

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

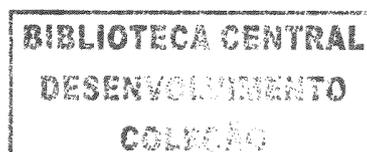
Tese de Doutorado

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE METABÓLITOS
BACTERIANO E FÚNGICO**

Aluna: Natália Bromberg

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas
Março – 2005



Nº CHAMADA	
T/UNICAMP	
B787a	
V	EX
TOMBO BC/	65723
PROC.	16-86-05
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	21.9.05
Nº CPD	

B5 Id 345161

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
DA UNICAMP

B787a Bromberg, Natália.
Atividade antitumoral de metabólitos bacteriano e fúngico / Natália Bromberg. – Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Câncer. 2. Compostos naturais. 3. HL60.
4. Apoptose. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo.
II. Instituto de Química. III. Título.

*Aos meus pais, Nazareth e Sansom,
por seus exemplos de vida, conduta humana,
pelo incentivo e oportunidade que sempre recebi para
prosseguir em meu aperfeiçoamento profissional.
Vocês são a base de todas as minhas conquistas.
Meu amor e gratidão.*

*Às minhas irmãs, Carla e Patrícia,
“gemelas” do meu coração...*

*“Quem ama inventa as coisas a que ama...
Talvez chegaste quando eu te sonhava.
Então de súbito acendeu-se a chama !
Era a brasa dormida que acordava...”*

Mário Quintana

Ao Paulo e sua pontualidade em chegar...

*“Se procurar bem, você acaba encontrando
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”*

Carlos Drummond de Andrade

*“To see a world in a grain of sand
And a heaven in a wild flower
Hold infinity in the palm of your hand
And eternity in an hour.”*

William Blake

*“O segredo é não correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Durán que por tantos anos de convivência, demonstrou sempre sua dedicação à ciência, contribuindo grandemente para a minha vida acadêmica e formação como pesquisadora.

À Profa. Dra. Giselle Z. Justo que, alternando papéis de amiga e mentora, me orientou com paciência, dedicação, carinho, conhecimento e sabedoria durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Bincoletto Trindade e ao Carlos Rocha Oliveira do Centro Interdisciplinar de Investigações Bioquímicas (CIIB) - Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) pelo grande auxílio, disposição e paciência na realização do experimento de expressão de Bcl-2.

À Profa. Dra. Maricilda P. de Mello do Laboratório de Genética Humana - CBMEG / UNICAMP pela disponibilidade da infraestrutura de seu laboratório e preciosos ensinamentos em técnicas envolvendo RNAs e DNAs. Agradeço também à Madalena por sua doçura e ajuda imprescindível na realização dos experimentos.

Ao Chico, pelos agradáveis e saudosos anos de convivência, companheirismo e suporte técnico no Laboratório de Química Biológica - IQ / UNICAMP.

À equipe de coleguinhas do Laboratório de Química Biológica: Ana Paula, Camila, Cida, Edna, Lívia, Marcelo, Márcia, Patrícia, Priscila, Pryscila e Sandrinha.

Aos amigos especiais Maria Alice, Antenor e Renato Espeto por tantos anos de conversas, resmungos, desabafos e cervejas, tornando sempre mais fácil e prazeroso o período compartilhado dedicado à pós-graduação na UNICAMP.

À Profa. Dra. Marcela Haun e ao João Batista Fabrim Neto do Laboratório de Cultura de Células e Biofármacos - IB / UNICAMP pelo uso da infraestrutura do laboratório e suporte técnico.

Ao Dr. Robert Wiltout, Eilene Gruys, Dr. Mориhiro Watanabe, Timothy Back e Jeff Subleski pelo sólido suporte laboratorial e pela acolhida no "Laboratory of Immunology - Experimental Therapy Section" (NCI - NIH, Frederick, MD - EUA).

Ao Paulinho, minha fonte de inspiração, por sua paciência, capacidade em tomar a vida mais simples e bela, e por me fazer tão feliz.

Ao Instituto de Química e seus funcionários pelo apoio técnico e material.

À FAPESP pelo apoio financeiro e assessoria concedidos durante a realização desse trabalho.

Natália Bromberg
Súmula Curricular

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química - Área de concentração Físico-Química	(1997 - 2000)
Bolsista FAPESP, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)	
Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas	(1991 - 1995)
Bacharelado em Química	(1991 - 1996)
Licenciatura em Química	(1991 - 1997)
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)	

PUBLICAÇÕES (2003-2004)

Bromberg, N., Justo, G.Z., Durán, N. e Ferreira, C.V.; "Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect in phosphatases", *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, Aceito, **2004**.

Watanabe, M., Yazawa, H., Back, T., Vasquez, D., **Bromberg, N.**, Murakami, T., Shorts, L., Subleski, J. e Wilttrout, R.; "Hydrodynamic gene delivery of Kringle-5 domain of plasminogen suppresses lung metastasis in mouse renal cell carcinoma", *J. Immunother.* 26: S30, **2003**.

Durán, N., Justo, G.Z., **Bromberg, N.**, De Azevedo, M.M.M. e Haun, M.; "In vitro antitumoral activity of violacein encapsulated in microspheres of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): a comparative study", *30th Annual Meeting and Exposition for the Controlled Release Society*, Glasgow - Escócia, **2003**.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS (2003-2004)

Durán, N., Justo, G.Z., **Bromberg, N.**, Melo, P.S., Haun, M., Ferreira, C.V., De Mello, M.P., Bincoletto, C., De Souza, A.O., De Azevedo, M.M.M., De Azevedo, M.B.M., Leon, I.I. e De Castro, S.; "Overview of violacein biological activities: biochemical aspects of its cytotoxicity and strategies to improve its effectiveness", World Conference on Dosing of Antiinfectives Dosing the Magic Bullets and Symposium New Antineoplastic Magic Bullets and Ehrlich-Symposia on Non-antiinfective Areas; Nuremberg - Alemanha, 9 - 11 de Setembro, Resumo 133, pp A34, **2004**.

