essencial neste processo de sinalização, tal como a p21 (Zhang *et al.*, 1999; Taylor, 2001). Podemos observar que o ciclo celular das células HL60, U937 e K562 sofreram alterações frente aos diferentes tratamentos com à DHC livre e seus complexos de inclusão, sendo que em geral ocorreu um aumento da população de células na fase G₀-G₁ concomitantemente com uma redução

de células na fase S de forma dose-dependente, seguida por um aumento significativo da população sub-G₁ após 12 h de exposição. Portanto, nossos resultados sugerem que a DHC e seus complexos induzem parada do ciclo celular em G₂/M e apoptose com envolvimento de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial. Portanto, esses resultados

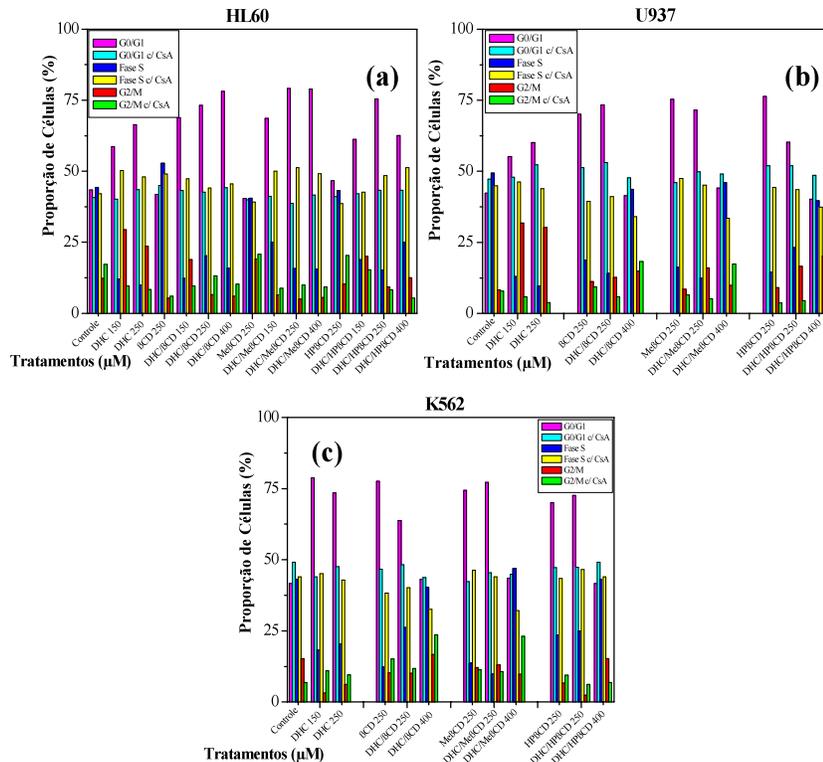


Figura 19. Proporção de células HL60 (a), U937 (b) e K562 (c) em cada fase do ciclo celular analisadas segundo o conteúdo de DNA (dados em porcentagem). As células foram cultivadas com DHC e seus complexos DHC/BCD, DHC/MeβCD e DHC/HPβCD, por 0-12 h, com e sem pré-incubação com ciclosporina A (CsA 1 μM) e marcadas com iodeto de propídeo (PI). O conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. G₀-G₁, G₂-M e S indicam as fases do ciclo celular. Cada fase do ciclo celular foi calculada utilizando o programa celular ModIFIT (10.000 eventos foram adquiridos). Três duplicatas de cada experimento foram realizados, obtendo-se resultados semelhantes.

corroboram com os obtidos anteriormente, indicando que a DHC e seus complexos de inclusão induzem parada do ciclo celular e subseqüentemente morte celular por apoptose dependente da via p53. Os efeitos desta via nas células não são completamente conhecidos, porém está claro que a função de ativação transcricional da p53 é seu principal efeito

biológico. Muitos genes alvos de p53 tem sido identificados. A parada do ciclo celular requer ativação de p21/WAF-1, GADD45 e ciclina G. proteínas pró-apoptóticas alvos de p53 são as da família Bcl-2 e alguns ligantes de receptores de morte celular.

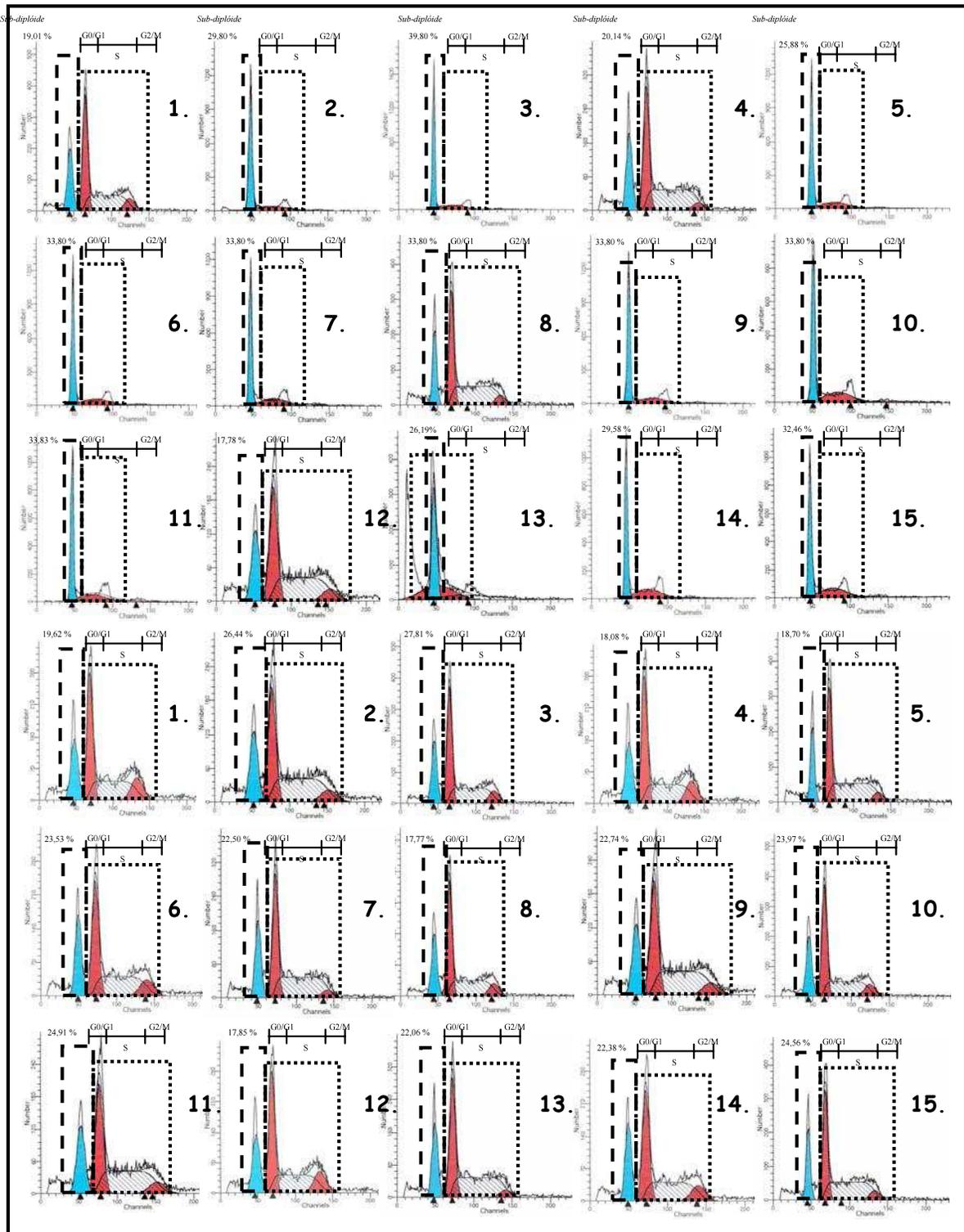


Figura 20. Histogramas citométricos células HL60 analisadas segundo o conteúdo de DNA. As células foram cultivadas com 1. Controle; 2. DHC 150 μ M; 3. DHC 250 μ M; 4. BCD 250 μ M; 5. DHC/BCD 150 μ M; 6. DHC/BCD 250 μ M; 7. DHC/BCD 400 μ M; 8. MeBCD 250 μ M; 9. DHC/MeBCD 150 μ M; 10. DHC/MeBCD 250 μ M; 11. DHC/MeBCD 400 μ M; 12. HPBCD 250 μ M; 13. DHC/HPBCD 150 μ M; 14. DHC/HPBCD 250 μ M; 15. DHC/HPBCD 400 μ M, por 0-12 h, com e sem pré-incubação com ciclossporina A (CsA 1 μ M) e marcadas com iodeto de propídeo (PI). O conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. G₀-G₁, G₂-M e S indicam as fases do ciclo celular, e o conteúdo de DNA sub-G₁ refere-se à proporção de células em apoptose (dado em porcentagem). Cada fase do ciclo celular foi calculada utilizando o programa celular ModiFIT (10.000 eventos foram adquiridos). Três duplicatas de cada experimento foram realizados, obtendo-se resultados semelhantes.

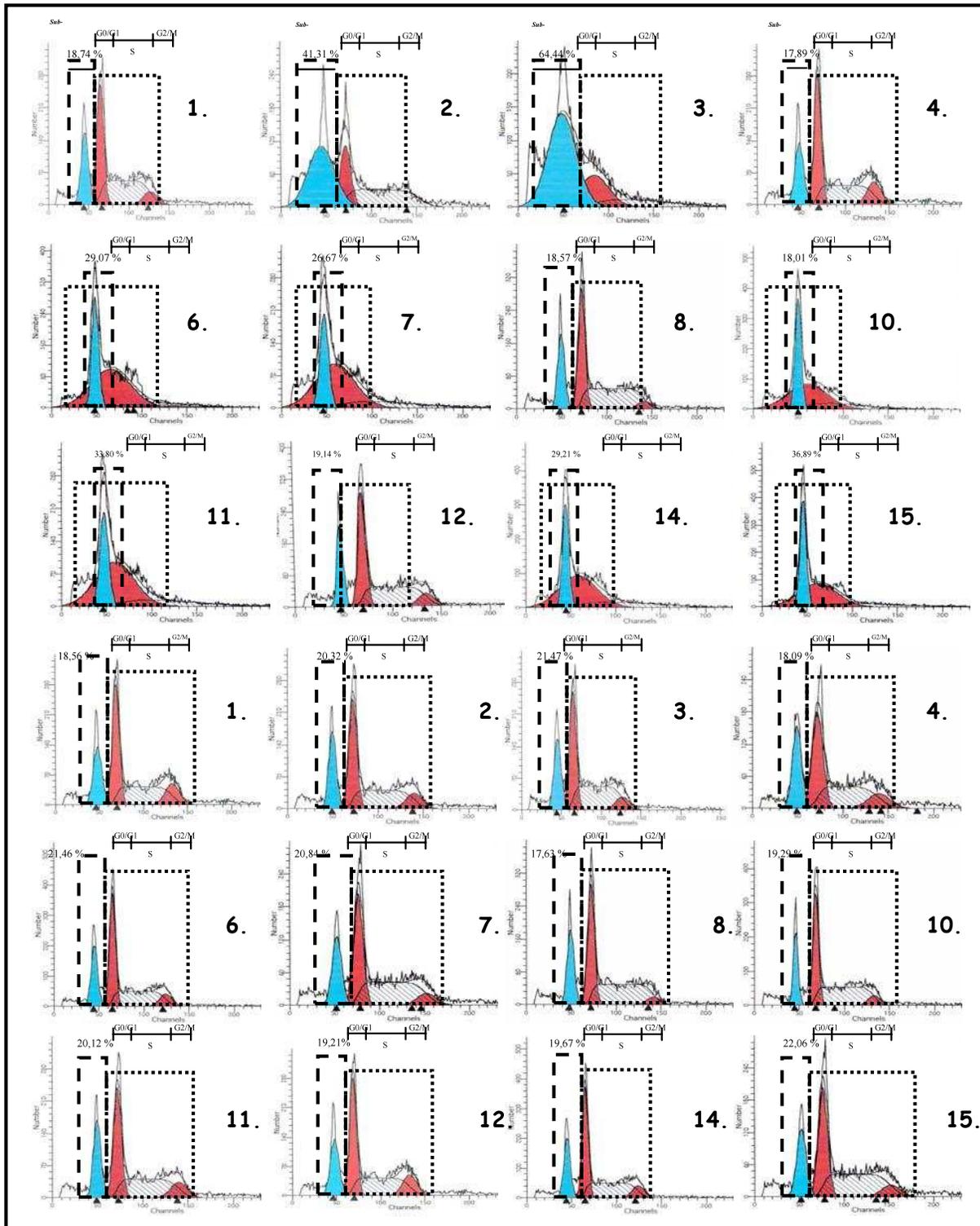


Figura 21. Histogramas citométricos células U937 analisadas segundo o conteúdo de DNA. As células foram cultivadas com 1. Controle; 2. DHC 150 μ M; 3. DHC 250 μ M; 4. BCD 250 μ M; 5. DHC/BCD 150 μ M; 6. DHC/BCD 250 μ M; 7. DHC/BCD 400 μ M; 8. MeBCD 250 μ M; 9. DHC/MeBCD 150 μ M; 10. DHC/MeBCD 250 μ M; 11. DHC/MeBCD 400 μ M; 12. HPBCD 250 μ M; 13. DHC/HPBCD 150 μ M; 14. DHC/HPBCD 250 μ M; 15. DHC/HPBCD 400 μ M, por 0-12 h, com e sem pré-incubação com ciclosporina A (CsA 1 μ M) e marcadas com iodeto de propídeo (PI). O conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. G₀-G₁, G₂-M e S indicam as fases do ciclo celular, e o conteúdo de DNA sub-G₁ refere-se à proporção de células em apoptose (dado em porcentagem). Cada fase do ciclo celular foi calculada utilizando o programa celular ModIFIT (10.000 eventos foram adquiridos). Três duplicatas de cada experimento foram realizadas, obtendo-se resultados semelhantes. ND = não foi realizado tratamento com os complexos na concentração de 150 μ M.

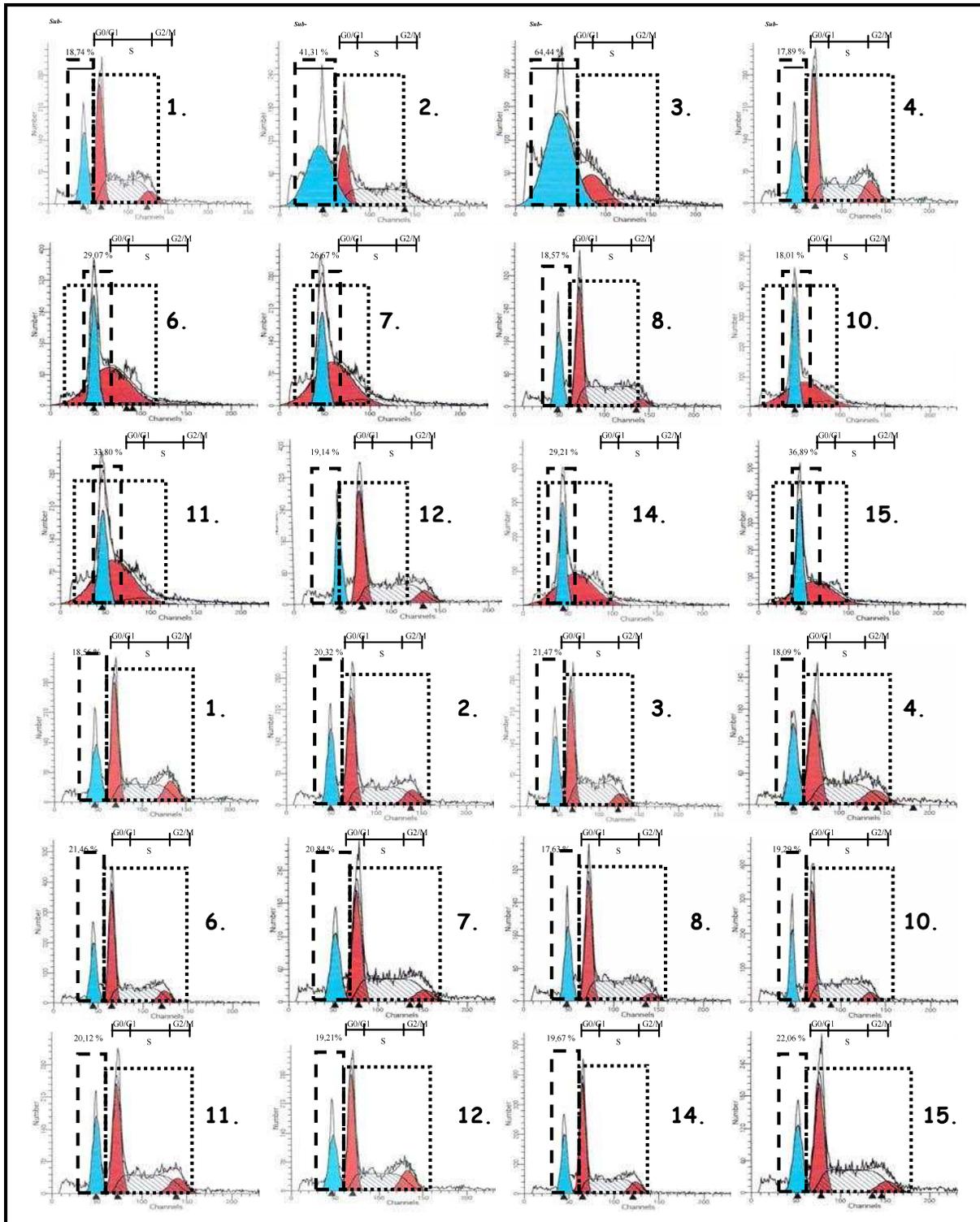


Figura 22. Histogramas citométricos células K5620 analisadas segundo o conteúdo de DNA. As células foram cultivadas com 1. Controle; 2. DHC 150 μ M; 3. DHC 250 μ M; 4. BCD 250 μ M; 5. DHC/BCD 150 μ M; 6. DHC/BCD 250 μ M; 7. DHC/BCD 400 μ M; 8. MeBCD 250 μ M; 9. DHC/MeBCD 150 μ M; 10. DHC/MeBCD 250 μ M; 11. DHC/MeBCD 400 μ M; 12. HPBCD 250 μ M; 13. DHC/HPBCD 150 μ M; 14. DHC/HPBCD 250 μ M; 15. DHC/HPBCD 400 μ M, por 0-12 h, com e sem pré-incubação com ciclosporina A (CSA 1 μ M) e marcadas com iodeto de propídeo (PI). O conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. G₀-G₁, G₂-M e S indicam as fases do ciclo celular, e o conteúdo de DNA sub-G₁ refere-se à proporção de células em apoptose (dado em porcentagem). Cada fase do ciclo celular foi calculada utilizando o programa celular ModIFIT (10.000 eventos foram adquiridos). Três duplicatas de cada experimento foram realizadas, obtendo-se resultados semelhantes. ND = não foi realizado tratamento com os complexos na concentração de 150 μ M.

IV.3.2.3. Detecção de p21/WAF-1

O supressor tumoral p53 é um sensor universal de estresse genotóxico que regula a transcrição de genes requeridos para promover a parada do ciclo celular e apoptose, tal como a proteína p21/WAF-1 GADD45, ciclina G, proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e alguns ligantes de receptores de morte (Colman *et al.*, 2000; Herr & Debatin, 2001). Os efeitos desta via nas células não são completamente conhecidos, porém está claro que a função de ativação transcricional da p53 é seu principal efeito biológico. A análise do ciclo celular das células HL60, U937 e K562 sofreram alterações frente aos diferentes tratamentos com a DHC livre e seus complexos de inclusão, sendo que em geral ocorreu um aumento da população de células na fase G₀-G₁ concomitantemente com uma redução de células na fase S de forma dose-dependente, seguida por um aumento significativo da população sub-G₁ após 12 h de exposição. Portanto, nossos resultados sugerem que a DHC e seus complexos induzem parada do ciclo celular em G₀-G₁. Com intuito de elucidar o papel da via p53 no mecanismo de ação da DHC e de seus complexos em ciclodextrinas (βCD/DHC, MeβCD/DHC e HPβCD/DHC) em células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena, foi avaliada a concentração de p21^{WAF-1} após 12 e 24 h de exposição na presença e ausência de ciclosporina A (1 μM). Os resultados foram expressos em relação à curva padrão pré-determinada em unidades de p21^{WAF-1}/mL (**figura 23**). DHC e seus complexos induziram aumento da expressão de p21^{WAF-1} em células da leucemia HL60, U937, K562, K562 Lucena, principalmente após 12 h de exposição, indicando que este é um evento inicial no processo de parada do ciclo celular e subsequente indução de morte celular. Em células HL60 a concentração de p21^{WAF-1} aumentou cerca de duas vezes em relação ao controle após 12 h de tratamento com os compostos em estudo, que foi mantido até 24 h de exposição (**figura 23**). A DHC, βCD/DHC, MeβCD/DHC e HPβCD/DHC

induziram aumento de duas, três, quatro e cinco vezes nos níveis de p21^{WAF-1} em células U937, respectivamente, até 12 h de exposição. Após 12 h de tratamento a concentração de p21^{WAF-1} foi reduzida não apresentando aumento significativo quando comparado ao controle. A concentração de p21^{WAF-1} em células K562 e K562 Lucena aumentou em até duas vezes após 12 h, que foi mantido até 24 h de tratamento nas células K562 Lucena. Pode-se observar que a pré-incubação com CsA 1 μ M, em geral, não alterou significativamente o efeito da DHC e de seus complexos quanto a indução de aumento na concentração de p21^{WAF-1}.