Bromberg, N., Justo, G.Z. e Durán, N.; "Cytotoxicity and apoptosis induced by violacein in a murine renal cancer cell line (RENCA)", XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq; Caxambu - MG - Brasil, 15 - 18 de Maio, Resumo P-28 e Apresentação Oral, **2004**.

Bromberg, N., Justo, G.Z., Gruys, M.E., Subleski, J., Wilttrout, R.H. e Durán, N.; "Violacein cytotoxicity proceeds via apoptosis and is mediated by induction of caspase-3 and mitochondrial permeability transition in a murine renal cancer cell line (RENCA)", XII Congresso Brasileiro de Biologia Celular, IX Congresso Ibero Americano de Biologia Celular - SBBC; Campinas - SP - Brasil, 15 - 18 de Julho, Resumo Q 102, **2004**.

Justo, G.Z., **Bromberg, N.**, Durán, N. e Ferreira, C.V.; "Inhibition of serum tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity by violacein", XII Congresso Brasileiro de Biologia Celular, IX Congresso Ibero Americano de Biologia Celular - SBBC; Campinas - SP - Brasil, 15 - 18 de Julho, Resumo S 004, **2004**.

Bromberg, N., Justo, G.Z., Gruys, M.E., Wilttrout, R.H. e Durán, N.; "The protective role of extracellular GSH in violacein cytotoxicity in a murine renal cancer cell line (RENCA)", XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Águas de Lindóia - SP - Brasil, 17 - 20 de Outubro, Resumo 08.009, pp257, **2004**.

De Azevedo, M.M.M., Justo, G.Z., **Bromberg, N.**, Haun, M. e Durán, N.; "Micro and nanospheres of PCL and PLGA: violacein encapsulation, characterization and *in vitro* antitumoral activity", XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Águas de Lindóia - SP - Brasil, 17 - 20 de Outubro, Resumo 10.020, pp 323, **2004**.

Watanabe, M., Yazawa, H., Back, T., Vasquez, D., **Bromberg, N.**, Murakami, T., Shorts, L., Subleski, J. e Wilttrout, R.; "Hydrodynamic gene delivery of Kringle-5 domain of plasminogen suppresses lung metastasis in mouse renal cell carcinoma", 18th Annual Scientific Meeting of the International Society for Biological Therapy of Cancer, Bethesda - EUA, 31 Outubro - 2 Novembro, Resumo S30, **2003**.

Justo, G., **Bromberg, N.**, De Azevedo, M.M.M., Haun, M. e Durán, N.; "Antitumoral efficacy of violacein-loaded poly(E-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres: evaluation of apoptosis as a mechanism of cytotoxicity in promyelocytic leukemia cells (HL60)", HUPPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress; Montreal - Canadá, 8 - 11 de outubro, Resumo 41.30, **2003**.

Durán, N., Justo, G.Z., **Bromberg, N.**, De Azevedo, M.M.M. e Haun, M.; "*In vitro* antitumoral activity of violacein encapsulated in microspheres of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): a comparative study", 30th Annual Meeting and Exposition for the Controlled Release Society; Glasgow - Escócia, 19 - 23 de Julho, Resumo 241, **2003**.

Bromberg, N., Justo, G.Z. e Durán, N.; "Antitumor effects of violacein in Ehrlich Ascites Tumor *in vitro* and *in vivo*", XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Águas de Lindóia - SP - Brasil, 21 - 24 de Setembro, Resumo 08-120 pp 211, **2003**.

Bromberg, N., Justo, G.Z., Melo, P.S., Bincoletto, C., Haun, M. e Durán, N.; "Investigation of biochemical events involved in violacein-induced apoptosis in human HL60 leukemia cells: modulation of Bcl-2 protein expression", XXVIII Meeting of the Brazilian Society of Immunology; Mangaratiba - RJ - Brasil, 05 - 08 de Outubro, Resumo pp 16, **2003**.

Bromberg, N., Justo, G.Z., De Azevedo, M.M.M., Wilttrout, R.H. e Durán, N.; "Cytotoxicity of violacein encapsulated in PLGA/PVA microspheres in different tumor cell lines", 2^a Reunião da Rede de Nanobiotecnologia - UNICAMP; Campinas - SP - Brasil, 28 - 29 de Outubro, Resumo pp 71, **2003**.

De Azevedo, M.M.M., Durán, N., Justo, G.Z., de Oliveira, A.F., Haun, M., Anazetti, M.C., **Bromberg, N.**, Melo, P.S., Marcato, P.D. e Pádua, R.; "Sistemas poliméricos de micro e nanoesferas aplicados à liberação controlada de compostos ativos: preparação, caracterização e estudos biológicos *in vitro*", Oficina sobre Nano Ciência e Tecnologia da UNICAMP; Campinas - SP - Brasil; 5 e 6 de Junho, Resumo pp 38-39, **2003**.

ESTÁGIO E CURSOS (2003-2004)

Estágio de 6 meses (Janeiro-Julho/ 2003) na Experimental Therapeutics Section (ETS), Laboratory of Experimental Immunology (LEI), **National Cancer Institute (NCI) - National Institutes of Health (NIH)**, Frederick - MD - EUA. Trabalho desenvolvido juntamente ao grupo do Dr. Robert H. Wilttrout utilizando o modelo de tumor renal murino (RENCA).

"Cultura de Células Animais"; XII Congresso Brasileiro de Biologia Celular, IX Congresso Íbero Americano de Biologia Celular - SBBC; Campinas - SP - Brasil, Campinas - SP, 15 - 18 de Julho, **2004**.

"Microanálise de matriz extracelular"; XII Congresso Brasileiro de Biologia Celular, IX Congresso Íbero Americano de Biologia Celular - SBBC; Campinas - SP - Brasil, Campinas - SP, 15 - 18 de Julho, **2004**.

"Proteoma: Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteínas por Espectrometria de Massa - Aplicação em Clínica"; Disciplina de Nefrologia - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Hospital do Rim e Hipertensão; São Paulo - SP - Brasil, 25 - 29 de outubro, **2004**.

"NCI - CCR Drug Development Training Course"; Intramural Research Program - National Institutes of Health; Gaithersburg - MD - EUA, 12 e 13 de Março, **2003**.

"Farmacologia Clínica e Ensaio Clínicos"; XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Águas de Lindóia - SP - Brasil, 22 - 23 de Setembro, **2003**.

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE METABÓLITOS BACTERIANO E FÚNGICO

Natália Bromberg

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-orientadora: Giselle Zenker Justo

Laboratório de Química Biológica - Instituto de Química - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz S/N, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas - SP - Brasil

RESUMO

Os potenciais imuno e quimioterapêutico de dois compostos, o imunomodulador agregado protéico de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA) produzido por *Aspergillus oryzae* e o pigmento citotóxico violaceína, produzido pela *Chromobacterium violaceum*, foram avaliados neste trabalho. Para tanto, foram utilizados os modelos experimentais murinos do carcinoma renal (RENCA), tumor ascítico de Ehrlich (TAE), carcinoma pulmonar de Lewis (3LL) e linhagens de células endoteliais e da leucemia mielocítica humana (HL60). Resultados obtidos em experimentos *in vivo* sugeriram atividade antitumoral para a violaceína nas doses de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no modelo experimental do TAE, enquanto o composto P-MAPA, na dose de 5 mg kg^{-1} , também apresentou atividade nos modelos RENCA e 3LL. Além disso, observou-se uma redução no número de metástases pulmonares no grupo de animais inoculados com RENCA e tratados com P-MAPA após a nefrectomia do rim contendo o tumor primário, indicando uma contribuição do composto em protocolos de tratamento de doença residual. Alguns aspectos dos mecanismos envolvidos nestas respostas também foram investigados pela análise de diferentes parâmetros celulares e moleculares *in vitro* e/ou *in vivo* como a indução de apoptose, atividade de células “natural killer” e produção de citocinas. O estudo da citotoxicidade da violaceína em culturas de células RENCA, TAE e HL60 demonstrou a indução de processo apoptótico como mecanismo de ação da droga. A apoptose foi estudada utilizando-se a reação de Feulgen, determinação de fragmentação de DNA, avaliação da atividade de caspases, ensaio de marcação com Anexina V/PI, alterações na expressão da proteína Bcl-2 e no potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi$). O potencial antitumoral demonstrado nesta tese para os metabólitos estudados reforça a possibilidade de aplicação na terapêutica contra o câncer, sendo ainda promissor considerá-los em estudos futuros de terapia combinada.

Palavras-chaves: atividade antitumoral, violaceína, P-MAPA, RENCA, TAE, 3LL, HL60, apoptose.

ANTITUMORAL ACTIVITY OF BACTERIAL AND FUNGIC METABOLITES

Natália Bromberg

Advisor: Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-advisor: Giselle Zenker Justo

Laboratório de Química Biológica - Instituto de Química - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz S/N, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas - SP - Brazil

ABSTRACT

The immuno and chemotherapeutic potentials of two natural compounds, the proteic aggregated polymer of magnesium ammonium phospholinate-palmitoleate anhydride (P-MAPA) isolated from *Aspergillus oryzae* and the cytotoxic violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*, were evaluated in the present work. The murine renal cancer model (RENCA), the Ehrlich ascites tumor (EAT), the Lewis lung carcinoma (3LL), human and murine endothelial cells and the human myelocytic leukemia cell line (HL60) were used as experimental models. The results from *in vivo* experiments suggested an antitumoral activity for violacein in EAT-bearing mice treated with 0.1 and 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, whereas the P-MAPA compound, administered at 5 mg kg^{-1} doses, also extended the survival of RENCA-bearing mice and 3LL tumors. A reduced number of pulmonary metastases was observed in the group of RENCA-bearing mice treated with P-MAPA after nephrectomy of the primary tumor-bearing kidney, suggesting that it may be useful in therapeutic approaches to treat the residual disease. Some aspects of the mechanisms involved in these responses were investigated by analysis of different *in vivo* and/or *in vitro* cellular and molecular parameters such as apoptosis induction, natural killer cell activity and cytokine production. The study of violacein cytotoxicity on RENCA, EAT and HL60 cell cultures indicated the induction of apoptosis as a mechanism of action. Several techniques were used to characterize the apoptotic process such as Feulgen reaction, determination of DNA fragmentation, evaluation of caspase activity, flow cytometry Annexin V/PI assay, evaluation of Bcl-2 protein expression and changes in the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi$). The antitumoral potential of these metabolites, as demonstrated in this work, reinforces the possibility of their application on cancer therapeutics and in future studies of combined therapy.

Keywords: antitumoral activity, violacein, P-MAPA, RENCA, EAT, 3LL, HL60, apoptosis.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xxv
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Figuras	xxix
1. INTRODUÇÃO	1
<hr/>	
1.1. A Pesquisa da violaceína e do P-MAPA	3
1.1.1. Violaceína e suas atividades biológicas	3
1.1.2. P-MAPA, o agregado protéico fúngico	5
1.2. A Evolução Natural: Produtos Naturais	8
1.3. Câncer	12
1.4. Modelos Tumoraes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	16
1.4.1. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)	16
1.4.2. Carcinoma Renal Murino (RENCA)	18
1.4.3. Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)	19
1.4.4. Células Endoteliais	20
1.4.4.1. Células Endoteliais Humanas derivadas de Cordão Umbilical (HUVEC)	21
1.4.4.2. Células do Hemangioendotelioma Murino (EOMA)	21
1.4.5. Células da Leucemia Mielocítica Humana (HL60)	22
1.5. Terapia do Câncer e Apoptose	23
2. OBJETIVOS	31
<hr/>	
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
<hr/>	
3.1. Biossíntese da Violaceína	37
3.2. Biossíntese do P-MAPA	37
3.3. Animais	37