Falhas na maquinaria do ciclo celular e nos mecanismos apoptóticos apresentam papel importante tanto no desenvolvimento, quanto na resistência a agentes quimioterapêuticos. Um aumento nos conhecimentos dos eventos bioquímicos essenciais envolvidos na indução de apoptose por estresse citotóxico é importante para o desenvolvimento de formulações ou de fármacos quimioterapêuticos racionais. O tratamento de células tumorais com agentes citotóxicos, em geral, provoca alterações na maquinaria do ciclo celular resultando na indução de apoptose (Johnstone *et al.*, 2002). Os pontos de checagem do ciclo celular estabelecem o momento e a força de parada, reparo e respostas apoptóticas ao agente antitumoral (Elledge, 1996; Liu *et al.*, 2005; Gartel, 2005; Faria *et al.*, 2006). Estudos recentes sugerem que a indução de parada do crescimento celular nas fases G₁/G₂ e indução de apoptose, passo crítico na reversão de células tumorais, seja mediada por caspases, clivando proteínas essenciais neste processo de sinalização, tal como a p21/WAF-1 (Zhang *et al.*, 1999; Taylor, 2001). Portanto, podemos concluir que nossos resultados corroboram com os obtidos anteriormente, sugerindo que a DHC e seus complexos de inclusão induzem parada do ciclo celular e subsequentemente morte celular por apoptose dependente da via

p53 e independente da via mitocondrial, uma vez que a pré-incubação com ciclosporina A não alterou a expressão da p21^{WAF-1}.

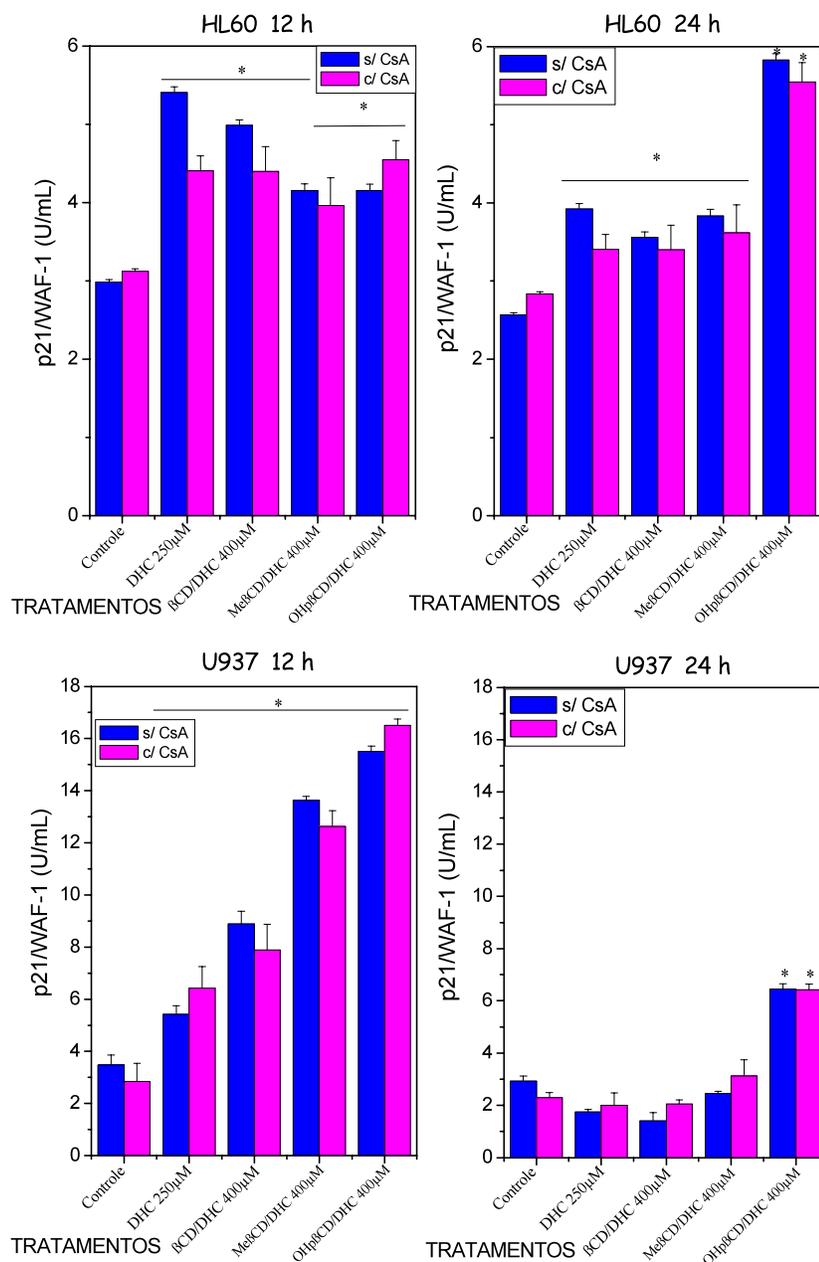


Figura 23. Detecção de proteína p21/WAF-1 durante o processo apoptótico em células HL60 e U937 expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre (250 µM) e complexada em βCDs (βCD/DHC, MeβCD/DHC e OHβCD/DHC: 400 µM) por 12 e 24 h. O nível de p21/WAF-1 foi determinado por em U/mL. Cada valor representa média ± SD de três experimentos em triplicata (*P<0.01). **Continuação da figura na página seguinte.**

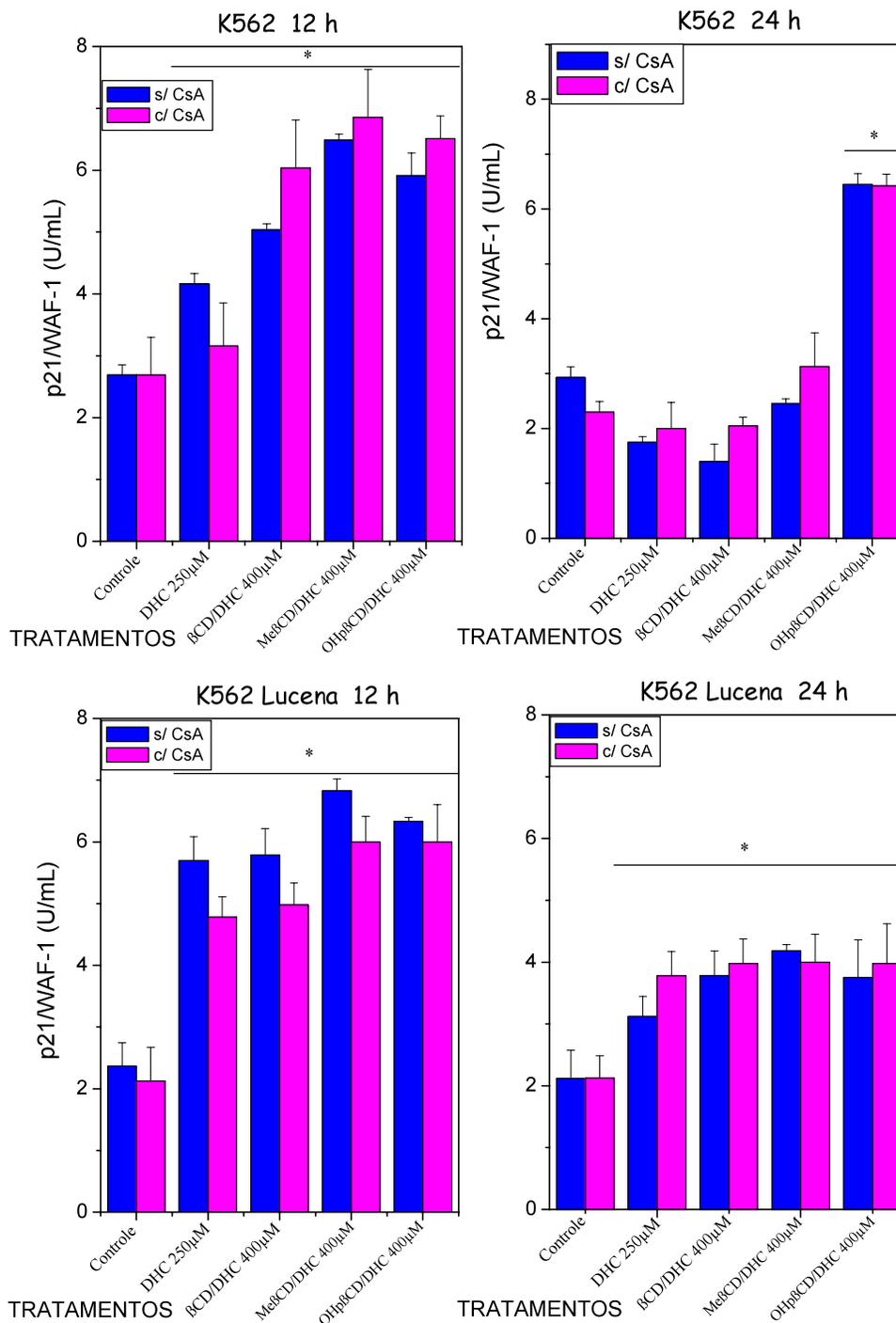


Figura 23. Detecção de proteína p21/WAF-1 durante o processo apoptótico em células K562 e K562 Lucena expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre (250 µM) e complexada em βCDs (βCD/DHC, MeβCD/DHC e OHβCD/DHC: 400 µM) por 12 e 24 h. O nível de p21/WAF-1 foi determinado por em U/mL. Cada valor representa média ± SD de três experimentos em triplicata (*P<0.01). **Continuação da figura na página seguinte.**

IV.3.2.4. Ativação de Caspases em células HL60

A maioria dos indutores de apoptose com envolvimento de estresse oxidativo podem desencadear esse processo por ativação de caspases (Anazetti *et al.*, 2004). Para determinar quais caspases são ativadas durante apoptose induzida em células HL60, estas foram incubadas com a DHC em sua forma livre e complexada a β CDs (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) em diferentes concentrações por 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados apresentados na **figura 24 (a-e)** mostram que as caspases-2 (a), -3 (b), -6 (c), -8 (d) e -9 (e) foram ativadas, tanto pela forma livre da DHC quanto por seus complexos. A caspase-2 (**figura 24 (a)**) apresentou-se mais ativa após 24 e 12 h de exposição à DHC e DHC/Me β CD, respectivamente, embora tenha sido a caspase menos ativa em células HL60 após os tratamentos realizados. A caspase-3 (**figura 24 (b)**) chegou a ter sua atividade aumentada em cerca de 3,5 vezes após tratamento com DHC e seus complexos. Porém, a DHC complexada em β CD apresentou menor eficácia na ativação de caspases quando comparada aos outros. Em relação à atividade de caspase-6 (**figura 24 (c)**), todos os complexos e a DHC apresentaram-se semelhantemente eficazes na ativação dessa cisteína protease, principalmente após 12 h de exposição. O mesmo efeito foi observado para caspase-9 (**figura 24 (e)**). A caspase-8 chegou a 2,75 vezes mais ativa em relação aos controles após 12 h de exposição à DHC e seus complexos e manteve-se ativa até 24 h de tratamento. O complexo DHC/ β CD mostrou maior eficácia na indução de ativação dessa caspase, pois mesmo após 24 h de exposição houve aumento na atividade enzimática (**figura 24 (d)**). Esses resultados permitem relacioná-los com outros eventos envolvidos no processo apoptótico, em alguns casos dependentes da atividade de caspases.

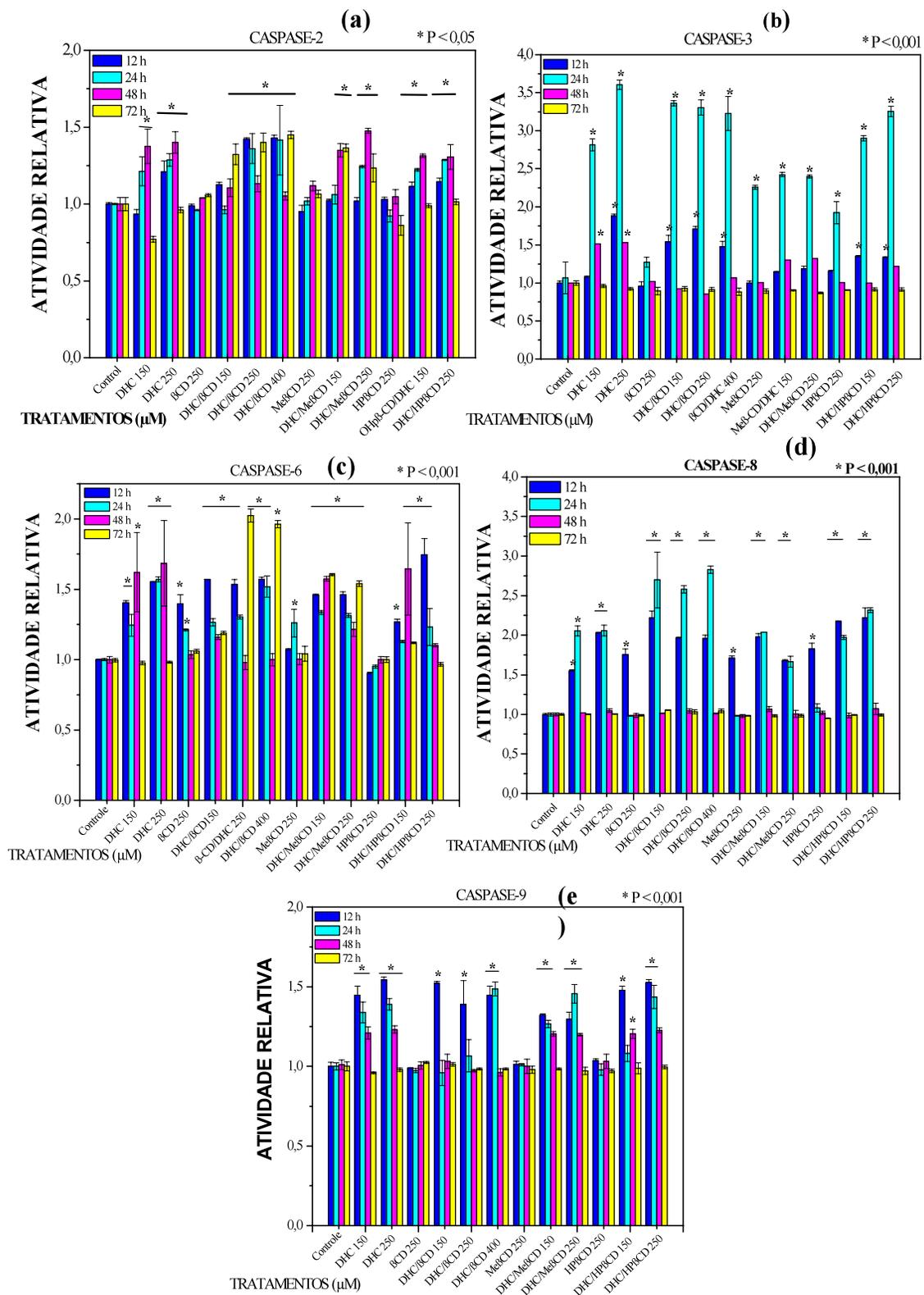


Figura 24. Ativação de caspases-2 (a), -3 (b), -6 (c), -8 (d) e -9 (e) em células HL60 após exposição à DHC e seus complexos em βCDs em diferentes concentrações por 12, 24, 48 e 72 h. Os dados representam a média ± SD de três experimentos realizados em triplicata. (*P<0,001, comparados ao controle).

Alguns trabalhos mostraram que as caspases podem ter papel fundamental no controle da permeabilidade mitocondrial, que tem como consequência a liberação de citocromo c e formação do apoptossomo no citoplasma. Esse complexo leva a ativação de outras caspases efetoras, tais como caspases-9, -3, -6, -2 e -8, respectivamente. A caspase-8 também está relacionada a via de apoptótica dependente de receptores de morte (Lassus *et al.*, 2002). Portanto, nossos resultados evidenciam um padrão de ativação de caspases característico da via mitocondrial de indução de apoptose, com possível participação da via receptores de superfície, devido à indução de ativação de caspase-8.

IV.3.2.5. Liberação de citocromo c

A via mitocôndria-dependente envolve atividade de caspase-8 na clivagem e heterodimerização de proteínas pró-apoptóticas (Bax) que interagem com canais aniônicos voltagem-dependentes (VDAC) na membrana mitocondrial externa (MME), resultando na liberação de citocromo-c e ativação de caspases-3 e -9 (Reed, 1997; Brás *et al.*, 2005).

As **figuras 25 e 26 (ambas de a-d)**, representam os resultados de liberação de citocromo c após tratamento das células HL60, U937, K562 e K562 Lucena com DHC em sua forma livre e complexada a β CDs (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) em diferentes concentrações por 12 e 48 h, com e sem pré-incubação com CsA. Na **figura 25**, podemos comparar os resultados com a curva padrão, sendo que os gráficos estão em concentração de citocromo c (ng/mL) por D.O. (Abs). Podemos observar que há uma concentração de pontos na região superior dos gráficos, próximos a 10 e 20 ng/mL de citocromo c. Estes pontos correspondem aos tratamentos em células HL60, U937, K562 e K562 Lucena com DHC e seus complexos após 12 e 48 h na ausência de CsA. Por outro lado, os pontos correspondentes aos tratamentos realizados na presença de CsA (12 e 48 h) em todas as células em estudo, concentram-se na região mediana do gráfico, de concentração próxima

de 1,25 ng/mL de citocromo c liberado. Foi obtido um padrão de liberação semelhante em todas as células analisadas, com algumas variações, que podem ser melhor analisadas utilizando a **figura 26 (a-d)**.

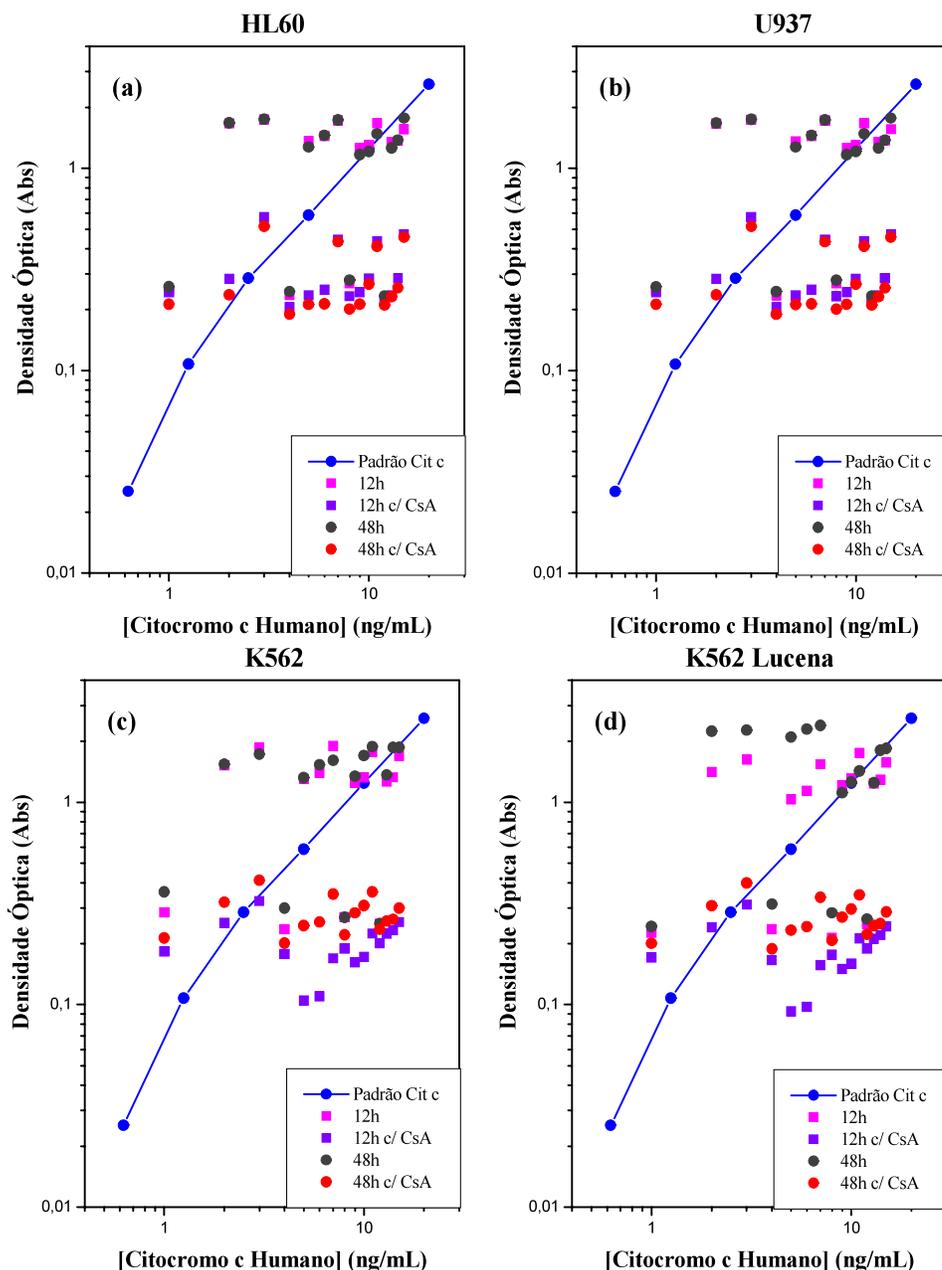


Figura 25. Liberação de citocromo c a partir de membrana mitocondrial interna de células HL60 (a), U937 (b), K562 (c) e K562 Lucena (d) após tratamentos 1. Controle; 2. DHC 150 μ M; 3. DHC 250 μ M; 4. β CD 250 μ M; 5. DHC/ β CD 150 μ M; 6. DHC/ β CD 250 μ M; 7. DHC/ β CD 400 μ M; 8. Me β CD 250 μ M; 9. DHC/Me β CD 150 μ M; 10. DHC/Me β CD 250 μ M; 11. DHC/Me β CD 400 μ M; 12. HP β CD 250 μ M; 13. DHC/HP β CD 150 μ M; 14. DHC/HP β CD 250 μ M; 15. DHC/HP β CD 400 μ M. Os tempos de exposição foram de 12 e 48 h na presença e ausência de ciclosporina (CsA) 1 μ M. Cada ponto representa a média de três experimentos realizados em triplicata.

A **figura 26** também representa os dados de liberação de citocromo c a partir de MMI de células HL60 **(a)**, U937 **(b)**, K562 **(c)** e K562 Lucena **(d)** após tratamentos com DHC (150 e 250 μM) e seus complexos, DHC/ βCD , DHC/Me βCD e DHC/HP βCD (150, 250 e 400 μM), 12 e 48 h de exposição na presença e ausência de CsA 1 μM . Os dados de D.O. (densidade óptica) estão apresentados de forma normalizada em relação ao controle, mostrando que a liberação de citocromo c foi mais intensa após 48 h em todas as células, principalmente em HL60. De maneira geral, a indução de liberação de citocromo c foi semelhante quando comparamos a eficácia da DHC em sua forma livre com seus complexos de inclusão. Porém, em células K562 Lucena, o complexo DHC/Me βCD mostrou ser tão ou mais eficiente do que a DHC livre, chegando a induzir liberação em cerca de 10 vezes mais em relação ao controle, enquanto a DHC induziu um aumento de 9 vezes na concentração de citocromo c liberado. Nessas células com fenótipo resistente, os complexos DHC/ βCD e DHC/Me βCD induziram um aumento de 6 e 7 vezes na concentração de citocromo c, respectivamente. A pré-incubação com CsA inibiu pouco a liberação de citocromo c (cerca de 80 %) após exposição aos complexos e à DHC livre.

Após estímulo apoptótico, a homo (Bax/Bax) ou heterodimerização (Bax/Bcl-2) de proteínas Bax no citoplasma, resulta na translocação dessas para a mitocôndria, onde interagem com canais VDAC, que podem ser inibidos por ciclosporina-A, provocando a formação de poros de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial interna (PTP). PTP mitocondrial causa aumento de permeabilidade de membrana mitocondrial e consequente dissipação do gradiente de prótons (H^+) e, portanto, despolarização ou perda de potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) e “swelling” osmótico, devido à alta concentração de solutos na matriz mitocondrial.

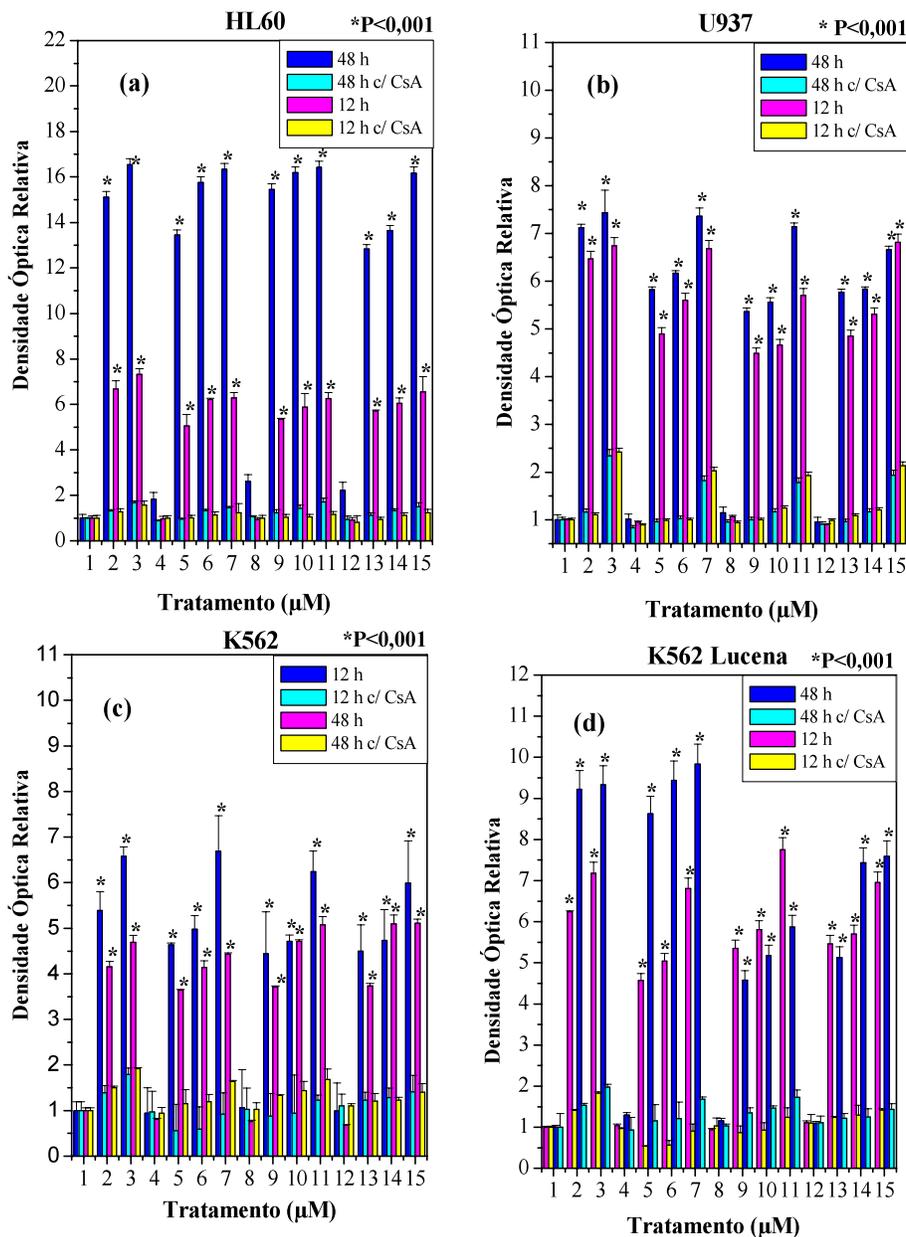


Figura 26. Liberação de citocromo c a partir de membrana mitocondrial interna de células HL60 (a), U937 (b), K562 (c) e K562 Lucena (d) após tratamentos 1. Controle; 2. DHC 150 µM; 3. DHC 250 µM; 4. BCD 250 µM; 5. DHC/BCD 150 µM; 6. DHC/BCD 250 µM; 7. DHC/BCD 400 µM; 8. Me.BCD 250 µM; 9. DHC/MeBCD 150 µM; 10. DHC/MeBCD 250 µM; 11. DHC/MeBCD 400 µM; 12. HPBCD 250 µM; 13. DHC/HPBCD 150 µM; 14. DHC/HPBCD 250 µM; 15. DHC/HPBCD 400 µM. Os tempos de exposição foram de 12 e 48 h na presença e ausência de ciclosporina (CsA) 1 µM. Cada ponto representa a média de três experimentos realizados em triplicata (* P<0,001 em relação ao controle).

O complexo de poros de PTP mitocondrial (CPPT) é composto de um translocador do nucleotídeo adenosina e os canais VDAC, ambos alvos de vários indutores pró-apoptóticos. Entretanto, alguns autores mostraram que o citocromo c pode ser liberado a partir da membrana mitocondrial interna antes da despolarização da mesma e, portanto, antes da abertura de PTP (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2005). Além disso, muitas caspases podem induzir diretamente PTP mitocondrial, sugerindo que a seqüência de eventos pode implicar liberação de citocromo c, seguido pela ativação de caspases e posteriormente, eventos proteolíticos induzidos por caspases desencadeiam PTP (Reed, 1997; Susin *et al.*, 1997; Lassus *et al.*, 2002). A liberação de citocromo c resulta na formação do apoptossomo, consistindo de fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1) e procaspase-9, que é ativada à caspase-9 por dATP. Caspase-9 iniciadora leva a ativação de caspases efetoras, tais como caspases-3 ou -7, que clivam um inibidor de DNase ativado por caspase, produzindo poly (ADP-ribose) polimerase (PARP), resultando na fragmentação de DNA característica da morte celular por apoptose (Reed, 1997; Cain *et al.*, 2002; Lacour *et al.*, 2003; Scorrano *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Khosravi-Far & Esposti, 2004 Fischer & Schulze-Osthoff, 2005; Kim, 2005). Outros autores sugerem que a liberação de citocromo c ocorra sem perda de PMM (Yang *et al.*, 2005) ou até antes da perda de $\Delta\psi_m$, portanto, pode preceder a abertura de poros de PTP mitocondrial (Kelso *et al.*, 2001; Finkel, 2001; Stoetzer *et al.*, 2002; Renner *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004a; Bras *et al.*, 2005). Associando os resultados de análise de $\Delta\psi_m$ e liberação de citocromo c, podemos sugerir que em células HL60, a liberação ocorra depois da despolarização mitocondrial, porém em algum momento esses eventos ocorrem concomitantemente. Por outro lado, em células K562 e K562 Lucena, a liberação de citocromo c parece ocorrer sem ou com pouca alteração no potencial de

membrana mitocondrial. Em células U937, precisaríamos fazer análise de $\Delta\Psi_m$ após tempos de exposição inferiores a 48 h para comparar com os resultados de liberação de citocromo c, porém com os resultados obtidos podemos sugerir que os eventos são concomitantes e dose-tempo-dependentes.

Portanto, podemos concluir parcialmente com os resultados analisados até o momento que estes evidenciam a indução de apoptose e de diferenciação terminal em células da leucemia pelos complexos e DHC em estudo. Dentre as vias de indução apoptótica, os dados mostram que o mecanismo de ação dos complexos e da DHC é dependente da via mitocondrial, envolvendo transição de permeabilidade de membrana mitocondrial, despolarização mitocondrial, liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna e ativação de caspases. Esses mecanismos foram mantidos e em alguns aspectos, intensificados quanto à eficácia, após complexação em β CDs.

IV.3.2.6. Detecção de Bcl-2

A família de genes Bcl-2 compreende importantes reguladores positivos e negativos das vias de morte celular. A proteína antiapoptótica Bcl-2 tem capacidade de bloquear apoptose desencadeada por muitos agentes citotóxicos. Baseado nestas observações pode-se sugerir funções para Bcl-2 em comum a diferentes vias de sinalização apoptóticas (Voehringer, 1999; Renner *et al.*, 2003). Tendo em vista os resultados prévios demonstrando a atuação da DHC e de seus complexos de inclusão no estresse oxidativo mediando a ativação da via mitocondrial de indução de apoptose, detectamos a proteína Bcl-2 em células da leucemia HL60, U937, K562 E K562 Lucena após tratamento com DHC e seus complexos (β CD, Me β CD e HP β CD) por 12 e 48 h de exposição com e sem pré-incubação com ciclosporina A. Os resultados foram expressos em relação à curva padrão pré-determinada em unidades

de Bcl-2/mL (**figura 27**). DHC e seus complexos induziram redução da expressão de Bcl-2 em células da leucemia HL60, U937, K562, K562 Lucena, principalmente após 12 h de exposição. Em células HL60 a concentração de Bcl-2 reduziu de 115 U/mL (controle) para 22,8; 12,8; 56,2 e 15,0 U/mL após tratamentos por 12 h com DHC, β CD/DHC, Me β CD/DHC e HP β CD/DHC, respectivamente. O tratamento por 24 h mostrou menor diminuição no nível de Bcl-2, de 100 U/mL nas células controle a 40 U/mL nas células expostas à DHC e seus complexos (**figura 27**). As células U937 apresentaram uma redução similar nos níveis de Bcl-2 após exposição aos complexos de inclusão contendo DHC de 100 U/mL (controle) a 40 U/mL (tratados). Após 24 h de tratamento com Me β CD/DHC e OHp β CD/DHC, a concentração de Bcl-2 foi de 75,0 e 67,5 U/mL, sendo que o controle apresentou níveis de Bcl-2 de 100 U/mL. A concentração de Bcl-2 em células K562 foi reduzida a 10 e 40 U/mL após 12 e 24 h, respectivamente, em relação ao controle (60 U/mL). Nas células K562 Lucena a concentração de Bcl-2 diminuiu de 75 U/mL, obtida para o controle a 10 U/mL nas células expostas por 12 h à DHC, β CD/DHC e Me β CD/DHC e a 50 U/mL após tratamento com HP β CD/DHC. Após 24 h de todos os tratamento das células K562 Lucena, foi obtido uma redução de 100 para 40 U/mL de Bcl-2 (controle e tratados, respectivamente). Podemos observar que a pré-incubação com CsA (1 μ M) em todos os tratamentos não interferiu na redução da concentração de Bcl-2 induzida pela DHC e seus complexos de inclusão, exceto em células K562 Lucena, onde foi obtida proteção de 30% após 24 h de tratamento, e em células U937, após 12 h de exposição à OHp β CD/DHC, onde CsA induziu 60% de proteção à ação do tratamento. As proteínas Bcl-2 apresentam efeitos inibitórios na apoptose boqueando a liberação de citocromo c e a perda de potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos mostraram regular, induzindo redução no nível de expressão de Bcl-2 no processo de morte

celular em células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena (**figura 27**), confirmando resultados mostrados em outros tipos celulares (Hartmann, *et al.*, 1999). Portanto, a DHC e seus complexos de inclusão induzem apoptose dependente e independente de Bcl-2 em células da leucemia. Somente a DHC em sua forma livre mostrou indução de apoptose totalmente independente de Bcl-2 (**figura 27**). Este resultado é consistente com ação de dexametasona em outras células de mielomas (Bold, *et al.*, 1999; Renner *et al.*, 2003). A proteína Bcl-2 é uma reguladora de canais, transportadores e poros, conhecida pela sua localização em múltiplos compartimentos celulares (mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear). Na mitocôndria, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 regula um dos mecanismos e transição de permeabilidade de membrana mitocondrial via formação de um mega-canal mitocondrial. A inibição da abertura deste canal pode bloquear a liberação de citocromo c e de fator indutor de apoptose (AIF). Bcl-2 também regula a ativação de caspases executoras do processo apoptótico, com função central associada com o controle da permeabilidade mitocondrial a íons. A DHC e seus complexos em β CDs induziram perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que refletiu na permeabilização da MMI (Coultas & Strasser, 2003). O declínio do $\Delta\psi_m$ foi relacionado com a abertura de PTPP, provocando a liberação de citocromo c, uma das proteínas ativadoras de caspases. A queda no $\Delta\psi_m$ precede a maioria das alterações no potencial redox intracelular (EROS), um determinante importante na transdução de sinais apoptóticos (Hartmann *et al.*, 1999; Hockenbery *et al.*, 1993; Cadenas and Davies, 2000; Liu *et al.*, 2004a). Além disso, a liberação de citocromo c foi bloqueada pela ação de CsA, inibidor da abertura de PTPP, que não alterou a concentração de Bcl-2 em células da leucemia. Os resultados obtidos até o momento sugerem que a depleção de GSH induz aumento na produção de EROS endógeno suficiente para induzir transição de permeabilidade de

membrana mitocondrial, via formação de poros inespecíficos e ruptura da MMI, como resultado de swelling mitocondrial. Em associação a esta via os resultados de detecção de Bcl-2 sugerem a indução da segunda via de indução de transição de permeabilidade através da formação de poros constituídos por oligômeros de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, que translocam-se à mitocôndria na presença de estímulo apoptótico. Além disso, os resultados da análise de cálcio intracelular reforçam os resultados encontrados relacionados com o mecanismo de indução de permeabilização mitocondrial causado pela ação da DHC e de seus complexos de inclusão em β CDs. A consequência da permeabilização da MMI é a liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais pelos poros, que comportam-se como canais voltagem-dependente, ativos pela concentração aumentada de Ca^{+2} na matriz mitocondrial mediada pelo estresse oxidativo (Weis *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 2001; Orrenius *et al.*, 2003; Dasmahapatra *et al.*, 2006). Portanto, a ativação das duas vias de permeabilização intensifica os efeitos da DHC e de seus complexos. Além disso, Bcl-2 parece estar envolvido na regulação, no nível nuclear, do transporte de fatores de transcrição através de poros, assim como no sequestro de cálcio e de GSH via mecanismo desconhecido. Mecanismos semelhantes em relação ao sequestro de cálcio no retículo endoplasmático, local de estocagem intracelular de Ca^{+2} , pode ser regulado por Bcl-2 (McConkey *et al.* 1997; Voehringer *et al.*, 1999).

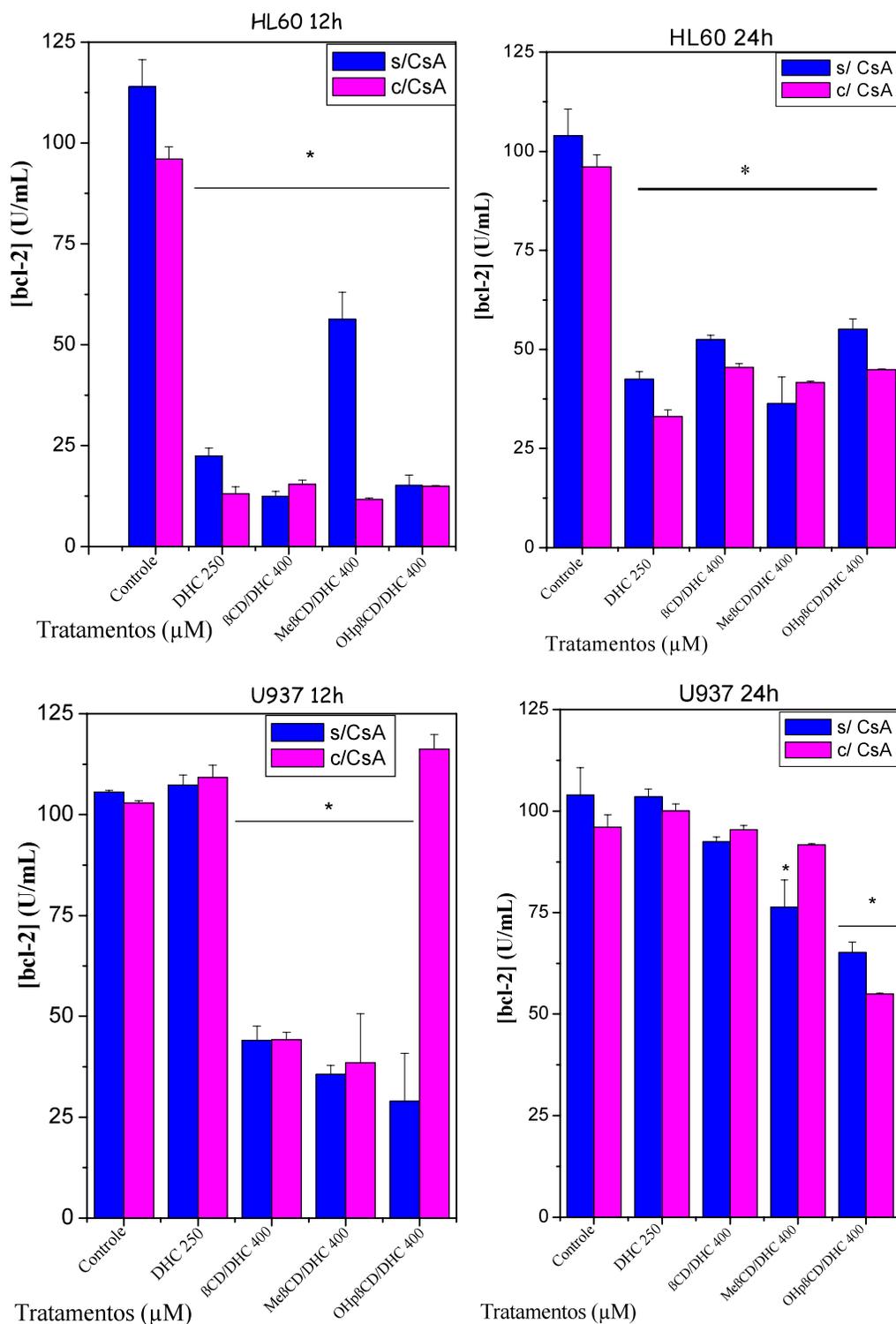


Figura 27. Detecção de proteína anti apoptótica Bcl-2 durante o processo apoptótico em células HL60 e U937 expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre (250 μ M) e complexada em β CDs (β CD/DHC, Me β CD/DHC e OH β CD/DHC: 400 μ M) por 12 e 24 h. O nível de Bcl-2 foi determinado por em U/mL. Cada valor representa média \pm SD de três experimentos em triplicata (*P<0.01).