3.4. Manutenção dos modelos tumorais <i>in vivo</i> e protocolos de tratamento dos experimentos	38
3.4.1. Tumor Ascítico de Ehrlich	38
3.4.1.1. Avaliação da atividade antitumoral da violaceína administrada intraperitonealmente	39
3.4.2. Carcinoma Renal Murino (RENCA)	39
3.4.2.1. Anestesia dos animais	40
3.4.2.2. Inoculação intrarrenal (i.r.) do RENCA	40
3.4.2.3. Nefrectomia de rim portador do RENCA	41
3.4.2.4. Protocolo de tratamento do experimento 1: avaliação da atividade antitumoral da violaceína administrada intraperitonealmente (i.p.) após nefrectomia	41
3.4.2.5. Protocolo de tratamento do experimento 2: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado pela mesma via de inoculação do RENCA, subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.)	43
<i>Ensaio de avaliação de atividade de células “natural killer” (NK)</i>	45
3.4.2.6. Protocolo de tratamento do experimento 3: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado i.p. após nefrectomia	46
<i>Dosagem de citocinas séricas</i>	47
3.4.2.7. Protocolo de tratamento do experimento 4: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado pela via i.p. aos animais inoculados i.r. com RENCA	48
3.4.3. Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)	49
3.4.3.1. Protocolo de tratamento do experimento 5: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA no modelo do Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)	50
3.5. Manutenção das Culturas Celulares e Ensaios <i>in vitro</i>	52
3.5.1. Tumor de Ehrlich (TE)	52
3.5.2. Carcinoma renal murino (RENCA), tumor pulmonar de Lewis (3LL) e hemangioma endotelioma murino (EOMA)	52
3.5.3. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)	53
3.5.4. Células da leucemia mielocítica humana (HL60)	54
3.6. Ensaios de Avaliação de Citotoxicidade	54
3.6.1. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan	54
3.6.2. Ensaio de determinação do conteúdo protéico	55
3.6.3. Ensaio de redução de sais de tetrazólio	55
3.6.3.1. Ensaio de redução do MTT [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]	55
<i>Avaliação do efeito da glutatona reduzida (GSH) na citotoxicidade da violaceína em células HL60</i>	56
3.6.3.2. Ensaio de redução do MTS [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-	

sulfofenil)-2H-tetrazólio)]	57
<i>Avaliação do tipo de dano (reversível ou irreversível) ocorrido em células RENCA após tratamento com a violaceína</i>	58
<i>Avaliação do efeito da glutathiona reduzida (GSH) na citotoxicidade da violaceína em células RENCA</i>	59
3.6.4. Ensaio de determinação da atividade fosfatásica	60
3.7. Avaliação de Indução de Apoptose pela Violaceína	60
3.7.1. Reação de Feulgen	60
3.7.2. Avaliação da fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose	61
3.7.3. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina	63
3.7.4. Determinação da atividade de caspase-2 e caspase-9	64
3.7.5. Determinação da expressão de Bcl-2 por imunocitoquímica	65
3.7.6. Marcação com Anexina V/Iodeto de Propídeo e análise por citometria de fluxo	65
3.7.7. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação com o corante JC-1	66
3.7.8. Determinação da atividade de caspase-3 por citometria de fluxo (FACS) após marcação intracelular	67
3.8. Ensaio de determinação de GSH	68
3.9. Análise estatística	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)	73
4.1.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células do tumor de Ehrlich (TE)	73
4.1.2. Ensaio de determinação de glutathiona (GSH)	74
4.1.3. Verificação da indução de apoptose pela violaceína em células TE - Reação de Feulgen	77
4.1.4. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina	79
4.1.5. Determinação da atividade de caspase-2 e caspase-9	81
4.1.6. Ensaio da atividade antitumoral da violaceína <i>in vivo</i> empregando-se células TE	83
4.2. Carcinoma Renal Murino (RENCA)	85
4.2.1. Avaliação da viabilidade de células RENCA pelo ensaio de exclusão do azul de tripan após tratamento com violaceína	85
4.2.2. Avaliação de citotoxicidade da violaceína em células RENCA pelo ensaio de	

redução do MTS	86
4.2.2.1. Avaliação do efeito da adição de GSH na citotoxicidade da violaceína em células RENCA	88
4.2.3. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação com o corante JC-1 em células RENCA tratadas com violaceína	91
4.2.4. Determinação da atividade de caspase-3 por citometria de fluxo (FACS) após marcação intracelular em células RENCA	92
4.2.5. Ensaios <i>in vivo</i> utilizando as células do carcinoma renal murino (RENCA)	94
4.2.5.1. Experimento 1: animais inoculados intrarrenalmente (i.r.) com células RENCA e tratados intraperitonealmente (i.p.) com violaceína após nefrectomia	94
4.2.5.2. Experimento 2: animais inoculados i.p. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA / animais inoculados subcutaneamente (s.c.) com células RENCA e tratados s.c. com P-MAPA	96
4.2.5.3. Experimento 3: animais inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA após nefrectomia	100
4.2.5.4. Experimento 4: animais inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA	106
4.3. Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)	108
4.3.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células do carcinoma pulmonar de Lewis pelo ensaio de redução do MTS	108
4.3.2. Ensaios <i>in vivo</i> utilizando células do carcinoma pulmonar de Lewis (3LL)	109
4.4. Células Endoteliais	111
4.4.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células HUVEC e EOMA pelo ensaio de redução do MTS	111
4.5. Células da Leucemia Mielocítica Humana (HL60)	113
4.5.1. Avaliação da viabilidade das células HL60 pelo ensaio de exclusão do azul de tripan após tratamento com violaceína	113
4.5.2. Citometria de fluxo para avaliação de apoptose utilizando o ensaio de anexina V/iodeto de propídeo (PI)	114
4.5.3. Fragmentação de DNA em gel de agarose	117
4.5.4. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina	119
4.5.5. Determinação da expressão de Bcl-2 (imunocitoquímica)	120
4.5.6. Avaliação do efeito da glutathiona (GSH) na citotoxicidade da violaceína em células HL60	122
4.5.7. Ensaio de quantificação da glutathiona (GSH)	124