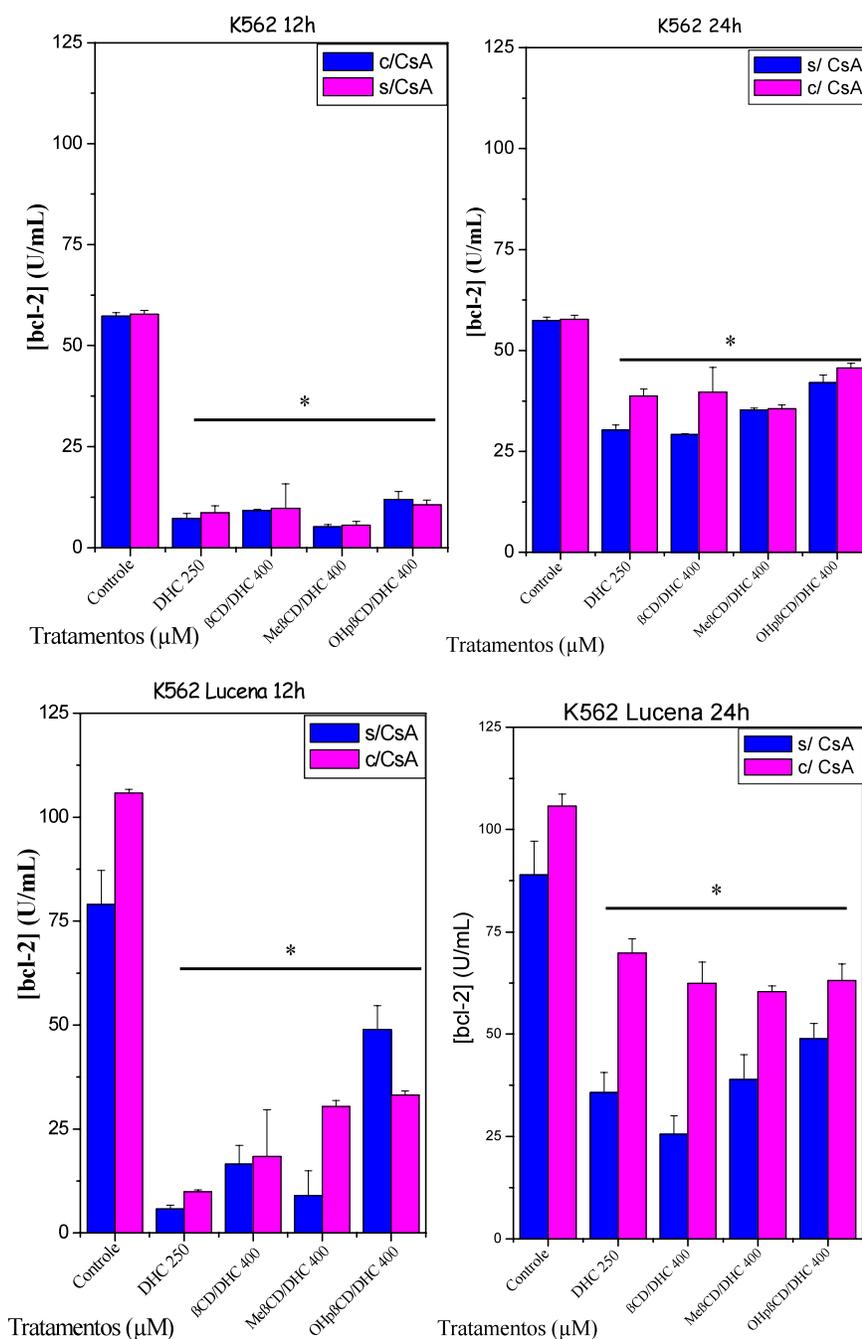


Figura 27. Detecção de proteína anti apoptótica Bcl-2 durante o processo apoptótico em células K562 e K562 Lucena expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre (250 μ M) e complexada em β CDs (β CD/DHC, Me β CD/DHC e OH β CD/DHC: 400 μ M) por 12 e 24 h. O nível de Bcl-2 foi determinado por em U/mL. Cada valor representa média \pm SD de três experimentos em triplicata (*P<0.01).

IV.3.2.7. Medida de Cálcio (Ca^{2+}) intracelular

Estudos recentes mostraram que o Ca^{2+} está envolvido na regulação de um dos mecanismos responsáveis pela permeabilização da MMI e liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, desencadeando o processo de morte por apoptose via mitocôndria. Vários tratamentos quimioterápicos têm sido desenvolvidos para induzir apoptose via transição de permeabilidade mitocondrial mediada por Ca^{2+} em diferentes tipos celulares. (Korge & Weis, 1999; Akao *et al.*, 2002; Kidd *et al.*, 2002; Petronilli *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004a). Com intuito de elucidar o possível mecanismo envolvido na permeabilização de membrana mitocondrial induzido pela DHC e seus complexos de inclusão em β CDs em células da leucemia humana HL60, determinamos o nível de cálcio intracelular (Ca^{2+}) após pré-incubação durante 1 h na presença e ausência de ciclosporina A (CsA), seguido do tratamento das células com diferentes concentrações de DHC em sua forma livre e complexada e incubação durante 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram obtidos em porcentagem utilizando o software Cell Quest (**tabela 11**).

A **figura 28 (a-c)** mostra que DHC e seus complexos de inclusão em β CDs induziu um aumento no nível de Ca^{2+} intracelular nas primeiras 24 h. O complexo de inclusão HP β CD/DHC (400 μ M) mostrou maior eficácia chegando a 79,69% de aumento de Ca^{2+} intracelular, enquanto Me β CD/DHC e β CD/DHC (400 μ M) induziram 54,69 e 56,26%, respectivamente. A DHC livre mostrou menor eficácia, provocando um aumento de 39,29% de Ca^{2+} intracelular. Após 24 h de tratamento a intensidade de fluorescência de Fura-2 começou a diminuir, sendo que após 72 h de exposição, não houve aumento significativo no nível de Ca^{2+} intracelular. Estes resultados indicam que a elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular é um importante passo inicial na indução de apoptose pela DHC e principalmente por seus complexos de inclusão.

A homeostase mitocondrial apresenta um papel importante na regulação da apoptose. Sinais pró-apoptóticos (isto é, EROS, estado redox alterado e aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular) podem desencadear a liberação de proteínas mitocondriais ativadoras de caspases no citosol, tais como citocromo c, AIF, Smac/DIABLO, subsequentemente comprometendo a célula a morrer pela mediação de Apaf-1, ativação de caspase-9 e caspase-3. A DHC e seus complexos em β CDs induziram perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que refletiu na permeabilização da MMI. O declínio do $\Delta\psi_m$ pode estar relacionado com a abertura de PTP, provocando a liberação de citocromo c, uma das proteínas ativadoras de caspases. A queda no $\Delta\psi_m$ precede a maioria das alterações no potencial redox intracelular (EROS), um determinante importante na transdução de sinais apoptóticos (Cadenas & Davies, 2000; Liu *et al.*, 2004a). As EROS são conhecidas como segundo mensageiro intracelular em baixas concentrações e são capazes de ativar fatores de transcrição tais como NF- κ B e AP-1 (Hockenbery *et al.*, 1993). Sua explosão no citosol, principalmente causada pela ruptura na mitocôndria, pode mediar a indução de apoptose, atuando na perda de $\Delta\psi_m$ e alterando a função mitocondrial, mediando a elevação de Ca^{+2} intracelular e induzindo a ativação de caspases executoras (Kelso *et al.*, 2001). DHC e seus complexos de inclusão induziram uma elevação da concentração de Ca^{+2} intracelular nas primeiras 24 h de tratamento, sugerindo que a homeostase do Ca^{+2} apresenta um papel importante no processo apoptótico (**figura 28 (a)**). A redistribuição da fosfatidilserina na membrana plasmática parecer ser regulada pelo nível de Ca^{+2} intracelular na membrana, assim como por enzimas transportadoras de lipídeos dependentes de energia (Hampton *et al.*, 1996). Ca^{+2} intracelular também está associado com a geração de EROS, ativação de NF- κ B, alterações nas funções mitocondriais e ativação direta de proteases (calpaina e endonuclease dependente de Ca^{+2}). Duas hipóteses têm sido propostas para explicar o

envolvimento do Ca^{+2} no processo apoptótico (McConkey & Orrenius, 1997; Orrenius *et al.*, 2003; Scorrano *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004a). A primeira é que a depleção de estoques intracelulares (tal como retículo endoplasmático) e possivelmente o influxo de Ca^{+2} extracelular promovem aumento de Ca^{+2} citoplasmático, que atua como um sinal de apoptose pela ativação de enzimas catabólicas chaves na maquinaria efetora. A segunda hipótese propõe o esvaziamento do estoque de Ca^{+2} intracelular como fator desencadeante de apoptose pela indução do rompimento da arquitetura intracelular liberando elementos chaves da maquinaria efetora da apoptose, tal como DNase I, que passam a ter acesso aos seus substratos (Liu *et al.*, 2004a).

Tabela 11. Níveis de Ca^{+2} intracelular durante o processo apoptótico em células HL60 expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre e complexada em ciclodextrinas em diferentes tempos de exposição.

NÍVEL DE CÁLCIO INTRACELULAR (%)			
TRATAMENTOS (μM)	TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (h)		
	24 h	48 h	72 h
CONTROLE	20,72 \pm 1,32	21,42 \pm 2,83	26,38 \pm 2,11
DHC 150	29,89 \pm 2,21	19,39 \pm 3,16	24,34 \pm 2,69
DHC 250	39,29 \pm 2,56*	16,57 \pm 2,19	27,92 \pm 3,02
βCD 400	17,14 \pm 2,76	22,60 \pm 1,94	21,86 \pm 1,87
$\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 150	35,55 \pm 3,01*	35,04 \pm 3,52*	26,79 \pm 3,25
$\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 250	45,75 \pm 2,10*	41,93 \pm 2,15*	29,75 \pm 4,01
$\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 400	56,26 \pm 1,98*	67,78 \pm 1,99*	26,56 \pm 3,29
$\text{Me}\beta\text{CD}$ 400	20,53 \pm 1,40	19,22 \pm 2,51	21,33 \pm 1,92
$\text{Me}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 150	62,15 \pm 1,76*	45,49 \pm 3,02*	28,86 \pm 2,57
$\text{Me}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 250	56,36 \pm 2,03*	59,01 \pm 3,46*	22,21 \pm 3,06
$\text{Me}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 400	54,69 \pm 2,54*	57,52 \pm 2,63*	25,87 \pm 4,05
$\text{HP}\beta\text{CD}$ 400	18,48 \pm 3,05	23,55 \pm 1,45	19,97 \pm 2,21
$\text{HP}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 150	32,77 \pm 2,98*	34,36 \pm 2,65*	25,67 \pm 2,54
$\text{HP}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 250	46,79 \pm 2,67*	46,94 \pm 2,50*	23,68 \pm 2,32
$\text{HP}\beta\text{CD}/\text{DHC}$ 400	79,69 \pm 1,93*	61,41 \pm 3,82*	25,39 \pm 3,59

Os valores foram obtidos em porcentagem pela análise estatística fornecida pelo programa Cell Quest. Cada histograma representa a média \pm SD de três experimentos em três replicatas (* $P < 0,05$ em relação aos controles).

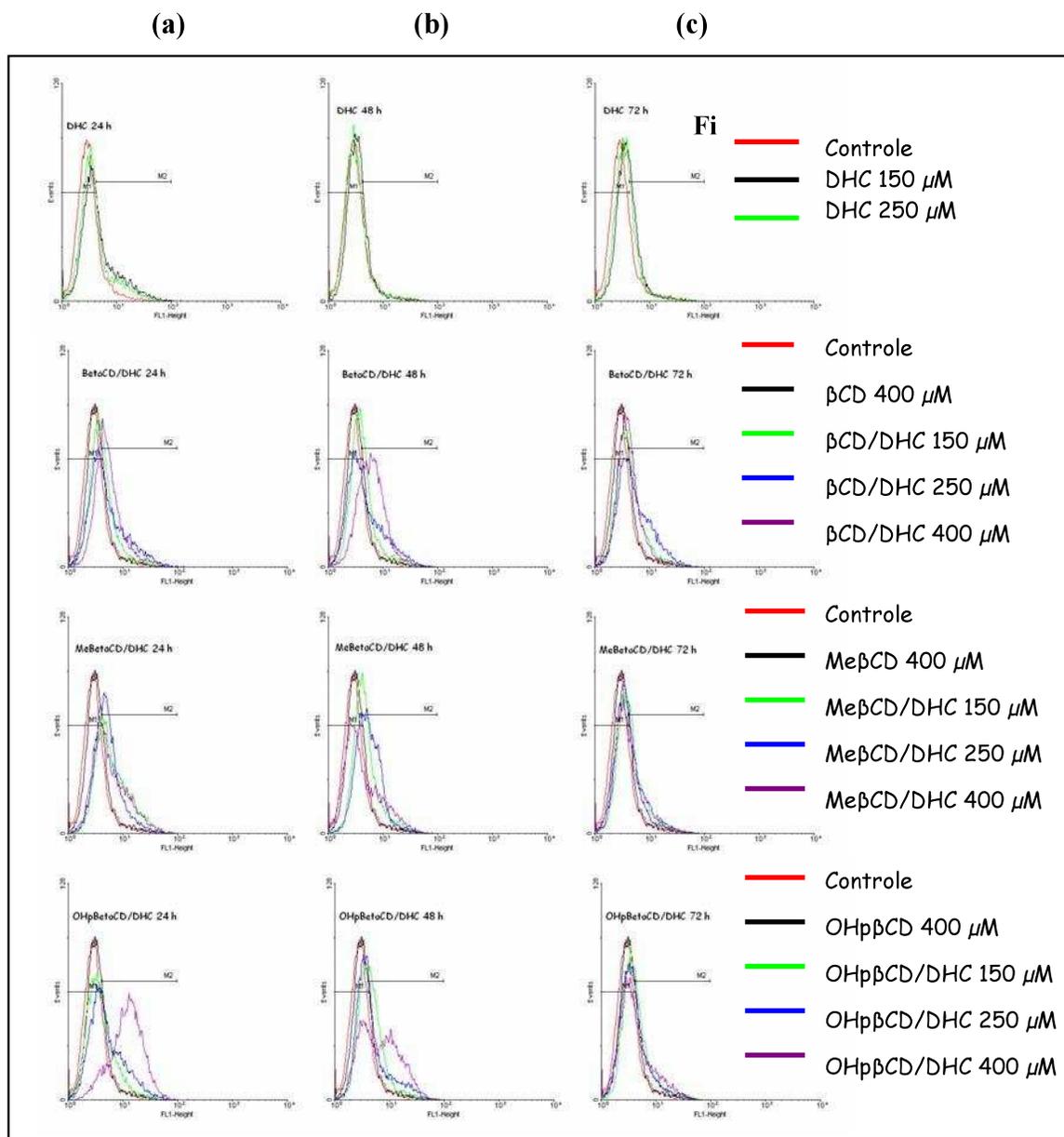


Figura 28. Análise da concentração de Ca^{+2} intracelular durante o processo apoptótico em células HL60 expostas a diferentes concentrações de DHC em sua forma livre (150 e 250 μM) e complexada em ciclodextrinas ($\beta\text{CD/DHC}$, Me $\beta\text{CD/DHC}$ e OH $\beta\text{CD/DHC}$: 150, 250 e 400 μM) por 24 (a); 48 (b) e 72h (c). O nível de Ca^{+2} intracelular foi determinado por citometria de fluxo utilizando a fluorescência do Fura-2. Os valores foram obtidos em porcentagem pela análise estatística fornecida pelo programa Cell Quest. Cada histograma foi obtido em três experimentos em três replicatas.

IV.3.2.8. “Swelling” Mitochondrial

Há uma forte correlação estabelecida entre o fenômeno de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTP) e o processo apoptótico (Reed, 1997). PTP mitocondrial é causado pela abertura de poros de PTP inibidos por ciclosporina na membrana interna, causando dissipação do gradiente eletroquímico de prótons, que caracteriza perda de potencial de membrana mitocondrial (PMM, $\Delta\psi_m$), e swelling osmótico devido à alta concentração de solutos na matriz mitocondrial. Segundo Vander Heiden *et al.*, (1997) o swelling mitocondrial implica em uma desregulação de homeostase osmótica causada por alterações na permeabilidade de membrana, visto que o canal formado pela proteína da membrana externa, porina (VDAC) tem um diâmetro estimado de 1,8 nm mesmo em seu estado fechado, o qual poderia ainda ser permeável para íons. A manutenção do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e o consumo de oxigênio continuado nas mitocôndrias “inchadas” implicam que os poros PTP permaneçam fechados. O íon potássio (K^+) é o maior determinante do volume da matriz mitocondrial, e seu transporte através da membrana interna é controlado por vários canais e talvez, inclusive o translocador de nucleotídeo adenosina (Halestrap *et al.*, 1998). Portanto, uma alteração na atividade de um desses canais transportadores de K^+ pode ser responsável pelo swelling mitocondrial patológico durante apoptose (Reed, 1997; Khosravi-Far & Esposti, 2004; Bras *et al.*, 2005). Em trabalho recente do nosso grupo, demonstrou-se que a DHC induz swelling osmótico na matriz mitocondrial de células HL60, o que foi protegido na presença de ciclosporina A (CsA), inibidor da abertura dos poros de PTP (Anazetti *et al.*, 2004). Esses resultados evidenciaram o envolvimento de PTP com o swelling observado na ausência de CsA. A indução de swelling mitocondrial por DHC complexada à BCD também foi apresentada na

primeira etapa do trabalho, onde mostramos que a presença de CsA inibiu significativamente o swelling após tratamento. Com intuito de observar o efeito dos outros complexos de DHC e β CDs em estudo (DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) na ocorrência de swelling mitocondrial, nessa segunda etapa as células HL60 foram incubadas com DHC e seus complexos (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) em diferentes concentrações, próximas ao IC₅₀, durante períodos de exposição variando entre 3 a 24 h. A **tabela 12** mostra os dados em porcentagem, que foram determinados em relação às células controle. Obtivemos um aumento de swelling mitocondrial em cerca de 46 e 62 % após tratamento das células HL60 com a DHC durante 3 a 24 h (150 e 250 μ M, respectivamente), conforme os dados mostrados na **tabela 12**. Em relação aos complexos de DHC em β CDs foi observado um aumento de 92 e 76 % nas células tratadas com DHC/Me β CD e DHC/HP β CD por 24 h (150 μ M), respectivamente. Além disso, obtivemos um aumento de 60 % de swelling mitocondrial após tratamento das células com HL60 com o complexo DHC/ β CD (150 μ M). Os resultados evidenciam a indução de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (PTP) pela DHC e por seus complexos em β CDs, sendo que o de DHC/HP β CD mostrou ser mais potente na indução de swelling mitocondrial.

O aumento no intumescimento (“swelling”) mitocondrial de células HL60 observado indica envolvimento de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP), que também está relacionada à perda de PMM ($\Delta\psi_m$), que determinamos utilizando a marcação com o fluorocromo JC-1, seguida de análise por citometria de fluxo.

Tabela 12. Porcentagem de aumento de swelling mitocondrial em células HL60 tratadas em relação ao controle.

Tratamentos (μM)	Tempos de Exposição (h)			
	03	06	12	24
Controle	-	-	-	-
DHC 150	$36 \pm 2,0$	$63 \pm 2,5$	$42 \pm 2,6$	$45 \pm 3,2$
DHC 250	$46 \pm 2,3$	$51 \pm 3,2$	$55 \pm 2,9$	$62 \pm 3,4$
DHC/BCD 150	53 ± 3	$52 \pm 2,7$	$77 \pm 3,2$	$60 \pm 2,3$
DHC/BCD 250	$47 \pm 2,5$	$36 \pm 3,0$	$83 \pm 2,8$	$82 \pm 4,2$
DHC/BCD 400	$43 \pm 1,9$	$31 \pm 2,8$	$73 \pm 3,2$	$84 \pm 4,5$
DHC/MeBCD 150	$43 \pm 2,1$	$58 \pm 3,2$	$34 \pm 1,9$	$92 \pm 3,4$
DHC/MeBCD 250	$45 \pm 1,5$	$55 \pm 2,8$	$36 \pm 3,4$	$73 \pm 2,9$
DHC/HPBCD 150	$37 \pm 3,2$	$41 \pm 4,0$	$41 \pm 2,7$	$76 \pm 3,1$
DHC/HPBCD 250	$36 \pm 2,3$	$36 \pm 2,9$	$73 \pm 3,2$	$60 \pm 2,3$

Cada valor representa a média \pm S.D. de três experimentos em quatro replicatas. Os dados foram normalizados em relação ao controle (todos os resultados apresentados acima foram significativamente diferentes quando comparados ao controle, com $*P < 0,001$).

Tendo em vista a importância de elucidar os mecanismos envolvidos na via apoptótica mitocôndria-dependente induzida pelos complexos em estudo, durante a próxima etapa do presente trabalho pretendemos analisar a indução de swelling mitocondrial em células U937, K562 e K562 Lucena, e sua relação com a formação de poros de PTP, utilizando pré-incubação com CsA, inibidor desses poros, cuja abertura leva a PTP.