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	127
5.1. Conclusões	129
5.2. Perspectivas	130
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7. ANEXOS	157
Anexo 1. Estrutura química da aspirina, morfina, vinblastina, vincristina, etoposídeo e paclitaxel.	159
Anexo 2. Estrutura química da bleomicina, dactinomicina, plicamicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, epotilona D.	161
Anexo 3. Estrutura química da sarcodictina, eleuterobina, fumagilina, (+)-discodemolida, (-)-laulimalida e briostatina.	163
Anexo 4. Procedimento resumido do ensaio com o kit Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA	165
Anexo 5. Procedimento de ajuste do citômetro para calibração das "beads" e, procedimento resumido de ELISA sanduíche (R & D Systems)	167
Anexo 6. Metodologias de avaliação de citotoxicidade	169
Anexo 7. Metodologia de determinação de glutathiona (GSH)	171
Anexo 8. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação celular com o corante JC-1	173
Anexo 9. Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect in phosphatases	175

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACA:** 1-acetoxicavicol
- AO:** *Aspergillus oryzae*
- BSA:** Bovine serum albumin (albumina de soro bovino)
- CCT:** Coleção de Culturas Tropical
- CFU-GM:** unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos
- DMEM:** meio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- DNA:** ácido desoxiribonucléico
- DTNB:** ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro benzóico
- EDTA:** ácido etileno diamino tetracético
- EOMA:** hemangioendotelioma murino
- EROs:** espécies reativas de oxigênio
- FDA:** Food and Drug Administration
- GSH:** glutationa reduzida
- GST:** glutationa S-transferase
- HBSS:** solução salina balanceada de Hank's sem Ca²⁺ e Mg²⁺
- HEPES:** 4-(2-hidroxi-1-piperazina) ácido etanosulfônico
- HTS:** High Throughput Screening (programa de triagem em larga escala)
- HUVEC:** linhagem de células endoteliais da veia umbilical humana
- IAPs:** proteínas intracelulares antiapoptóticas
- IC₅₀:** concentração inibitória responsável por 50% de inibição de crescimento celular
- IG₅₀:** 50% de inibição de crescimento
- IFN- γ :** interferon- γ
- IL:** interleucina
- i.p.:** intraperitoneal
- i.r.:** intrarrenal
- LAK:** células killer ativadas (lymphokine-activated killer cells)
- LMA:** leucemia mielocítica aguda
- LTC:** linfócito T citotóxico
- MMPs:** metaloproteases de matriz
- MRB:** modificador da resposta biológica

MTS: [Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)]

MTT: [Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]

NBT: Nitro blue tetrazolium

NEAA: solução de aminoácidos não essenciais

NK: natural killer

PARP: poli (ADP-ribose) polimerase

PBS: phosphate buffer solution (Tampão Fosfato Salina)

PES: etosulfato de fenazina

pNA: *p*-nitroanilida

pNPP: *p*-nitrofenilfosfato

RENCA: carcinoma renal murino

rhIL: recombinant human interleukin (interleucina recombinante humana)

rmIL: recombinant murine interleukin (interleucina recombinante murina)

RNA: ácido ribonucléico

RPMI-1640: meio de cultura desenvolvido por Moore *et al.* (1969) no Roswell Park Memorial Institute

s.c.: subcutânea

SDS: sodium dodecyl sulphate (dodecil sulfato de sódio)

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

Solução TBE 1X: 89 mmol L⁻¹ Tris, 2 mmol L⁻¹ EDTA, 89 mmol L⁻¹ Ácido Bórico, pH 8,0

Solução TE: 10 mmol L⁻¹ Tris, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0

Solução TTE: 10 mmol L⁻¹ Tris, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0, 10% de Triton X-100

TCA: trichloro acetic acid (ácido tricloro acético)

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

TE: tumor de Ehrlich

TNFR1: receptor do fator de necrose tumoral 1

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein nick-end labeling

VN: vermelho neutro - (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)

YAC-1: linfoma originário de A/Sn induzido pelo vírus Moloney

3LL: carcinoma pulmonar de Lewis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Razões R2/R4 obtidas na avaliação do potencial de membrana em células RENCA tratadas com diferentes concentrações de violaceína por diferentes períodos de tempo.....	91
Tabela 2 - Dados de porcentagem de células RENCA apresentando atividade de caspase-3 após tratamento com violaceína.....	94
Tabela 3 - Análise das metástases de animais inoculados i.r. com RENCA após tratamento i.p. com 5,0 mg kg ⁻¹ de P-MAPA ou solução veículo após nefrectomia.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da violaceína.....	3
Figura 2 - Estrutura molecular do P-MAPA.....	6
Figura 3 - Esquema de tratamento do experimento 1. Células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas i.r. em camundongos BALB/c machos (dia 0). O tratamento dos animais (i.p.) iniciou 24 h após a nefrectomia (dia 11) e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.....	42
Figura 4 - Esquema de tratamento do experimento 2. Células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL em HBSS estéril) foram injetadas s.c. (dia -10) nos animais dos grupos IV-VI e i.p. (dia 0) nos grupos I-III. O tratamento de todos os grupos iniciou no 3º dia e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os animais dos grupos I-III receberam o tratamento pela via i.p. enquanto os dos grupos IV-VI receberam pela via s.c. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.....	44
Figura 5 - Esquema de tratamento do experimento 4. As células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas i.p. nos animais, correspondendo ao dia 0 do experimento. O tratamento de todos os grupos iniciou no dia 1 e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os grupos portadores de RENCA receberam P-MAPA, veículo ou rmlL-12 pela via i.p. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.....	49
Figura 6 - Esquema de tratamento do experimento com o carcinoma pulmonar de Lewis (3LL). As células 3LL (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas s.c. nos animais, correspondendo ao dia 0 do experimento. O tratamento de todos os grupos iniciou no dia 1 e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os grupos portadores do 3LL receberam P-MAPA, veículo ou rmlL-12 pela via s.c. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.....	51
Figura 7 - Citotoxicidade da violaceína em células TE (3×10^5 células mL ⁻¹) após 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de determinação do conteúdo protéico, teste de redução do MTT e pelo ensaio de determinação da atividade fosfatásica. Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata.....	73
Figura 8 - Efeito da violaceína sobre a viabilidade das células TE (300.000 células mL ⁻¹) determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos independentes realizados em triplicata.....	74
Figura 9 - Variação nos níveis de GSH total de células TE (3×10^5 células mL ⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína durante 72 horas. *p<0,01 em relação ao controle. **p<0,01 em relação ao controle e aos tratamentos com 2,0 e 5,0 μ mol L ⁻¹ (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata.....	75
Figura 10 - Células do tumor de Ehrlich submetidas à reação de Feulgen: (A) Células do tumor de Ehrlich controle (aumento de 30X), (B) Células do tumor de Ehrlich tratadas com 5 μ mol L ⁻¹ de violaceína por 72 h (aumento de 30X), (C) e (D) (aumento de 50X).....	78

- Figura 11** - Valores de porcentagem de fragmentação de DNA obtidos pelo método da difenilamina para células TE (3×10^5 células mL⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína por 72 h. *p<0,05 em relação ao controle. **p<0,05 em relação ao controle e aos tratamentos com 2,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em duplicata..... 80
- Figura 12** - Alterações na atividade de caspase-2 e caspase-9 após 72 horas de incubação de células TE (3×10^5 células mL⁻¹) com diferentes concentrações de violaceína. *p<0,05 em relação ao controle. **p<0,05 em relação ao controle e à concentração 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata..... 81
- Figura 13** - Sobrevida de animais inoculados com TAE e tratados com diferentes concentrações de violaceína. Camundongos BALB/c foram inoculados i.p. com 6×10^6 células TE no dia 0 e após 24 h, tratados com doses diárias i.p. de violaceína (0,2 mL) por 12 dias consecutivos. Os animais do grupo controle foram tratados apenas com 0,2 mL de veículo (PBS contendo 10% de Tween 80). As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($p < 0,05$ e $n = 10$ / grupo)..... 84
- Figura 14** - Efeito da violaceína sobre a viabilidade de células RENCA (50.000 células mL⁻¹) após 24, 48 e 72 h de incubação. A viabilidade das células foi determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 86
- Figura 15** - (A) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA (50.000 células mL⁻¹) após 24, 48 ou 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. (B) Recuperação de células RENCA (50.000 células mL⁻¹) após tratamento com violaceína por 24 h. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 87
- Figura 16** - (A) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA (50.000 células mL⁻¹) pré-tratadas com 5 e 15 mmol L⁻¹ de glutathiona reduzida (GSH) por 2 h. Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com diferentes concentrações de violaceína por mais 72 h. (B) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA após 72 h de tratamento na presença de 5 e 15 mmol L⁻¹ de glutathiona reduzida (GSH). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 89
- Figura 17** - Sobrevida de animais inoculados com RENCA e tratados com diferentes concentrações de violaceína. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após a nefrectomia (dia 11) foram tratados com doses diárias de violaceína (0,1 - 16 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 μg de IL-12 recombinante murina (rmIL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($n = 10$ / grupo)..... 95
- Figura 18** - Sobrevida de animais inoculados com RENCA i.p. ou s.c. e tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA i.p. ou s.c.. Camundongos BALB/c foram inoculados s.c com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia -10 e no dia 3 foram tratados com doses s.c. de P-MAPA, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais inoculados i.p. receberam 1×10^5 células

RENCA em 0,1 mL no dia 0 e no dia 3 iniciou-se o tratamento com doses diárias i.p. de P-MAPA em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento diário com IL-12, 0,1 µg / animal em 0,2 mL. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos (n = 13 / grupo)..... 98

Figura 19 - Atividade de células NK do baço de camundongos portadores de RENCA s.c. (Gráfico A) ou i.p. (Gráfico B) tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA, pela via s.c. ou i.p. respectivamente, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais inoculados i.p. receberam 1 x 10⁵ células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e no dia 3 iniciou-se o tratamento com doses diárias i.p. de P-MAPA em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. No 20^o dia após a inoculação tumoral, os baços de 3 animais por grupo foram coletados em "pool" para obtenção das células efectoras. O ensaio foi realizado em triplicata para cada razão célula efectora:célula alvo. Os resultados representam as médias ± DP das triplicatas. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto que os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, 0,1 µg / animal em 0,2 mL..... 100

Figura 20 - Sobrevida de animais inoculados com RENCA após tratamento com diferentes doses de P-MAPA. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1 x 10⁵ células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após nefrectomia (dia 11) foram tratados com diferentes doses de P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (mIL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos (p = 0,0025, n = 15 / grupo)..... 102

Figura 21 - Níveis de citocinas séricas em camundongos BALB/c inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com 5,0 mg kg⁻¹ de MAPA. Os camundongos foram inoculados i.r. com 1 x 10⁵ células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após nefrectomia (dia 11) foram tratados com diferentes doses de P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (mIL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. Os animais (n = 3 / grupo) foram sangrados no 1^o e 8^o dias e as amostras analisadas como "pool"..... 105