IV.3.2.9. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial (PMM, $\Delta\Psi_m$) foi avaliado utilizando como marcador o fluorocromo lipofílico catiônico JC-1, que penetra nas células e sua fluorescência é uma reflexão do PMM ($\Delta\Psi_m$) (Cossarizza *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 1995; Salvioli *et al.*, 1997; Gravance *et al.*, 2000). JC-1 pode existir em dois diferentes estados, agregados na matriz mitocondrial, indicando $\Delta\Psi_m$ normal (mitocôndria polarizada) e monômeros, evidenciando perda de $\Delta\Psi_m$ (mitocôndria despolarizada).

As **tabelas 13 e 14** apresentam os valores referentes às medidas obtidas por citometria de fluxo após marcação com JC-1 evidenciam a perda de $\Delta\psi_m$, principalmente em células HL60 e U937 após tratamento com concentrações de DHC e seus respectivos complexos em β CDs (DHC/ β CD, DHC/Me β CD e DHC/HP β CD) próximas dos valores de IC₅₀ (150 and 250 μ M), durante diferentes tempos de exposição. Para as células HL60 (**tabela 13**), foram realizadas análises após 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, sendo que houve perda significativa de $\Delta\psi_m$ após 24 h de exposição à DHC e seus complexos (250 μ M), chegando a cerca de 70 % em relação aos controles. A DHC e seus complexos de inclusão em CDs desencadearam

Tabela 13. Porcentagem de perda de $\Delta\psi_m$ em células HL60 e U937 após exposição à DHC e seus complexos de inclusão.

Tratamentos (μ M)	Tempos de exposição (h)					
	03	06	12	24	48	72
1) Controle	5 \pm 1	7 \pm 1	10 \pm 1	12 \pm 2	8 \pm 2	7 \pm 2
2) DHC 150	16 \pm 2*	20 \pm 3*	14 \pm 2	30 \pm 3*	86 \pm 6*	84 \pm 3*
3) DHC 250	18 \pm 2*	19 \pm 2*	28 \pm 3*	50 \pm 6*	88 \pm 8*	85 \pm 4*
4) β CD 250	6 \pm 1	9 \pm 2	13 \pm 4	13 \pm 3	20 \pm 2*	6 \pm 2
5) DHC/ β CD 150	25 \pm 3*	17 \pm 2*	19 \pm 3*	20 \pm 2*	36 \pm 4*	42 \pm 3*
6) DHC/ β CD 250	21 \pm 3*	22 \pm 1*	20 \pm 3*	22 \pm 3*	51 \pm 5*	66 \pm 4*
7) DHC/ β CD 400	17 \pm 2*	18 \pm 1*	19 \pm 3*	23 \pm 3*	83 \pm 5*	92 \pm 5*
8) Me β CD 250	7 \pm 2	8 \pm 2	8 \pm 2	13 \pm 2	17 \pm 3	8 \pm 1
9) DHC/Me β CD 150	19 \pm 2*	22 \pm 2*	21 \pm 2*	26 \pm 3*	85 \pm 7*	85 \pm 6*
10) DHC/Me β CD 250	16 \pm 3*	21 \pm 3*	25 \pm 2*	33 \pm 5*	95 \pm 7*	89 \pm 7*
11) DHC/Me β CD 400	19 \pm 3*	22 \pm 3*	21 \pm 3*	26 \pm 4*	85 \pm 6*	85 \pm 4*
12) HP β CD 250	6 \pm 2	10 \pm 2	12 \pm 2	15 \pm 3	7 \pm 2	8 \pm 2
13) DHC/HP β CD 150	20 \pm 4*	24 \pm 2*	21 \pm 3*	26 \pm 5*	80 \pm 8*	86 \pm 5*
14) DHC/HP β CD 250	15 \pm 3*	23 \pm 2*	20 \pm 3*	42 \pm 6*	92 \pm 7*	94 \pm 4*
15) DHC/HP β CD 400	21 \pm 3*	25 \pm 3*	25 \pm 4*	55 \pm 5*	88 \pm 8*	90 \pm 6*

*P<0,05 em relação aos controles. Cada valor representa a média \pm SD de três experimentos realizados em triplicata.

colapso de $\Delta\psi_m$ de forma semelhante, com exceção de DHC/ β CD, que foi menos efetiva, quando comparada à DHC em sua forma livre. Obtivemos uma proteção parcial da perda de $\Delta\psi_m$ na presença de CsA, mesmo em células K562 e K562 Lucena, onde a DHC e seus

complexos foram pouco eficazes nos tempos de exposição utilizados (48 e 72 h). Portanto, podemos sugerir que outros mecanismos estejam envolvidos na indução de perda de $\Delta\psi_m$, tais como formação de poros inespecíficos na membrana mitocondrial interna, não inibidos por CsA, através da atividade de caspases ou ação de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Tabela 14. Porcentagem de perda de $\Delta\psi_m$ em células K562 e K562 Lucena após exposição à DHCe seus complexos de inclusão na presença e ausência de CsA (1 μ M).

Tratamentos (μ M)	Células							
	K562				K562 Lucena			
	s/ CsA		c/ CsA		s/ CsA		c/ CsA	
	48 h	72 h						
1)Controle	22 \pm 3	18 \pm 2	14 \pm 1	24 \pm 2	18 \pm 1	21 \pm 2	15 \pm 1	16 \pm 2
2)DHC 150	41 \pm 2*	45 \pm 2*	27 \pm 2*	39 \pm 1*	31 \pm 2*	33 \pm 2*	29 \pm 2*	29 \pm 3*
3)DHC 250	43 \pm 1*	44 \pm 1*	29 \pm 1*	39 \pm 3*	29 \pm 4*	37 \pm 4*	25 \pm 3*	30 \pm 3*
4) β CD 250	18 \pm 2	22 \pm 3	15 \pm 1	15 \pm 2	17 \pm 1	23 \pm 2	18 \pm 1	17 \pm 2
5)DHC/ β CD 150	34 \pm 3*	39 \pm 1*	25 \pm 5	30 \pm 5*	27 \pm 2*	30 \pm 1	24 \pm 3*	28 \pm 1*
6)DHC/ β CD 250	40 \pm 2*	38 \pm 4*	28 \pm 3*	32 \pm 3*	26 \pm 3*	33 \pm 3*	27 \pm 1*	28 \pm 4*
7)DHC/ β CD 400	48 \pm 4*	45 \pm 4*	26 \pm 5*	33 \pm 2*	25 \pm 6*	31 \pm 5*	34 \pm 3*	33 \pm 5*
8)Me β CD 250	19 \pm 1	23 \pm 2	15 \pm 4	18 \pm 2	22 \pm 2	20 \pm 2	23 \pm 2	21 \pm 2
9)DHD/Me β CD 150	32 \pm 3*	29 \pm 4	27 \pm 4	32 \pm 3	31 \pm 2*	34 \pm 4*	26 \pm 3	22 \pm 4*
10)DHD/Me β CD 250	34 \pm 2*	39 \pm 2*	24 \pm 2*	31 \pm 2*	27 \pm 4*	36 \pm 5*	23 \pm 4*	28 \pm 5*
11)DHD/Me β CD 400	44 \pm 4*	48 \pm 4*	28 \pm 3*	33 \pm 3*	33 \pm 4*	31 \pm 1*	29 \pm 4*	24 \pm 6*
12)HP β CD 250	24 \pm 2	22 \pm 1	24 \pm 4	25 \pm 1	24 \pm 1	24 \pm 2	22 \pm 2	19 \pm 2
13)DHD/HP β CD 150	36 \pm 1*	37 \pm 2	34 \pm 4*	43 \pm 4*	35 \pm 4*	39 \pm 2*	27 \pm 4*	26 \pm 3*
14)DHD/HP β CD 250	35 \pm 3*	39 \pm 4*	29 \pm 3*	33 \pm 5*	32 \pm 5*	42 \pm 4*	28 \pm 3*	27 \pm 1*
15)DHD/HP β CD 400	57 \pm 2*	59 \pm 2*	23 \pm 1*	44 \pm 4*	43 \pm 1*	45 \pm 2	26 \pm 1*	25 \pm 3*

(*P < 0,05 em relação aos controles). Cada valor representa a média \pm SD de três experimentos realizados em triplicata.

A mitocôndria apresenta importante papel durante o processo apoptótico induzido por agentes antitumorais. A liberação de energia durante reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial permite a formação de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna, caracterizando uma membrana polarizada ($\Delta\psi_m$). O colapso das funções mitocondriais resulta na despolarização da membrana interna, através da dissipação do gradiente de prótons e, portanto, perda de

$\Delta\psi_m$, o que é frequentemente observado durante estágios iniciais do processo apoptótico (Reed, 1997; Constantini *et al.*, 2000; Kelso *et al.*, 2001; Finkel, 2001; Bras *et al.*, 2005).

Nossos resultados mostraram que o swelling mitochondrial foi detectado nas células HL60 tratadas com DHC em suas formas livres e complexadas. Além disso, as formas complexadas, principalmente em HP β CD mostraram ser eficiente na indução de perda substancial de $\Delta\psi_m$ analisado após marcação com JC-1 por citometria de fluxo. Portanto, baseado nos dados de indução de swelling mitochondrial e despolarização de membrana mitochondrial interna, juntamente com análise de conteúdo de DNA na presença de CsA, podemos concluir que a DHC em sua forma livre e complexada com β CDs são potenciais

Tabela 15. Porcentagem de perda de $\Delta\psi_m$ em células HL60 e U937 após exposição a DHC e seus complexos de inclusão em β CDs na presença e ausência de CsA (1 μ M).

Tratamentos (μ M)	Células							
	HL60				U937			
	s/ CsA		c/ CsA		s/ CsA		c/ CsA	
	48 h	72 h						
1)Controle	10 \pm 3	12 \pm 2	9 \pm 3	8 \pm 2	13 \pm 2	15 \pm 3	8 \pm 2	10 \pm 1
2)DHC 150	76 \pm 6*	80 \pm 2*	17 \pm 3*	27 \pm 2*	70 \pm 4*	75 \pm 4*	19 \pm 3*	20 \pm 2*
3)DHC 250	85 \pm 5*	87 \pm 7*	20 \pm 2*	29 \pm 3*	77 \pm 5*	76 \pm 5*	17 \pm 3*	25 \pm 4*
4) β CD 250	13 \pm 2*	10 \pm 5	8 \pm 2	7 \pm 3	14 \pm 3	17 \pm 2*	9 \pm 4	10 \pm 3
5)DHC/ β CD 150	42 \pm 4*	55 \pm 4*	15 \pm 6	20 \pm 5*	45 \pm 7*	40 \pm 5*	12 \pm 5	19 \pm 6*
6)DHC/ β CD 250	54 \pm 5*	65 \pm 5*	19 \pm 5*	22 \pm 3*	65 \pm 6*	54 \pm 7*	17 \pm 4*	25 \pm 3*
7)DHC/ β CD 400	75 \pm 5*	89 \pm 6*	18 \pm 4*	27 \pm 5*	89 \pm 5*	75 \pm 3*	15 \pm 3*	30 \pm 4*
8)Me β CD 250	14 \pm 3	10 \pm 3	9 \pm 3	8 \pm 2	10 \pm 4	14 \pm 4	12 \pm 2	10 \pm 3
9)DHD/Me β CD 150	78 \pm 7*	82 \pm 7*	17 \pm 3	22 \pm 3	65 \pm 4*	75 \pm 8*	15 \pm 2	22 \pm 4
10)DHD/Me β CD 250	88 \pm 7*	82 \pm 5*	14 \pm 5*	25 \pm 2*	79 \pm 6*	80 \pm 7*	18 \pm 4*	25 \pm 3*
11)DHD/Me β CD 400	78 \pm 6*	80 \pm 8*	18 \pm 6*	30 \pm 3*	82 \pm 3*	78 \pm 5*	21 \pm 5*	30 \pm 2*
12)HP β CD 250	15 \pm 2	17 \pm 3	12 \pm 4	16 \pm 3	13 \pm 4	16 \pm 4	11 \pm 4	13 \pm 4
13)DHD/HP β CD 150	80 \pm 8*	89 \pm 4*	11 \pm 4*	23 \pm 7*	80 \pm 8*	83 \pm 9*	11 \pm 3*	25 \pm 6*
14)DHD/HP β CD 250	86 \pm 7*	93 \pm 5*	15 \pm 5*	26 \pm 5*	85 \pm 7*	83 \pm 6*	19 \pm 2*	31 \pm 4*
15)DHD/HP β CD 400	87 \pm 8*	92 \pm 7*	23 \pm 4*	32 \pm 4*	86 \pm 5*	88 \pm 5*	25 \pm 3*	35 \pm 5*

(*P<0,05 em relação aos controles). Cada valor representa a média \pm SD de três experimentos realizados em triplicata.

indutores de morte celular por apoptose, envolvendo a via mitocondrial em células da leucemia.

IV.3.2.10. Determinação de GSH Total

Os níveis de GSH total em células HL60 foram inicialmente determinados por Xu & Thornalley, (2001). Em trabalhos anteriores, demonstramos o efeito da DHC na depleção de GSH após 72 h de exposição, assim como total proteção desse efeito na presença 1 μ M de CsA. Os efeitos da DHC e de seus complexos em β CDs nas concentrações de GSH total foram avaliados após 12 e 72 h de cultura de células da leucemia HL60, U937, K562 e K562 Lucena, utilizando concentrações próximas ao IC₅₀ (150 e 250 μ M para DHC e 150, 250 e 400 μ M para as formas complexadas em β CDs), como determinadas anteriormente em experimentos de citotoxicidade, com e sem pré-incubação de CsA (1 μ M). As **figuras 29 e 30** mostram os resultados obtidos, dados em nmol de GSH total/ 10^6 células HL60 e U937 (**figura 29 (a, b) e (c, d)**), K562 e K562 Lucena (**figura 30 (a, b) e (c, d)**), respectivamente. Podemos observar que em células HL60 após exposição por 12 h à DHC e seus complexos, houve um aumento significativo nos níveis de glutathiona e tal efeito foi intensificado na presença de CsA (**figura 29 (a)**). Após 72 h de tratamento nas mesmas condições, obtivemos depleção significativa de GSH sendo que essa redução foi completamente protegida quando na presença de CsA (**figura 29 (b)**). Em células U937 a DHC e seus complexos em β CDs foram efetivos de forma semelhante, induzindo uma diminuição nos níveis de GSH intracelular apenas após 72 h de tratamento (**figura 29 (c, d)**). É importante destacar que experimentos adicionais utilizando tempos de exposição intermediários entre 12 e 72 h serão realizados durante a próxima etapa do presente trabalho. O pré-tratamento com CsA inibiu a depleção de GSH obtida após exposição. O efeito na redução dos níveis de GSH em células K562 e K562 Lucena foram semelhantes, com exceção de que em

células K562 houve suave redução após 12 h de exposição à DHC 250 μM , DHC/ βCD 250 μM e DHC/Me βCD 400 μM , seguido de depleção de GSH significativa após 72 h de exposição a todos os tratamentos (**figura 30 (a,b)**). Em adição, para todos os ensaios contendo DHC ou seus complexos em βCD s na presença de CsA foi verificado um aumento na concentração de GSH nestas células em relação ao controle (CsA 1 μM).

As relações entre GSH e carcinogênese têm atraído a atenção de pesquisadores devido ao fato de GSH apresentar um papel chave na proteção de células contra toxicidade pela manutenção do estado redox intracelular através da conjugação com xenobióticos eletrofílicos e radicais livres, prevenindo a formação de peróxidos reativos. A depleção de GSH permite aumentar a atividade citotóxica de agentes anticancer uma vez que há redução na proteção contra estresse oxidativo. A depleção de GSH observada em células da leucemia ratadas com DHC seus complexos em βCD s pode contribuir significativamente com o envolvimento de EROS no processo apoptótico, inclusive na formação de poros inespecíficos na membrana mitocondrial interna, conforme sugerido anteriormente, como possível causa da reduzida proteção à perda de potencial de membrana quando as células foram tratadas na presença de CsA. Em trabalho anterior do nosso grupo, foi sugerida a formação de conjugados entre DHC e GSH como causa da depleção de GSH detectada em células tratadas, provavelmente como resultado da ligação do grupo $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{CH}_2$ presente na DHC à GSH (Anazetti *et al.*, 2004). Esta conjugação além de contribuir com a depleção de GSH observada contribui com a indução de dissipação do gradiente eletroquímico de prótons discutidos anteriormente. No entanto, foi verificado na presença de CsA, uma atenuação da depleção e até um aumento significativo na concentração de GSH. Esses resultados sugerem que as células aumentam sua produção de GSH como forma de proteção

contra a ação dos fármacos, o que também ocorre no início da exposição aos compostos em células HL60 (**figura 29 (a)**).

Em relação aos experimentos de potencial de membrana mitocondrial, determinação de GSH total, juntamente com os experimentos anteriormente realizados para verificar a indução de apoptose e ativação de caspases envolvidas, podemos dizer que DHC seus complexos em β CDs induziram apoptose em células com envolvimento de estresse oxidativo devido à depleção de GSH intracelular, levando a formação de poros inespecíficos de TPM, evento este inicial e, em grande parte, responsável pela depleção de GSH. Espécies reativas de oxigênio (EROS) parecem apresentar um papel importante na indução de apoptose por DHC, visto que a suplementação com GSH ao meio de cultura durante o tratamento das células, promove proteção das mesmas em relação à citotoxicidade (Anazetti *et al.*, 2004).

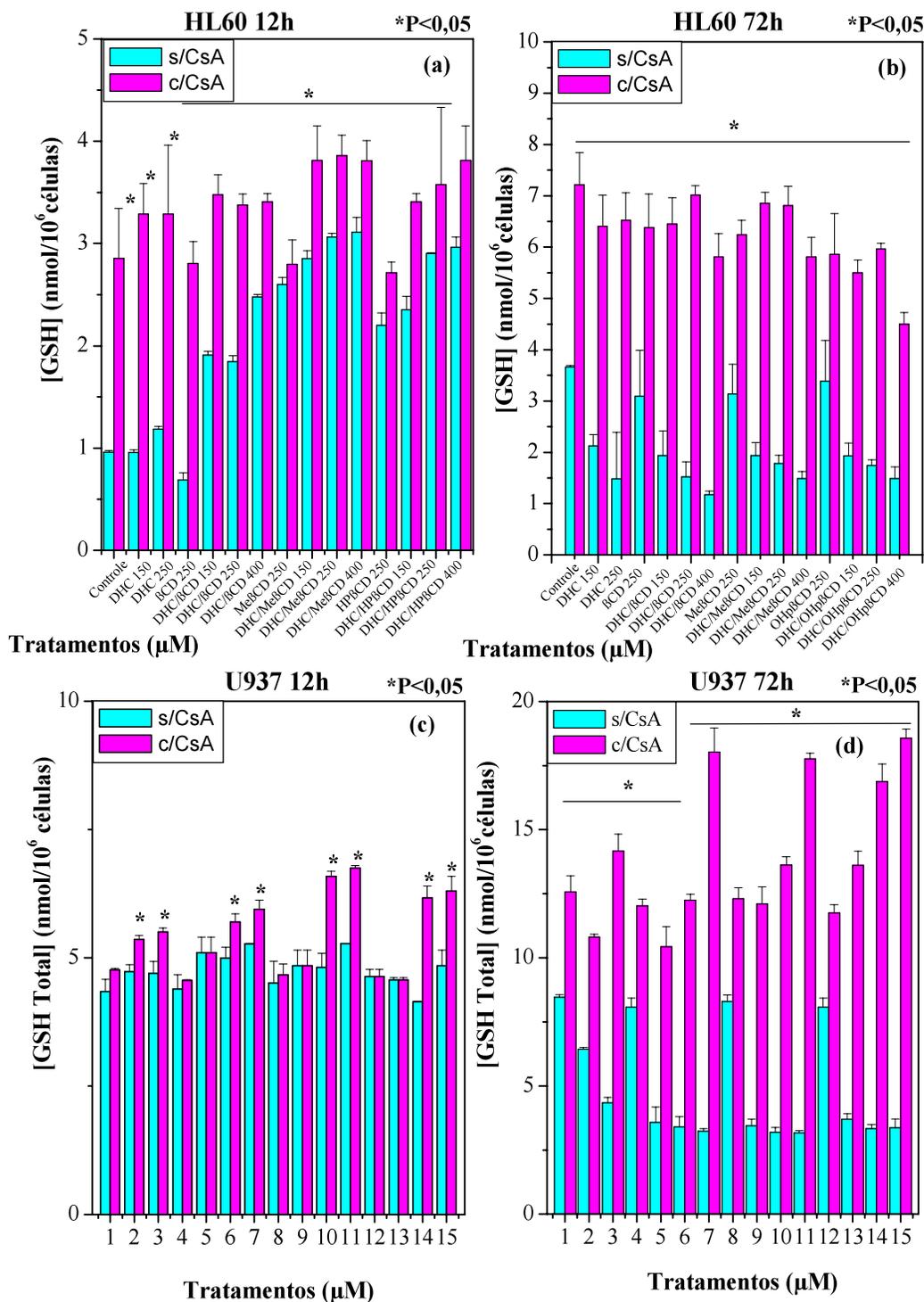


Figura 29. Determinação dos níveis de glutatona (GSH total) em células HL60 e U937 após exposição à DHC e seus complexos em βCDs em diferentes concentrações por 12 h (a) e 72 h (b) na presença e ausência de CsA (1 μM). Nas figuras para células U937, os números de 1 a 15, correspondem às mesmas condições de tratamento em relação às células HL60. Os dados representam a média ± SD de três experimentos realizados em triplicata. (*P<0,001, comparados ao controle).

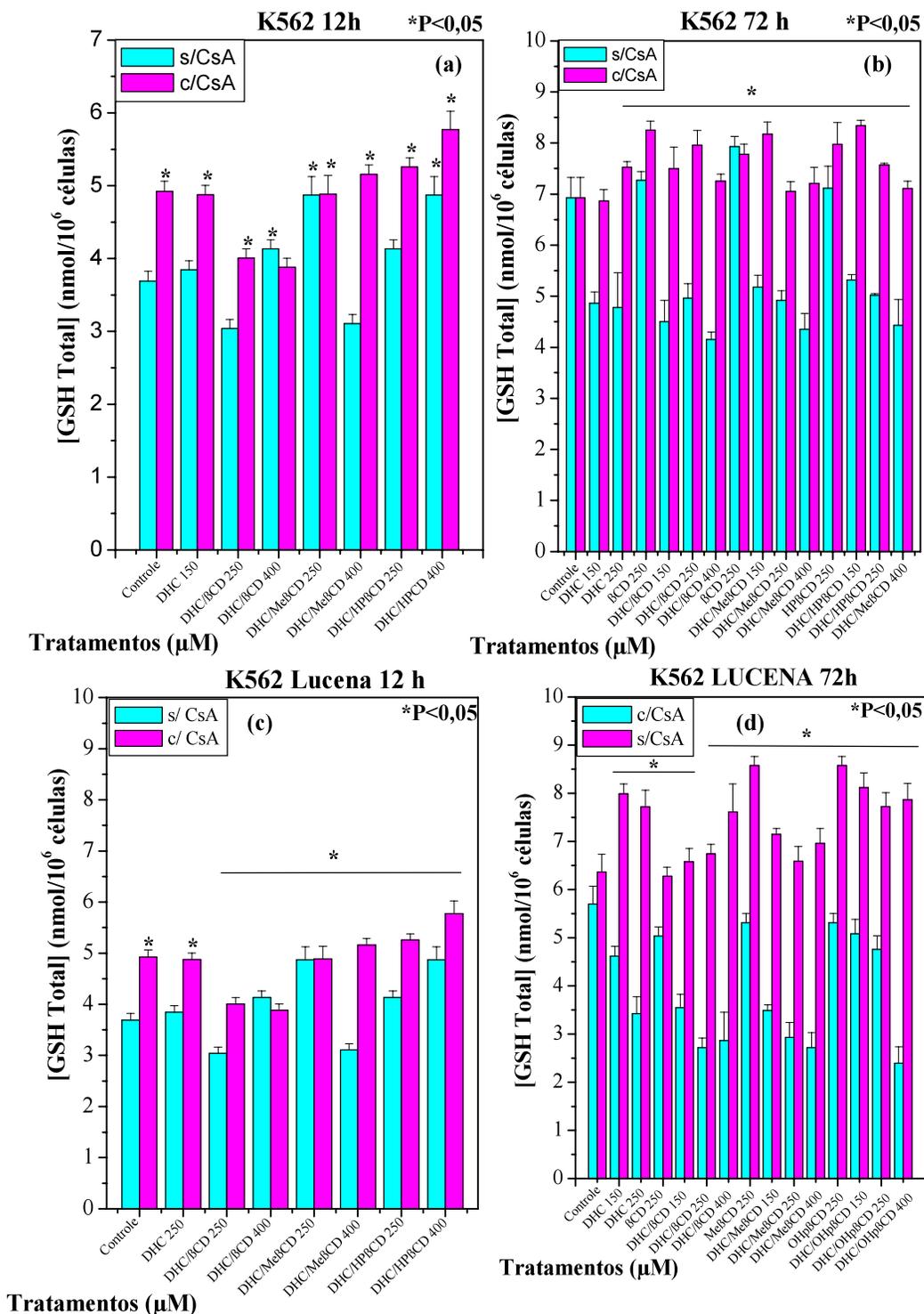


Figura 30. Determinação dos níveis de glutatona (GSH total) em células K562 e K562 Lucena após exposição à DHC e seus complexos em BCDs em diferentes concentrações por 12 h (a) e 72 h (b) na presença e ausência de CsA (1 µM). Os dados representam a média ± SD de três experimentos realizados em triplicata. (*P<0,001, comparados ao controle).

V - CONCLUSÕES

V – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Quanto à preparação de micro/nanoesferas de PLGA contendo DHC encapsulada, o conjunto de informações obtidas durante a caracterização do sistema nanoparticulado de PLGA contendo DHC nos permite concluir que, segundo análise morfológica, foram obtidas nanopartículas discretas, uniformes e esféricas com diâmetro médio da ordem de 300 nanômetros. As nanoesferas apresentaram características físico-químicas representativas de partículas estáveis com baixa tendência à agregação entre as mesmas, possivelmente devido à alta velocidade de agitação e baixas concentrações de estabilizantes tensoativos na fase aquosa. Em uma próxima etapa de estudos, pretende-se analisar as partículas por ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raios X e modelagem molecular, com intuito de propor modelos descrevendo a organização das partículas e sua interação molecular com a DHC (Calvo *et al.*, 1996; Gamisans *et al.*, 1999; Barkai *et al.*, 1990). Estudos experimentais e teóricos de modelagem molecular referentes à associação da DHC e o PLGA, assim como dos complexos de inclusão da DHC em β CDs estão em andamento com a colaboração com o Prof. Joel B. Alderete, Departamento de Química Orgânica, Universidad Concepcion, Concepcion, Chile (Pinto *et al.*, 2004).
- Segundo os resultados de citotoxicidade em células da leucemia obtidos, podemos sugerir que a complexação da DHC com β CDs mostrou pelo menos semelhante efeito citotóxico em comparação à DHC livre em células da leucemia. Portanto, esses resultados mostram-se promissores quanto à atividade antitumoral da DHC complexada a β CDs em células da leucemia, quanto a citotoxicidade, com a vantagem

de apresentar efeitos citotóxicos significativamente reduzidos em fibroblastos V79 e em hepatócitos (Corrêa *et al.*, 2005).

- Além disso, a comparação dos resultados de citotoxicidade dos complexos de DHC com β CDs em células da leucemia em linfócitos humanos sugerem que o complexo DHC/HP β CD inibe mais eficientemente o crescimento de células da leucemia HL60, U937 e K562, com menor efeito citotóxico a células do sistema imune, conforme nossas condições experimentais.
- Os resultados de diferenciação celular mostraram que a DHC complexada à β CDs aumentou a capacidade de indução de diferenciação em células da leucemia, sendo que dentre estes o complexo DHC/HP β CD mostrou maior potencial como indutor de diferenciação quando comparados à DHC livre nas células HL60 e U937, principalmente após 48 e 72 h de exposição. Entretanto, os complexos de inclusão não se mostraram potentes indutores de diferenciação em células K562. Pode-se inferir que a complexação da DHC em β CDs provoca alterações na capacidade e, portanto, nos mecanismos de indução de diferenciação celular, sendo que a sua forma livre induz predominantemente diferenciação granulocítica, assim como o complexo DHC/ β CD. Entretanto, o complexo DHC/HP β CD mostrou ser eficaz na indução de diferenciação monocítica em células HL60.
- Os resultados sugerem que o mecanismo de ação da DHC e de seus complexos de inclusão envolve a integração entre a via p53 e mitocondrial de indução de apoptose. A ativação de p21/WAF-1 associada à indução de parada do ciclo celular G₂/M sugerem que a indução de apoptose pela DHC e por seus complexos de inclusão é dependente da ativação da via p53 com envolvimento de transição de permeabilidade de membrana

mitocondrial, pois dentre os genes alvos de p53 identificados estão as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 e alguns ligantes de receptores de morte celular. A via mitocondrial foi evidenciada pela transição de permeabilidade de membrana mitocondrial, despolarização mitocondrial, liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna e ativação de caspases.

- A depleção de GSH intracelular demonstra o envolvimento de estresse oxidativo, levando a formação de poros inespecíficos de transição de permeabilidade de membrana mitocondrial (TPM), evento este inicial e, em grande parte, responsável pela depleção de GSH (Armstrong & Jones, 2002). Espécies reativas de oxigênio (EROS) parecem apresentar um papel importante na citotoxicidade da DHC e de seus complexos de inclusão, visto que a pré-incubação com antioxidantes, GSH e seu precursor, NAC, antes do tratamento, promove proteção das células em relação a citotoxicidade.
- DHC e seus complexos em β CDs induzem perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), que reflete na permeabilização da MMI. O declínio do $\Delta\psi_m$ precede a maioria das alterações no potencial redox intracelular (EROS), um determinante importante na transdução de sinais apoptóticos e está relacionado à abertura de PTPP, provocando a liberação de citocromo c, bloqueada pela ação de CsA, inibidor da abertura de PTPP, que não alterou a concentração de Bcl-2 em células da leucemia. Os resultados obtidos sugerem que a depleção de GSH induz aumento na produção de EROS endógeno suficiente para induzir transição de permeabilidade de membrana mitocondrial, com envolvimento do aumento da concentração de Ca^{+2} na matriz mitocondrial, via formação de poros inespecíficos e ruptura da MMI, como resultado de swelling mitocondrial e de poros constituídos por oligômeros de proteínas

pró-apoptóticas da família Bcl-2. Como consequência, ocorre a liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais, tais como citocromo c. Além disso, os resultados da análise de cálcio intracelular reforçam os resultados encontrados relacionados com o mecanismo de indução de permeabilização mitocondrial causado pela ação da DHC e de seus complexos de inclusão em β CDs. A consequência da permeabilização da MMI é a liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais pelos poros, que se comportam como canais voltagem-dependente, ativos pela concentração aumentada de Ca^{+2} na matriz mitocondrial mediada pelo estresse oxidativo (Weis *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 2001; Orrenius *et al.*, 2003; Dasmahapatra *et al.*, 2006). Portanto, a ativação das duas vias de permeabilização intensifica os efeitos da DHC e de seus complexos. Além disso, Bcl-2 parece estar envolvido na regulação, no nível nuclear, do transporte de fatores de transcrição através de poros, assim como no sequestro de cálcio e de GSH via mecanismo desconhecido. Mecanismos semelhantes em relação ao sequestro de cálcio no retículo endoplasmático, local de estocagem intracelular de Ca^{+2} , podem ser regulados por Bcl-2 (McConkey *et al.* 1997; Voehringer *et al.*, 1999).

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M.O. (2001). Comparison of impact of the different hydrophilic carriers on the properties of piperazine-containing drug. *Eur J Pharm Biopharm.*, 51: 221-225.
- Akao, M., Rourke, B., Kusuoka, H., Teshima, Y., Jones, S. P. and Marbán, E. (2003). Differential Actions of Cardioprotective Agents on the Mitochondrial Death Pathway. *Circulation Research.* 92:195-202.
- Allegre, M. and Deratani, A. (1994). Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agro-food Ind Hi-Tech.* 1: 9.
- Allémann, E.; Gurny, R. and Doelker, E. (1993). Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. *Eur J. Pharm Biopharm.*, 39: 173-191.
- Allen, R. G. and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad iol Med.* 28: 463-499.
- Alonso, M.J.; Losa, C.; Calvo, P. and Vila-Jato, J.L. (1991). Approaches to improve the association of amikacin sulfate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 68: 69-76.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.M.; Durán, N. and Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology.*, 188: 261-274.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.M.; Durán, N. and Haun, M. (2004). Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases -2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. *Toxicology.* 203: 123-137.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.S.; Durán, N. and Haun, M. (2001). Dimethylamide-Crotonin inhibits HL60 cells growth with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* Prata, A. (Editor). 34: supl. II pp. 252-253.
- Anazetti, M.C.; Melo, P.S.; Durán, N. and Haun, M. (2002). Cytotoxicity of ϵ -polycaprolactone nanospheres incorporating dehydrocrotonin on leukemic cells. *Proceeding in Brazil, First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology*, pp. 175-178.
- Anderson, L.C. (1979). K562 – A human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer.* 23: 143-147.

- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. and Sato, M. (2003). Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology*, 184: 1-9.
- Arends, M.J.; Morris, R.G. and Wyllie, A.H. (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, 136: 593-608.
- Armstrong, J.S. and Jones, D.P. (2002). Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl2 overexpressing HL60 cells. *The FASEB J.* 16: 1263-1267.
- Arrigo, A. P. (1999). Gene expression and thiol redox state. *Free Radica. Biol. Med.* 27: 936-944.
- Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12: 1-9.
- Bapat, N. and Boroujerdi, M. (1992). Uptake capacity and adsorption-isotherms of doxorubicin on polymeric nanoparticles - effect of methods of preparation. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18: 65-77.
- Barkai, A.; Pathak, Y.V. and Benita, S. (1990). Polyacrylate (eudragit retard) microspheres for oral controlled release of nifedipine .1. Formulation design and process optimization. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 16: 2057-2075.
- Barnhart, B.C.; Lee JC, Alappat EC, Peter ME. (2003). The death effector domain protein family. *Oncogene*. 22: 8634-8644.
- Beck, R.C.R. (2005). Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorevestidas: caracterização físico-química e biológicas e avaliação da viabilidade de obtenção farmacêutica multiparticulada, in: Tese de doutorado, UFRGS.
- Bertram, J.S. (2001). The molecular biology of cancer. *Mol. Asp. Med.* 21: 167-223.
- Bertrand, R.; Kerrigan, D.; Serang, M. and Pommier, Y. (1991). Cell death induced by topoisomerase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 77-85.
- Bold, R.J.; Chandra, J.; McConkey, D.J. (1999). Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content. *Ann. Surg. Oncol.* 6: 279-285.
- Bras, M.; Queenan, B. and Susin, S.A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochem.* 70: 231-239.

- Brasseur, N.; Brault, D. and Couvreur, P. (1991). Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles - carrier capacity and drug release. *Int. J. Pharm.*, 70: 129-135.
- Breitman T.R., (1990). Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60. *Methods Enzymol.*, 190: 118-130.
- Brigger, I.; Chaminade, P.; Marsaud, V.; Appel, M.; Besnard, M.; Gurny, R.; Renoir, M. and Couvreur, P. (2001). Tamoxifen encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. A new antiestrogen formulation. *Int J Pharm.*, 214: 37-42.
- Brigger, I.; Dubernet, C. and Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.*, 54: 631-651.
- Britto, M.A.F.O.; Nascimento, C.S. and Dos Santos, H.F. (2004). Structural analysis of cyclodextrins: A comparative study of classical and quantummechanical methods. *Quimica Nova* 27: 882-888.
- Burchiel, S.W.; Edwards, B.S.; Kuckuck, F.W.; Lauer, F.T.; Prossnitz, E.R.; Ranson, J.T. and Sklar, L.A. (2000). Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: multiparameter and pharmacologic applications. *Methods*. 21: 221-230.
- Cadenas, E.; Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biol. Med.* 29: 222-230.
- Cain, K.; Bratton, S.B. and Cohen, G.M. (2002). Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. 84: 203-214.
- Calvo, P.; Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J. (1996). Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.*, 85: 530-536.
- Carafolli, E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1115-1122.
- Carvalho, J.C.T.; Maria Fernanda Coser Silva, Maria Aparecida Medeiros Maciel, Ângelo da Cunha Pinto, Domingos Sávio Nunes, Ronaldo Mendes Lima, Jairo Kenupp Bastos, Silvio José Sarti. (1996). Investigation of Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *trans*-Dehydrocrotonin, a 19-Nor-Clerodane Diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Med* 1996; 62: 402-404.
- Cerutti PA. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet*. 344 (8926):862-3.

- Chandra, J., Samali, A. And Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Rad. Biol & Med.*, 29: 323-333.
- Chandy, T.; Das, G.S. and Rao, G.H. (2000). 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *J. Microencapsul.*, 17: 625-638.
- Cho, J.Y.; Baik, K.U.; Jung, J.H. and Park, M.H. (2000). In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.*, 398: 399-407.
- Cho, M.J.; Chen, F.J. and Huczek, D.I. (1995). Effects of inclusion complexation on the transepithelial transport of a lipophilic substance in-vitro. *Pharm. Res.* 12: 560-564.
- Choi, J.H.; Há, J.; Park, J.H.; Lee, J.Y.; Lee, Y.S.; Park, H.J.; Choi, J.W.; Masuda, Y.; Nakaya, K. and Lee, K.T. (2002). Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1327-1333.
- Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326: 1-16.
- Collins, J.S.; Gallo, R.C. and Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature (London)*, 270: 347.
- Collins, J.S.; Ruscetti, W.F.; Gallagher, R.E. and Gallo, R.C. (1978). Terminal differentiation promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 2458-2462.
- Collins, S.J. (1987). The HL60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood.*, 70: 1233-1244.
- Corrêa, D.H.A.; Melo, P.S.; De Carvalho, C.A.A.; De Azevedo, M.B.M.; Durán, N. and Haun, M. (2005). Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity on V79 cells and rat cultured hepatocytes. *Eur. J. Pharm* v. 510, p. 17-24.
- Costa, A.M.L.; Silva, J.C.R.; Campos, A.R.; Rao, V.S.N.; Maciel, M.A.M. and Pinto, A.C. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats (1999). *Phytother. Res.*, 13: 689-691.
- Marcília Pinheiro da Costa^I; Nereide Stela Santos Magalhães^I; Fabiano E. S. Gomes^{II}; Maria Aparecida M. Maciel. (2007). Uma revisão das atividades biológicas da *trans-*

- desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara* Rev. bras. Farmacognosia (17) 2.
- Cotgreave I., A. and Gerdes, R. G. (1998). Recent trends in glutathione biochemistry- glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242: 1-9.
- Coultas, L. and Strasser, A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 13: 115-123.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341: 233-249.
- Curtin, J.F., Donovan, M. and Cotter, T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.*, 265: 49-72.
- Dalton, Jr.W.T.; Ahearn, M.J., McCredie, K.B.; Freireich, E.J., Stass, S.A. and Trujillo, J.M. (1988). HL60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood.*, 71: 242-247.
- Dasmahapatra G, Almenara JA, Grant S (2006). Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* 69: 288-298.
- Davis, W. JR., Ronai, Z. and Tew, K.D. (2001). Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Perspectives in Pharmacol.*, 296: 1-6.
- Debatin, K.M. (2000). Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol. Lett.*, 112-113: 41-48.
- Denizot, F. and Lang,, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability. *J. Immunol. Methods.*, 89: 271-277.
- Deveraux, Q.L.; Roy, N.; Stennicke, H.R.; Van Arsdale, T.; Zhou, Q.; Srinivasula, S.M.; Alnemri, E.S.; Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17: 2215-2223.
- Di Stasi, L.C.; Hiruma, C.A.; Guimarães, E.M. and Santos, C.M. (1994). Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoter.*, LXV 6: 529-540.

- Di Stasi, L.C.; Santos, E.M.G.; Santos, C.M. and Hiruma, C.A. (1989). Plantas Mediciniais da Amazônia. Editora UNESP, São Paulo, Brazil. pp, 127-128.
- Dive, C. and Hickmann, J.A. (1991). Drug-target interations: only the first step in the commitment to a programmed cell death ? *Br. J. Cancer.*, 64: 192-196.
- Drexler, H.G.; Matsuo, Y. and MacLeod, R.A.F. (2000). Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia – lymphoma research. *Leuk. Res.*, 24: 881-911.
- Drexler, H.G.; Quentmeier, H.; MacLeod, R.A.F.; Uphohh C.C. and Hu, Z.-B. (1995). Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Res.*, 19: 681-691.
- Duran, N.; Justo, G.Z.; Melo, P.S.; De Azevedo, M.B.M.; Brito, A.R.; Almeida, A.B. and Haun, M. (2003). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81: 387-396.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.*, 411: 342-348.
- Faria JR, Yamamoto M, Faria RMD *et al.* (2006). Fludarabine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia - the role of P53, Bcl-2, Bax, Mcl-1, and Bag-1 proteins. *Brazilian J. Méd. and Biol. Res.* 39: 327-333.
- Feng, S. and Huang, G. (2001). Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J Control Release.*, 71: 53-69.
- Ferdous, A.J.; Stembridge, N.Y. and Singh, M. (1998). Role of monensin PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins in vitro. *J. Control. Release.*, 50: 71-78.
- Finkel, E. (2001). The mitochondrion: Is it central to apoptosis? *Science.* 292: 624-626.
- Fischer, U. and Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol. Rev.* 57: 187-215.
- Fleckenstein, A. Janke, J., Doring, H.J. and Leder, O. (1974). Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca²⁺ overload - a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 4: 563-580.