Figura 22 - Sobrevida de animais inoculados com células RENCA e tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1 x 10⁵ células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após (dia 1) foram tratados com P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam diariamente 0,2 mL de veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, 0,1 µg / animal em 0,2 mL. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos (n = 10 / grupo)..... 107

- Figura 23** - Citotoxicidade da violaceína em células 3LL (25.000 ou 50.000 células mL⁻¹) após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína (0,1 - 9,0 µmol L⁻¹). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média ± SD de um experimento realizado em quadruplicata para cada densidade celular..... 108
- Figura 24** - Sobrevida de animais inoculados com células de 3LL e tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 1 x 10⁵ de células de 3LL em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após (dia 1) foram tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam diariamente 0,2 mL de veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, 0,1 µg / animal em 0,2 mL. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos (p=0,005, n = 10 / grupo)..... 110
- Figura 25** - Citotoxicidade da violaceína em células EOMA (25.000 células mL⁻¹) após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média ± DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 111
- Figura 26** - Citotoxicidade da violaceína em células HUVEC (3.000 células mL⁻¹) após 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média ± DP de dois experimentos realizados em quadruplicata..... 112
- Figura 27** - Efeito da violaceína sobre a viabilidade das células HL60 (300.000 células mL⁻¹) determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média ± SD de três experimentos independentes realizados em triplicata..... 113
- Figura 28** - Citogramas obtidos após 12 horas de tratamento de células HL60 com violaceína e marcação com Anexina V / Iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo. Células HL60 controle (a) e tratadas com violaceína nas concentrações de 0,5 µmol L⁻¹ (b), 1,0 µmol L⁻¹ (c), e 1,5 µmol L⁻¹ (d)..... 115
- Figura 29** - Fragmentação de DNA induzida pela violaceína em células HL60. Células HL60 (300.000 células mL⁻¹) foram incubadas com violaceína 1,0 µmol L⁻¹ por 12 horas. M1: Marcador de peso molecular (1 kb). C: Células não tratadas - controle negativo. V: Células tratadas com violaceína 1,0 µmol L⁻¹. Q: Células tratadas com quercetina 120 mmol L⁻¹ - controle positivo. M2: Marcador de peso molecular (100 pb)..... 118
- Figura 30** - Porcentagens de fragmentação de DNA obtidas pelo método da difenilamina em células HL60 (300.000 células mL⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína. *p<0,01 em relação ao controle. **p<0,01 em relação ao controle e ao tratamento com 0,5 µmol L⁻¹ (ANOVA, teste de Tukey)..... 119
- Figura 31** - Influência da violaceína na expressão de Bcl-2 em células HL60 (300.000 células mL⁻¹). Células controle (A) e células tratadas 12 h com violaceína 0,5 µmol L⁻¹ (B) (1000X de aumento)..... 121
- Figura 32** - (A) Citotoxicidade da violaceína (0,2 - 5,0 µmol L⁻¹) em células HL60 (300.000 células mL⁻¹) pré-tratadas com 5 µmol L⁻¹ de glutathiona reduzida (GSH) por 2 h. Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com diferentes concentrações de violaceína por mais 72 h. (B) Citotoxicidade da violaceína em células HL60 (300.000 células mL⁻¹) após 72 h de tratamento na presença de 5 µmol L⁻¹ de GSH. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de

redução do MTT e os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata..... 123

Figura 33 - Variação nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) de células HL60 (300.000 células mL⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína durante (A) 48 horas e (B) 72 horas. Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,01 em relação ao controle e entre os tratamentos com violaceína (ANOVA, teste de Tukey)..... 125

1. INTRODUÇÃO

1.1. A PESQUISA DA VIOLACEÍNA E DO P-MAPA

1.1.1. Violaceína e suas atividades biológicas

A violaceína (Figura 1) é o principal pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*. A primeira descrição documentada sobre a bactéria e seu pigmento foi feita pelo italiano Curzio Bergonzini em 1881, porém a fórmula química assim como a estrutura exata da violaceína só foram determinadas em 1958-1960 (Ballantine *et al.*, 1960). A violaceína é um derivado indólico caracterizado como 3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.

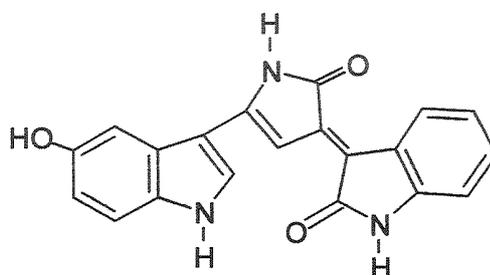


Figura 1: Estrutura molecular da violaceína.

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Rhizobiaceae e à ordem Eubacteriales, é anaeróbia facultativa em forma de bastonetes (Sneath, 1974). Trata-se de uma bactéria saprófita amplamente distribuída, podendo ser encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais onde constitui um componente minoritário da microbiota total. É considerada não patogênica para os homens, embora possa atuar às vezes como um patógeno oportunista de extrema virulência para animais e humanos (Ballows, 1992; Kumar *et al.*, 1999).

No Brasil, a *Chromobacterium violaceum* só foi isolada em 1976 quando uma amostra de água do Rio Negro foi analisada, revelando grandes quantidades da bactéria (Caldas *et al.*, 1978). A propriedade fotobiológica da violaceína foi proposta por Caldas quando estudos sobre a natureza da coloração do Rio Negro (AM - Brasil) foram realizados (Caldas, 1977; Caldas *et al.*, 1978). Em seguida, o

potencial fototerapêutico da violaceína foi avaliado aprofundadamente (Durán e Faljoni-Alario, 1980; Campos *et al.*, 1982; Durán *et al.*, 1983; Durán e Menck, 2001).