- Fontana, G.; Pitarresi, G.; Tomarchio, V.; Carlisi, B. and San Biagio, P.L. (1998). Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials.*, 19: 1009-1017.
- Fraser, A. and Evan, G. (1996). A license to kill. *Cell.*, 85: 781-784.
- Freire, A.C.G.; Melo, P.S.; Aoyama, H.; Haun, M.; Durán, N. and Ferreira, C.V. (2003). Cytotoxicity effect of lactone from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. *Planta Med.*, 69: 67-69.
- Fresta, M.; Puglisi, G.; Giammona, G.; Cavallaro, G.; Micali, N. and Furneri, P.M. (1995). Pefloxacin mesilate-loaded and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles - characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.*, 84: 895-902.
- Gabbita, S.P., Robinson, K.A., Stewart, C.A., Floyd, R.A. and Hensley, K. (2000). Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Free Radical Biology and Aging Program.*, 376: 1-13.
- Galitovsky VE, Gogvadze VG. (2001). Investigation of calcium accumulation in mitochondria in cells undergoing apoptosis. *Biochem-Moscow* 66: 628-631.
- Gamisans, F.; Lacoulonche, F.; Chauvet, A.; Espina, M.; Garcia, M.L. and Egea, M.A. (1999). Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *Int. J. Pharm.*, 179: 37-48.
- Gartel, A.L. (2005). The conflicting roles of the cdk inhibitor p21((CIP1/WAF1)) in apoptosis. *Leuk. Res.* 29: 1237-1238.
- Ghibelli, L.; Coppola, S.; Rotilio, G.; Lafavia, E.; Maresca, V. and Ciriolo, M.R. (1995). Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun.*, 216: 313-320.
- Giordano OS, Pestchanker MJ, Guerreiro E, Saad JR, Enriz RD, Rodriguez AM, Jáuregui EA, Guzmán J, Maria AOM, Wendel GH 1992. Structure-activity relationship in the gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J Med Chem* 35: 2452-2458.
- Gorczyca, W.; Gong, J.; Ardelt, B.; Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (1993). The cell cycle related differences in sensitivity of HL60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.*, 53: 3186-3192.

- Gottlieb RA (1999). Mitochondria: Ignition chamber for apoptosis. *Molecular Genetics Metabolism* 68: 227-231.
- Gottlieb RA (2000). Role of mitochondria in apoptosis *Critical Reviews In Eukaryotic Gene Expression* 10: 231-239.
- Gottlieb RA (2001) Mitochondria and apoptosis *Biological Signals And Receptors* 10: 147-161.
- Grosse, P.Y.; Bressolle, F. and Pinguet, F. (1997). Methyl-beta-cyclodextrin in HL-60 parental and multidrug-resistant cancer cell lines: effect on the cytotoxic activity and intracellular accumulation of doxorubicin. *Cancer Chemoth. Pharmacol.* 40: 489-494.
- Grosse, P.Y.; Bressolle, F. and Pinguet, F. (1998). In vitro modulation of doxorubicin and docetaxel antitumoral activity by methyl-beta-cyclodextrin. *Eur. J. Cancer.* 34: 168-174.
- Grosse, P.Y.; Bressolle, F.; Rouanet, P.; Joulia, J.M. and Pinguet, F. (1999). Methyl-beta-cyclodextrin and doxorubicin pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection of these drugs alone or together in the rabbit. *Int. J. Pharm.* 180: 215-223.
- Grynberg, N.F.; Echevarria, A.; Lima, J.E.; Pamplona, S.S.R.; Pinto, A.C. and Maciel, M.A.M. (1999). Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenes, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 65: 687-689.
- Guterres, S.S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J-Ph. and Puisieux, F. (1995). Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac .1. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, 113: 57-63.
- Guterres, S.S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Puisieux, F. and Devissaguet, J.P. (2000). Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: protection against muscular damage in rats. *J. Biom. Sci.-Pol. Ed.* 11: 1347-1355.
- Hakansson, P.; Lassen, C.; Olofsson, T.; Baldetorp, B.; Karlsson, A.; Gullberg, U. and Fioretos, T. (2004). Establishment and phenotypic characterization of human U937 cells with inducible P210 BCR/ABL expression reveals upregulation of CEACAM1 (CD66a). 18: 538-547.

- Halestrap, A.P.; Kerr, P.M.; Javadov, S. & Woodfield, K.Y. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366: 79-94.
- Hampton, M.B.; Vanags, D.M.; Porn-Ares, M.I.; Orrenius, S. (1996). Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. *FEBS Lett.* 399: 277-282.
- Hanson, R.L.; Lardy, H.A. and Kupchan, S.M. (1970). Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide and alpha-methylene lactone tumor inhibitors. *Science.*, 168: 368-378.
- Harada, A. (2001). Cyclodextrin-based molecular machines. *Acc. Chem. Res.* 34: 456-464.
- Hartmann, B.L.; Geley, S.; Löffler, M. Hattmannstorfer, R.; Strasser-Wozak, E.M.; Auer, B. and Kofler, R. (1999). Bcl-2 interferes with the execution phase, but not upstream events, in glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Oncogene.* 18: 713-719.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.*, 407: 770-776.
- Herr, I. and Debatin, K.M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 98: 2603-2610.
- Hickman, J.A. (1996). Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur. J. Cancer.*, 324: 921-926.
- Hirano. T.. Oka. K.. Kawashima. E.. Akiba. M. 1989. Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on mitogen-induced proliferation of human peripheral-blood lymphocytes. *Life Sci.* 45. 1407-1411.
- Hirayama, F. and Uekama, K. (1999). Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Adv Drug Deliv Rev.*, 36: 125-141.
- Hirpara, J.L.; Seyed, M.A.; Loh, K.W.; Dong, H.; Kini, R.M. and Pervaiz, S. (2000). Induction of mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in the absence of caspase activation is insufficient for effective apoptosis in human leukemia cells. *Blood* 95: 1773-1780.
- Hiruma-Lima, C.A.; Spadari-Bratfisch, R.C.; Kassisse, D.M. and Souza-Brito, A.R.M. (1999). Anti-ulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Med.*, 65: 325-330.

- Hiruma-Lima, C.A.; Toma, W.; Souza-Gracioso, J.; Almeida, A.B.A.; Batista, L.M.; Magri, L.; Paula, A.C.B.; Soares, F.R., Nunes, D.S. and Souza-Brito, A.R.M. (2002). Natural *trans*-crotonin: the anti-ulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 452-456.
- Hockenbery, D.M.; Oltvai, Z.N.; Yin, X-M.; Milliman, C.L.; Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- Hugh, J.M.B. (2003). Apoptosis and leukemia. *British J. Haematol.*, 123: 577-585.
- Ikeda, K.; Kajiwara, K.; Tanabe, E.; Tokumaru, S.; Kishida, E.; Masuzawa, Y. and Kojo, S. (1999). Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL60 cells. *Biochem. Pharm.*, 57: 1361-1365.
- Irie, T. and Uekama, K. (1997). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 86: 147-162.
- Israels, L.G. and Israels, E.D. (1999). Apoptosis. *Stem Cells.*, 17: 306-313.
- Jacobson, M.D and Evan, G.I. (1994). Apoptosis. Breaking the ICE. *Curr Biol.*, 4: 337-340.
- Jain, R.A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.*, 21: 2475-2490.
- Jeon, H-J.; Jeong, Y-I.; Jang, M-K.; Park, Y-H. and Nah, J-W. (2000). Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *Int. J. Pharm.*, 207: 99-108.
- Jia, L.; Patwari, Y.; Srinivasula, S.M.; Newland, A.C.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. and Kelsey, S.M. (2001). Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*. 20: 4817-4826.
- Johnstone, R.W.; Ruefli, A.A. and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell.*, 108: 153-164.
- Juranka, P.F.; Zastawny, R.L. and Ling, V. (1989). P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 3: 2583-2592.
- Kang, J.; Kumar, V.; Chowdhury, P.R. and Hohl, R. (2002). Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability, and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 163-170.
- Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2000). Induction by cancer chemotherapy. *Experimental. Cell Res.*, 256: 42-49.

- Kelso, G.F.; Porteous, C.M.; Coulter, C.V.; Hughes, G.; Porteous, W.K.; Ledgerwood, E.C.; Smith, R.A.J.; Murphy, M.P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells – Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 276: 4588-4596.
- Kerr, J.F.R. (1995). Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.*, 5: 55-57.
- Kerr, J.F.R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.*, 181-182: 471-474.
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, 26: 239-257.
- Khosravi-Far, R. and Esposti, M.D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biology & Therapy.* 11: 1051-1057.
- J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 8, 6504-6510, February 22, 2002 Paclitaxel Affects Cytosolic Calcium Signals by Opening the Mitochondrial Permeability Transition Pore*
Jackie F. Kidd, Mary F. Pilkington, Michael J. Schell[‡], Kevin E. Fogarty[§], Jeremy N. Skepper[¶], Colin W. Taylor, and Peter Thorn
- Kim, R. (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer.* 103: 1551-1560.
- Kim, S.Y.; Ha, J.C. and Lee, Y.M. (2000). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres. II. Thermo-responsive drug release behaviors. *J. Control. Release.*, 65: 345-358.
- Kobayashi Hirofumi, Thirman Michael J., Rowley Dr. Janet D. U937 cell line has a t(10;11)(p13-I4;q14-21) rather than a deletion of 11q. (2006). *Genes, Chromosomes and Cancer* Volume 13, Issue 3 , Pages 217 – 218.
- Koeffler, H.P. and Golde, D.W. (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood.* 56: 344-350.

- Kohroki, J.; Muto, N.; Tanaka, T.; Itoh, N.; Inada, A. and Tanaka, K. (1998). Induction of differentiation and apoptosis by dithizone in human myeloid leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 22: 405-412.
- Thapsigargin directly induces the mitochondrial permeability transition P Korge, JN Weiss - *FEBS Journal*, 1999 *Eur. J. Biochem.* 265, 273-280
- KUBO, I; ASAKA, Y; SHIBA T A, K. Insect growth. inhibitory norditerpenes, cis-dehydrocrotonin and trans-. dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* 1991;30(8):2545-6.
- Lacour, S.; Micheau, O. Hammann, A.; *et al.*, (2003). Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene.* 22: 1807-1816.
- Lambert, G.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H. Guilk, A. and Couvreur, P. (2000). Polyisobutylecyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharm. Res.*, 17: 707-714.
- Larsson, A., Orrenius, S., Holmgren, A. and Mannervik, B. eds. (1983). Functions of glutathione. Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects. New York; Raven.
- Lassus, P.; Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Sci.* 297:1352-1354.
- Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H. and Devissaguet, J-Ph. (1999). Polymeric nanocapsules as drug delivery systems - A review. *STP Pharma Sci.*, 9: 411-418.
- Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S. and Wang, X.D. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Li, Y-P.; Pei, Y-Y.; Zhang, X-Y.; Gu, Z-H.; Zhou, Z-H.; Yuan, W-F.; Zhou, J-J.; Zhu, J-H. and Gao, X-J. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release.*, 71: 203-211.
- Liu, M.J.; Wang, Z.; Li, H.X.; Wu, R.C.; Liu, Y.Z. and Wu, Q.Y. (2004b). Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. *Toxicol. Appl. Pharm.* 194: 141-155.

- Liu, Y.; Chen, G.; Cao, D.; Ge, Z. and Yuan, Y.J. (2004a). Inclusion complexes of paclitaxel and oligo (ethylenediamino) bridged bis(β -cyclodextrin)s: solubilization and antitumor activity. *Bioor. & Med. Chem.* 12: 5767-5775.
- Loftsson, T.; Masson, M. and Brewster, M.E. (2004). Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, 93: 1091-1099.
- Lozzio, B.B., *et al.* (1981). A multipotential leukemia cell line (K562) of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 546-550.
- Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. (1975a). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45: 321-334.
- Lozzio, C.B. and Lozzio, B.B. (1975b). Properties and usefulness of the original K562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* 3: 363-370.
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C. and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94: 481-490.
- Maciel, M.A.M. (1997). *C. cajucara*: uma escolha etnobotânica. In: Tese: Doutor em Química. IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil. p. 150.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Arruda, A.C.; Pamplona, S.G.S.R.; Vanderlinde, F.A.; Lapa, A.J.; Echevarria, A.; Grynberg, N.F.; Côlus, I.M.S.; Farias, R.A.F.; Luna Costa, A.M. and Rao, V.S.N. (2000). Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharm.*, 70: 41-55.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Brabo, S.N. and Arruda, A.C. (1998). Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados de *C. cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. *Rev. Univer. Rural Série Ciências Exatas Terra* 18/20: 17-34.
- J. L. Maia¹; M. H. A. Santana¹; M. I. Ré. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process *Braz. J. Chem. Eng.* vol.21 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2004
- Marchal-Heussler, L.; Maincent, P.; Hoffman, M.; Spittler, J. and Couvreur, P. (1990). Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparations. *Int. J. Pharm.*, 58: 115-122.

- Martin Del Valle, E.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Proc. Biochem.* 39: 1033-1046.
- Martins, J.E.C. (1989). Plantas medicinais de uso na Amazônia. In: Centros de Estudos Jurídicos do Pará. Belém, Brazil. pp. 92.
- Matés, J.M. and Sánchez-Jimenez, F.M. (2000). Role of active oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 157-170.
- Matés, M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.*, 153: 83-104.
- Matsura, T.; Kai, M.; Fujii, Y.; Ito, H. and Yamada, K. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL60 cells requires caspase-3 activation. *Free Rad. Res.*, 30: 73-83.
- McCollum G.; Keng, P.C.; States, J.C. and McCabe, M.J. (2005). Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G(2)/M arrest in U937 myeloid leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2: 877-887.
- McConkey, D.J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Lett.*, 99: 157-168.
- McConkey, D.J.; Orrenius, S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 357-366.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1984). Glutathione. *Ann Rev. Biochem.*, 52: 711-760.
- Melo, P.S., Durán, N. and Haun, M. (2002). Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21: 281-288.
- Melo, P.S.; Durán, N. and Haun, M. (2001). Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. *Toxicology.*, 159: 135-141.
- Miglietta, A.; Cavalli, R.; Bocca, C.; Gabriel, L. and Gasco, M.R. (2000). Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int. J. Pharmaceutics.*, 210: 61-67.
- Minko, T.; Kopecková, P. and Kopecek, J. (2001). Prary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. *J. Control. Release.*, 71: 227-237.

- Molpeceres, J.; Aberturas, M. R.; Chacon, M.; Berges, L.; Guzman, M.; *J. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. J. Microencapsul.* 14: 599-614.
- Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F. and Barratt, G. (2000). Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, 89: 614-626.
- Muller, B.W. and Brauns, U. (1985). Solubilization of drugs by modified β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 26, 77-88.
- Muller, C.R.; Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Lucca Freitas, L.; Pesce Da Silveira, N.; Dalla Costa, T. and Guterres, S.S. (2001). Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie.*, 56: 864-867.
- Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuch, H. and Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.*, 187: 143-152.
- Newburger, P.E.; Chovaniec, M.E.; Greenberger, J.S. and Cohen, H.J. (1979). Functional-changes in human-leukemic cell-line HL-60 - model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol.*, 82: 315.
- Nicoletti, I. ; Migliorati, G. ; Pagliacci, M. C. ; Grignani, F. ; Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 1991,139 (2): 271-279.
- Oda, T.; Sadakata, N.; Komatsu, N. and Muramatsu, T. (1999). Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. *J. Biochem.*, 126: 715-721.
- Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium – apoptosis link. *Mol. Cell Bio.* 4: 552-565.
- Panchagnula, R. and Thomas, N. S. (2000). Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics.* 201 (2): 131-150.
- Panchagnula, R. (1998). Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics.* 172 (1-2): 1-15.

- Panyam, J. and Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.*, 55: 329-347.
- Perazzo, F. F.; Rodrigues, M. ; Carvalho, J. C. T. ; Antoniassi, N. C. Antiinflammatory and antinociceptive activities of terpenoids from *Croton Cajucara Benth.*. In: II Word Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 1997, Mendonza. II Word Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, 1997.
- Petronilli, C Cola and P Bernardi V J. *Biol. Chem.*, Vol. 268, Issue 2, 1011-1016, Jan, 1993
Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca²⁺.
- Pinto, L.M.A.; Jesus, M.B.; De Paula E.; Lino A.C.S.; Alderete J.B.; Duarte, H.A.; Takahata, Y. (2004). Elucidation of inclusion compounds between β -cyclodextrin/local anaesthetics structure: a theoretical and experimental study using differential scanning calorimetry and molecular mechanics. *J.Molecular Structure*. 678: 63-66
- Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A. and Couvreur, P. (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 13: 155-168.
- Piwocka, K., Jaruga, E., Skierski, J., Gradzka, I. and Sikora, E. (2001). Effect of glutathione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in jurkat cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 31: 670-678.
- Prior, S.; Gander, B.; Blarer, N.; Merkle, H.P.; Subirá, M.L.; Irache, J.M. and Gamazo, C. (2002). *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15: 197-207.
- Puisieux, F., Barrat, G., Couarraze, G., Couvreur, P., Devissaguet, J-P., Dubernet, C., Fattal, E., Fessi, H., Vauthier, C. and Benita, S. (1994). Em *Polymeric Biomaterials*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York. Cap 16.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Doelker, E. and Fessi, H. (1998b). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm. Res.* 15: 1056-1062.
- Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H. and Doelker, E. (1998a). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development Ind. Pharm.* 24: 1113-1128.

- Quintanar-Guerrero, D.; Fessi E.H.; Allémann, E. and Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D,L lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 143: 133-141.
- Rajewski, R.A. and Stella, V.J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci.*, 85: 1142-1169.
- Reed, J.C. (1997). Cytochrome c: Can't live with it - Can't live without it. *Cell.* 91: 559-562.
- Reed, J.C. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell.* 3: 17-22.
- Reiners, J.J. and Kessel, D. (2005). Susceptibility of myelomonocytic leukemia U937 cells to the induction of apoptosis by the non-peptidic Bcl-2 ligand HA14-1 is cell cycle phase-dependent. *Cancer Lett.* 221: 153-163.
- Ren, X.; Xue, Y.; Liu, J.; Zhang, K.; Zheng, J.; Luo, G.; Guo, C.; Mu, Y. and Shen, J. (2002). A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. *Chembiochem.*, 3: 356-363.
- Renner, K.; Amberger, A.; Konwalinka, G.; Koeffler, R. and Gnaiger E. (2003). Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1642: 115-123.
- Rodríguez, E., Towers, G.H.N. and Mitchell, J.C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry.*, 15: 1573-1580.
- Cytotoxicity of *trans*-Dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 Cells and Rat Hepatocytes Jaime A.Rodríguez, Marcela Haun. 1999. *Planta Med* 1999; 65:522-526
- Roy, M.K.; Thalang, V.N.; Trakoontivakorn, G. and Nakahara, K. (2004). Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 67: 41-51.
- Rozalski M, Mirowski M, Balcerzak E. (2005). Induction of caspase 3 activity, bcl-2 bax and p65 gene expression modulation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by doxorubicin with amifostine. *Parmaicol. Reports* 57: 360-366.
- Rumjanek, V.M.; Trindade, G.S.; Wagner-Souza, K.; Meletti-de-Oliveira, M.C.; Marques-Santos, L.F.; Maia, R.C. and Capella, M.A.M. (2001). Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *Anais Academia Brás. Cienc.* 73: 57-69.

- Sakashita, A., Nakamaki, T., Tsuruoka, N., Honma, Y., Hozumi, M., 1991. Granulocyte colony-stimulating factor, not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, cooperates with retinoic acid on the induction of functional Nformyl- methionyl- phenylalanine receptors in HL60 cells. *Leukemia* 5: 26-31.
- Santos-Magalhães, N. S.; Pontes, A.; Pereira, V.M.W. and Caetano, M.N.P. (2000). Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, 208: 71-80.
- Schaffazick, S.R., Guterres, S.S.U., Freitas, L.D., Pohlmann, A.R. (2003). Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. *Quimica Nova.*, 26: 726-737.
- Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L, Sepulveda B. (2005). Gastroprotective effect and cytotoxicity of natural and semisynthetic labdane diterpenes from *Araucaria araucana* resin. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A J. Biosc.* 60: 511-522.
- Schneider, W.C. and Hogeboom, G.H. (1950). Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 183: 123-128.
- Schroeder, C.P., Godwin, A.K., O'Dwyer, P.J., Tew, K.D., Hamilton, T.C. and Ozols, R.F. (1996). Glutathione and drug resistance. *Cancer Invest.*, 14: 158-168.
- Scorrano, L. and Korsmeyer S.J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 304: 437-444.
- Seibert, H.; Balls, M.; Fentem, J. H.; Bianchi, V.; Clothier, R. H.; Dierickx, P. J.; Ekwall, B.; Garle, M.J.; Gómez-Lechón, M.J.; Gribaldo, L.; Gulden, M.; Liebsch, M.; Rasmussen, E.; Roguet, R.; Shrivastava, R. and Walum, E. (1996). Acute toxicity testing in vitro and the classification and labeling of chemicals. *ATLA.*, 24: 499-510.
- Sepulveda B, Astudillo L, Rodriguez JA. (2005). Gastroprotective and cytotoxic effect of dehydroabietic acid derivatives. *Pharm. Res.* 52: 429-437.
- Sharma, D.; Chelvi, T.P.; Kaur, J.; Chakravorty, K.; De T.K.; Maitra, A. and Ralhan, R. (1996). Novel Taxol(R) formulation: Polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol(R) for drug delivery in cancer therapy. *Oncol Res.*, 8: 281-286.

- Shieh ,D.E.; Cheng, H.Y.; Yen, M.H.; Chiang, L.C. and Lin, C.C. (2006). Baicalin-induced apoptosis is mediated by Bcl-2-dependent, but not p53-dependent, pathway in human leukemia cell lines. *American J. Chinese Med.* 34: 245-261.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine.*, 27: 916-921.
- Silva, R.M.; Oliveira, F.A.; Cunha, K.M.A.; Maia, J.L.; Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Nascimento, N.R.F.; Santos, F.A. and Rao, V.S.N. (2005). Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vasc. Pharmacol.* 43: 11-18.
- Silva, R.M.; Santos, F.A.; Rao, V.S.N.; Maciel, M.A. and Pinto, A.C. (2001). Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism.*, 3: 452-456.
- Simms-Waldrup T, Hernandez J, Shankar D, *et al.* (2005). Targeting Bcl-2 in acute myeloid leukemia cells. *J. Inv. Méd.* 54: S105-S105.
- Simões JC, Silva AJR, Serruya H, Bentes MHS (1979). Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara*. Benth (Euphorbiaceae). *Ciênc e Cult* 31: 1140–1141.
- Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U.C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins *Biotechnol. Adv.* 20: 341-359.
- Singla, A.K.; Garg, A. and Aggarwal, D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *Int. J. Pharm.*, 235: 179-192.
- Slater, A.F.G., Stefan, C., Nobel, I., Dobbelsteen, D.J. and Orrenius, S. (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.*, 82/83: 149-153.
- Slee, E.A.; Adrain, C. and Martin, S.J. (1999a). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 6: 1067-1074.
- Slee, E.A.; Harte, M.T.; Kluck, R.M.; Wolf, B.B.; Casiano, C.A.; Newmeyer, D.D.; Wang, H.G.; Reed, J.C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E.S.; Green, D.R. and Martin, S.J. (1999b). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.*, 144: 281-292.
- Soetzer, O.J.; Pogrebniak, A.; Pelka-Fleischer, R.; Hasmann, M.; Hiddemann, W. and Nuessler, V. (2002). Modulation of apoptosis by mitochondrial incouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity. *Biochem. Pharm.* 63: 471-483.

- Song, Z.; Yao, X. and Wu, M. (2003). Direct interaction between surviving and Smac/DIABLO is essential for anti-apoptotic activity of surviving during Taxol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 23130-12140.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. and Rudzinski, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Rel.*, 70: 1-20.
- Souza-Brito, A.R.; Rodriguez, J.A; Hiruma-Lima, C.A.; Haun, M. and Nunes, D.S. (1998). Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *C. cajucara*. *Planta Med.*, 64: 126-129.
- Stella, V.J. and Rajewski, R.A. (1997). Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res.*, 14: 556-567.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.*, 1387: 17-31.
- Stevanovi´cMagdalena M.,¹ Branka Jordovi´c,² and Dragan P. Uskokovi´c¹ *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2007, Preparation and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles Containing Ascorbic Acid
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Cancer.* 17: 565-577.
- Szejtli, J. (1994). Medicinal applications of cyclodextrins medicinal. *Res. Rev.* 14: 353-386.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev.*, 98: 1743-1754.
- Szente, L. and Szejtli, J. (1999). Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Advanced drug delivery reviews.* 36: 17-28.
- Theodore B. Moore^{1, 2}, H. Phillip Koeffler³, Joyce M. Yamashiro^{1, 2} and Randal K. Wada 239-245 Volume 14, Number 3 / May, 1996` *Clinical and Experimental Metastasis*
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.*, 267: 1456-1462.
- Thompson, D.O. (1997). Cyclodextrins--enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, 14: 1-104.

- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science.*, 281: 1312-1316.
- Torsoni, M.A., Viana, R.I. and Ogo, S.H. (1998). Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 46: 147-156.
- Trindade, G.S.; Capella, MAM.; Capella, L.S.; CAPELLA LS, Afonso-Mittidieri, O.R. and Rumjanek, V.M. (1999). Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol.* 69: 694-699.
- Tsou, M.F.; Lu, H.F.; Chen, S.C.; Wu, L.T.; Chen, Y.S.; Kuo, H.M.; Lin, S.S.; Chung, J.G. (2006). Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res.* 26: 1965-1971.
- Tsuruta, F.; Sunayama, J.; Mori, Y.; Hattori, S.; Shimizu, S.; Tsujimoto, Y.; Yoshioka, K.; Masuyama, N. and Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23: 1889-1899.
- Uekama, K. (2004). Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* 52: 900-915.
- Uekama, K., Hirayama, F. and Irie, T. (1998). Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev.*, 98: 2045-2076.
- Uzunoglu, S.; Uslu, R.; Tobu, M.; Saydam, G.; Terzioglu, E.; Buyukkececi, F. and Omay, S.B. (1999). Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. *Leuk. Res.*, 23: 507-512.
- Sydney O. Ugwu, Marcos J. Alcalá, Renu Bhardwaj and James Blanchard Characterization of the complexation of diflunisal with hydroxypropyl- β -cyclodextrin *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 19, Issues 3-4, 1 March 1999, Pages 391-397
- Van den Bergh, M.E. (1982). In: Plantas medicinais da Amazônia – contribuição ao seu Conhecimento Sistemático, 2nd ed. Museu Paraense Emílio Goeldi, CNPq-MCT (Coleção Adolpho Ducke), Belém, Brazil. pp.124-125 p. 168.

- Vander Heiden, M.G.; Chandel, N.S.; Williamson, E.K.; Schumacker, P.T. and Thompson, C.B. (1997). Bcl-x (L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91: 627-637.
- Vandervoort, J. and Ludwig, A. (2001). Preparation factors affecting the properties of polylactide nanoparticles: a factorial design study. *Pharmazie.*, 56: 484-488.
- Vermes, I.; Haanen, C. and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*. 243: 167-190.
- Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2003a). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131-149
- Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2003b). Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 36: 165-175.
- Verrier, F.; Deniaud, A.; LeBras, M.; Metivier, D.; Kroemer, G.; Mignotte, B.; Jan, G. and Brenner, C. (2004). Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene*. 23: 8049-8064.
- Vila, A.; Sánchez, A.; Tobio, M.; Calvo, P. and Alonso, M.J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release*, 78: 15-24.
- Vina, J. ed. (1990). Glutathione: metabolism and physiological functions. Boca Raton: CRC Press.
- Voehringer, D.W. (1999) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radical Biology & Medicine.*, 27: 945-950.
- Wang YF, Chen NS, Chung YP, *et al.*(2006). Sodium butyrate induces apoptosis and cell cycle arrest in primary effusion lymphoma cells independently of oxidative stress and p21(CIP1/WAF1) induction. *Mol. Cell. Biochem.* 285: 51-59.
- Weis, M; Kass, G.E. and Orrenius, S. (1994). Further characterization of the events involved in mitochondrial Ca⁺² release and pore formation by prooxidants. *Biochem. Pharmacol.* 47: 2147-2156.
- Wendt J, Radetzki S, von Haefen C, *et al.* Induction of p21 (CIP/WAF-1) and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene*. 25: 972-980.
- Wyllie, A.H., (1985). The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.*, 5: 131-142.

- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.K. and Currie, A.R. (1980). Cell Death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-305.
- Xu, K. and Thornalley, P.J. (2001). Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 61: 165-177.
- Yamada, K.; Arita, K.; Kobuchi, H.; Yamamoto, S.; Yoshioka, T.; Tamai, H.; Utsumi, K. (2003). Cholesteryl-hemisuccinate-induced apoptosis of promyelocytic leukemia HL-60 cells through a cyclosporin A-insensitive mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 65 (3): 339-348.
- Yang, J.; Liu, X.S.; Bhalla, K.; Kim, C.N.; Ibrado, A.M.; Cai, J.Y.; Peng, T.I.; Jones, D.P. and Wang, X.D. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Sci.* 275: 1129-1132.
- Yang, M.Y.; Lau, S.S. and Monks, T.J. (2005). 2,3,5-tris(Glutathion-S-yl)hydroquinone (TGHQ)-mediated apoptosis of human promyelocytic leukemia cells is preceded by mitochondrial cytochrome c release in the absence of a decrease in the mitochondrial membrane potential.. *Toxicolog. Sci.* 86: 92-100.
- Yoo, H.S.; Lee, K.H.; Oh, J.E. and Park, T.G. (2000). *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J. Control Release.*, 68: 419-431.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74: 139-162.
- Zhang, Y.; Fujita, N. and Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21 Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*. 18: 1131.
- Zhao, L.; Orton, E. and Vemuri, N.M. (2002). Predicting solubility in multiple nonpolar drugs-cyclodextrin system. *J. Pharm. Sci.*, 91: 2301-2306.
- Zhong L, Li CM, Hao XJ, *et al.* (2005). Induction of leukemia cell apoptosis by cheliensisin A involves down-regulation of Bcl-2 expression. *Acta. Pharmacol. Sinica*. 26: 623-628.

VII - ANEXO

VII - ANEXO

VII.1. ATIVIDADES ACADÊMICAS

Participações em Congressos

- 1) 2º Reunião da Rede de Nanobiotecnologia, realizada nos dias 28 e 29 de outubro de 2003 na UNICAMP - Campinas – SP
- 2) XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Caxambú, Minas Gerais, no período de 15 a 18 de maio de 2004.
- 3) 15th SIS – Surfactants in Solution Symposium – Fortaleza, CE, Brazil, no período de 6 a 11 de junho de 2004.
- 4) XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular - SBBC. IX Congresso Iberoamericano de Biologia Celular, em Campinas, SP, no período de 15 a 18 de julho de 2004.
- 5) The Network of Nanobiotechnology, 08-11 de março de 2005, São Pedro, SP.
- 6) X International Macromolecular Colloquium, 10-13 de abril de 2005, Gramado, RS, Brasil.
- 7) XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Águas de Lindóia, SP, no período de 02 a 06 de julho de 2005.
- 8) 4ª Seminário de Encerramento das Atividades na Segunda Fase Rede de Nanobiotecnologia, realizado em Campinas, SP, no período de 30 de outubro a 01 de novembro de 2005.
- 9) 13th ECDO Euroconference on Apoptosis, Budapest, Hungria, no período de 1 a 4 de outubro de 2005.

- 10) I Simpósio de Biomedicina, realizado em Campinas, SP, no período de 23 a 25 de novembro de 2005.
- 11) The 6th International Cell Death Symposium on “The Mechanisms of Cell Death in Cancer and Aging”, realizado em Angra dos Reis, RJ, no período de 2 a 5 de junho de 2006.
- 12) XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Águas de Lindóia, SP, no período de 01 a 04 de julho de 2006.
- 13) XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq; 10th IUBMB Conference: “Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts”, realizados em Salvador-BA, Brasil, no período de 21 a 25 de maio de 2007.

Comunicações em Congressos

- 1) Proceedings: 2ª Reunião da Rede de Nanobiotecnologia, realizada na UNICAMP, Campinas, SP, no período de 28 e 29 de outubro de 2003:

Encapsulation of dehydrocrotonin in nanospheres of poly (lactide-co-glycolide) and cytotoxicity on human leukemic cells. **Anazetti, M.C.**, Corrêa, D.H.A., Melo, P.S., Durán, N. & Haun, M.

Cytotoxicity of dehydrocrotonin and dehydrocrotonin-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres, a study in V79 cells. Corrêa, D.H.A., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Durán, N. & Haun, M.

- 2) XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Caxambú, Minas Gerais, no período de 15 a 18 de maio de 2004:

Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with stress oxidative and mitochondrial permeability transition involvement in human leukemic cells. **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Durán, N. & Haun, M.

3) Proceedings: 2th International Cyclodextrin Symposium Le Corum, Montpellier, France, no período de 16 a 19 de maio de 2004:

Cytotoxicity of dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex on human leukemic cells. **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Carvalho, C.A.A., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. & Haun, M.

4) 15th SIS – Surfactants in Solution Symposium – Fortaleza, CE, Brazil, no período de 6 a 11 de junho de 2004:

Preparation and characterization of nanospheres containing an anticancer agent: evaluation of the cytotoxic effects on HL60 cells. **Anazetti, M.C.**, Corrêa, D.H.A., Melo, P.S., Durán, N. & Haun, M.

Cytotoxicity of dehydrocrotonin and dehydrocrotonin-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: a study in V79 cells. Corrêa, D.H.A., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Durán, N. & Haun, M.

5) XII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular - SBBC. IX Congresso Iberoamericano de Biologia Celular, em Campinas, SP, no período de 15 a 18 de julho de 2004:

β -Cyclodextrin complexed with dehydrocrotonin induce apoptosis in HL60 cells as seen by flow cytometry. **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Carvalho, C.A.A., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. & Haun, M.

- 6) Proceedings: The Network of Nanobiotechnology, 08-11 de março de 2005, São Pedro, SP.

Mitochondrial response of HL60 human leukemia cells to the antitumor compound dehydrocrotonin and its β -cyclodextrins complexes **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., De Carvalho, C.A.A., Durán, N., Haun, M.

- 7) X International Macromolecular Colloquium, 10-13 de abril de 2005, Gramado, RS, Brasil.

Comparative cytotoxicity of dehydrocrotonin and its β -cyclodextrins inclusion complexes in the monocytic leukaemia cell line. Frungillo, L., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., De Carvalho, C.A.A., Durá, N., Haun, M.

- 8) XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Águas de Lindóia, SP, no período de 02 a 06 de julho de 2005:

Apoptosis induction of dehydrocrotonin and its cyclodextrins complexes on U937 and K562 leukaemia cells. **Anazetti, M.C.**, Frungillo, L., Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., De Carvalho, C.A.A., Durá, N., Haun, M.

Cytotoxicity of dehydrocrotonin and its β -cyclodextrins complexes in sensitive – human myelogenous leukaemia K562 and K562 resistant cells. Frungillo, L., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., De Carvalho, C.A.A., Durá, N., Haun, M.

- 9) Proceedings: 4ª Seminário de Encerramento das Atividades da Segunda Fase Rede de Nanobiotecnologia:

Investigação do potencial farmacológico da desidrocrotina livre e em sistemas de liberação controlada em células da leucemia humana. Frungillo, L., **Anazetti, M.C.**, de Azevedo, M.B.M., de Carvalho, C.A.A., Duran N., Melo, P.S.

10). 13th Euroconference on Apoptosis:

Requirement for caspases-2, -3, -6, -8 and -9 in stress-induced apoptosis by dehydrocrotonin and its inclusion complexes with beta-cyclodextrins in HL60 cells. **M.C. Anazetti**, L. Frungillo, P.S. Melo, M.B.M. De Azevedo, C.A.A. De Carvalho, N. Durán and M. Haun.

11) VII Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia:

Investigation of the pharmacological potencial of dehydrocrotonin and its β -cyclodextrins inclusion complexes in leukemia cells lines. Lucas Frungillo, Patrícia S. Melo, **Maristella C. Anazetti**, Mariângela B. M. de Azevedo, Carlos A. A. de Carvalho, Nelson Durán and Marcela Haun.

12) I Simpósio de Biomedicina:

Investigação do potencial farmacológico da desidrocrotina livre e em sistemas de liberação controlada em células da leucemia humana. Frungillo, L., **Anazetti, M.C.**, De Azevedo, M.B.M., de Carvalho, C.A.A., Duran N., Melo, P.S.

13) The 6th International Cell Death Symposium on “The Mechanisms of Cell Death in Cancer and Aging”:

Violacein induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL60 cells. **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Duran, N., Haun, M.

14) XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Águas de Lindóia, SP, no período de 01 a 04 de julho de 2006:

Stress oxidative involvement on cytotoxicity induced by DHC and its beta-cyclodextrin complex on HL60 cells. Frungillo, L., **Anazetti, M.C.**, Haun, M., Duran, N., Melo, P.S.

Cell cycle analysis in human colon adenocarcinoma cell lines treated with free dehydrocrotonin and dehydrocrotonin complexed with β -cyclodextrin. Monteiro, P.A., **Anazetti, M.C.**, Haun, M., Duran, N., Melo, P.S.

15) XIV Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, realizado em Campinas, SP, no período de 27 a 28 de setembro de 2006:

Desidrocrotonina livre e veiculada em diferentes sistemas de liberação controlada: comparação dos efeitos citotóxicos em células da leucemia humana. Lucas Frungillo Lima, **Maristella Conte Anazetti**, Dra. Patrícia da Silva Melo.

15) XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq; 10th IUBMB Conference: “Infectious Diseases: Biochemistry of Parasites, Vectors and Hosts”:

Mechanism of violacein- and violacein-loaded nanoparticles- trigger human leukemia cell death by apoptosis. Lucas Frungillo Lima, **Maristella Conte Anazetti**, Patrícia da Silva Melo.

Role of calcium in the regulation of apoptosis in HL60 promyelocytic leukemia-cells. **Maristella Conte Anazetti**, Lucas Frungillo Lima, Patrícia da Silva Melo.

Cursos Ministrados

1) “Embriogênese versus morte celular” no I Simpósio de Biomedicina, realizado em 23 e 24 de novembro de 2005, no total de 08 horas, nas Faculdades Integradas Metropolitanas de Campinas – METROCAMP.

Premiações

1. Trabalho: **Anazetti, M.C.**, Frungillo, L., Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., De Carvalho, C.A.A., Duran, N., Haun, M. “Requirement for caspases-2, -3, -6, -8 and -9 in

stress-induced apoptosis by dehydrocrotonin and its inclusion complexes with beta-cyclodextrins in HL60 cells”. Premiado pela 13th Euroconference on Apoptosis, que aconteceu de 1 a 4 de outubro de 2005, em Budapeste, Hungria. O congresso financiou auxílio estadia e inscrição no congresso e no Second Training Course on Concepts and Methods in Programmed Cell Death.

2. Trabalho: **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Duran, N., Haun, M. “Violacein induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL60 cells”. Premiado pelo The 6Th International Cell Death Symposium on “The Mechanisms of Cell Death in Cancer and Aging”. O congresso financiou auxílio estadia e transporte.

Publicações

- 1) **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Durán, N and Haun, M. (2004). Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. *Toxicology*: **203**: 123-137.
- 2) Gimenez, I.F., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Haun, M., De Azevedo, M.M.M., Duran, N. and Alves, O.L. (2005) Cytotoxicity on V79 and HL60 Cell Lines by Thiolated- β -Cyclodextrin-Au/Violacein *Nanoparticles*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **1**: 352-358.
- 3) Bonilla-Rodriguez, G.O.; Lombardi, F. R. ; Olivieri, J. R. ; De Azevedo Jr, W. F.; **Anazetti, M. C.** ; Santos, G. C. (2005). Snake hemoglobins tetramer stability analyzed by osmotic stress, gel filtration, SAXS and modelling. *The FEBS Journal*. Reino Unido, **272**: 362-363. (ISSN: 1474-3833, Blackwell Publishing).
- 4) Lombardi, Fabio R.; **Anazetti, Maristella C.**; Santos, Giovanni C.; Olivieri, Johnny R.; de Azevedo Jr., Walter F.; Bonilla-Rodriguez, Gustavo O. (2006). Rattlesnake

Hemoglobins: Functional Properties and Tetrameric Stability. *Protein and Peptide Letters*. **13**: 517-523.

5) **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S. (2006). Apoptose: Uma Visão Bioquímica. Revista da Metrocamp. 1ª. Edição.

6) Melo, P.S.; De Azevedo, M.M.M.; **Anazetti, M.C.**; Haun, M. and Duran, N. (2007). Violacein and violacein-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles induce apoptosis via mitochondrial pathway in human leukemic cells. *Eur. J. Pharmacol.* (*no prelo*).

7) **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., Zullo, M.A.T. and Haun, M. (2007). Cytotoxic effects of diosgenin, stigmasterol and its derivative steroids on HL60 cells. *Eur. J. Pharm.* (*submetido*).

8) Corrêa, D.H.A., **Anazetti, M.C.**, Melo, P.S., Durán, N. and Haun, M. (2007) Cytotoxicity of dehydrocrotonin and dehydrocrotonin-loaded poly (*D,L*-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles on V79 cells. *Toxicology Lett.* (*submetido*).

9) **Anazetti, M.C.**, Frungillo, L., De Azevedo, M.B.M., de Carvalho, C.A.A., Duran, N., Haun, M. and Melo, P.S. (2007). Cytotoxicity of dehydrocrotonin and its cyclodextrin complexes on leukemic cell lines. *Toxicology* (*submetido*)

10) Silva, M.V.B., **Anazetti, M.C.**, Tavares, J.F., Silva, M.S., Melo, P.S. and Haun, M. (2007). Comparative cytotoxicity and apoptosis induction of diterpenes isolated from *Xylopia langsdorffiana* on human leukaemia cells. *Eur. J. Pharm.* (*submetido*)

Patentes

1- M.B.M., De Azevedo; J.B., Fabrin-Neto; M., Haun; M.A.T., Zullo; **M.C., Anazetti**; P.S., Melo (2002). “Processo de aplicação de precursores sintéticos esteroídicos de brassinosteróides, seus análogos espiroestanoídicos e seus respectivos compostos de inclusão

em ciclodextrinas como agentes citotóxicos e antitumorais” Protocolo nº 300.183-0 (INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial) em 28/01/2003.

2- M.B.M., De Azevedo; J.B., Fabrin-Neto; M., Haun; M.A.T., Zullo; **M.C., Anazetti**; P.S., Melo (2007). “Processo de aplicação de um diterpeno lactona extraída de *Croton cajucara*, seus derivados sintéticos e seus respectivos compostos de inclusão em ciclodextrinas como agentes citotóxicos e antitumorais”. INPI. (*submetida*).