A partir do estabelecimento da cepa CCT 3496 da *Chromobacterium violaceum*, a produção, extração e purificação do pigmento foram otimizadas e estudos de sua biossíntese, bem como reações de biotransformação foram realizadas (Durán e Haun, 1997; Rettori e Durán, 1998; Bromberg, 2000; Bromberg e Durán, 2001).

Diversos trabalhos atribuíram à violaceína diferentes atividades biológicas tais como bactericida (Lichstein e Van de Sand, 1945; Durán *et al.*, 1983), tripanossomicida (Riveros *et al.*, 1988; Durán *et al.*, 1989; Durán e Haun, 1991; Durán *et al.*, 1994), antiviral (May *et al.*, 1991; Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003), antioxidante (Rettori *et al.*, 1998), antimicobacteriana (De Souza *et al.*, 1999), antiulcerogênica (Durán *et al.*, 2003), antileishmania (Leon *et al.*, 2001) e antitumoral (Durán *et al.*, 1996_{ab}; Melo *et al.*, 2001_a; Melo *et al.*, 2003; Saraiva *et al.*, 2004).

Em ensaios de determinação de citotoxicidade para diferentes marcadores celulares (multi-endpoint) utilizando fibroblastos V79 de pulmão de hamster chinês, a violaceína demonstrou um potencial citotóxico com valores de IC₅₀ (concentração inibitória responsável por 50% de inibição do crescimento celular) de 5-12 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A investigação da capacidade da violaceína de induzir apoptose em cultura de células V79 foi demonstrada pelo método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescein nick-end labeling) e pela reação de Feulgen acoplada à análise por imagem (Haun *et al.*, 1992; Melo *et al.*, 2000, 2003). Esses resultados encorajaram o estudo do uso potencial da violaceína na terapia do câncer.

Inicialmente, a atividade antitumoral da violaceína foi testada *in vitro* pelo National Cancer Institute - Developmental Therapeutics Program (EUA) em 53 linhagens de células tumorais diferentes. Valores significativos de IG₅₀ (50% de inibição de crescimento celular) foram obtidos ($3,17 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ - $1,99 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (Durán *et al.*, 1996_{ab}; Melo *et al.*, 2001_a; Durán e Menck, 2001).

A eficácia da violaceína também foi avaliada na linhagem de células de leucemia mielocítica humana (HL60). Pelo ensaio de redução do MTT (sal de tetrazólio) obteve-se um valor de IC_{50} inferior a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a violaceína, enquanto a indução de processo apoptótico foi verificada por alterações morfológicas observadas pela reação de Feulgen e pelo aumento na atividade de caspase-2 e caspase-9 de 3 e 4 vezes respectivamente (Melo *et al.*, 2001_a; Melo *et al.*, 2003). O tratamento de células HL60 com uma variedade de compostos pode ser acompanhada por modificações na expressão de antígenos de superfície e na aquisição de inúmeras funções como a geração de ânions superóxido e a adesão aos frascos de cultura, indicativas de processo de diferenciação celular em neutrófilos e monócitos. O ensaio de redução do NBT (nitro blue tetrazolium) funciona como um marcador da diferenciação celular das células HL60, que após tratamento com violaceína apresentaram 30% de indução de diferenciação não-específica (Melo *et al.*, 2003). Recentemente demonstrou-se que o composto é capaz de mediar a apoptose via ativação específica do receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e que sua citotoxicidade é precedida pela ativação da caspase-8, do fator de transcrição $\text{NF}\kappa\text{B}$ e da ativação da p38MAP quinase (Ferreira *et al.*, 2004).

Uma vez que a violaceína é pouco solúvel em água, algumas de suas atividades biológicas foram avaliadas utilizando-se complexos de inclusão com β -cyclodextrina (β -CD), na tentativa de alterar algumas propriedades físico-químicas da substância (De Azevedo *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003).

1.1.2. P-MAPA, o agregado protéico fúngico

O composto polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA, Figura 2) é um agregado protéico (PM=316 KDa) isolado de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae*. Trata-se de um sólido branco obtido na forma de finos microcristais após purificação, conforme descrito anteriormente (Durán e Nunes, 1990; Durán *et al.*, 1997).

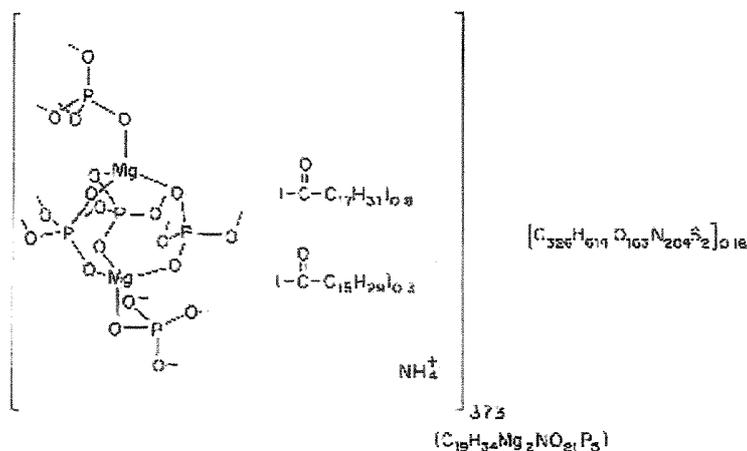


Figura 2: Estrutura molecular do P-MAPA.

Este composto não demonstrou citotoxicidade ou genotoxicidade em culturas de células V79 e linfócitos humanos, e também mostrou-se atóxico em camundongos, cachorros e macacos (Durán *et al.*, 1990, 1993). Estudos preliminares com o produto indicaram atividade antitumoral e antiviral *in vivo* (Durán e Nunes, 1990; Durán *et al.*, 1990, 1993, 1997). O tratamento com o P-MAPA de animais portadores de tumores transplantáveis como o linfossarcoma-180, tumor de Ehrlich, plasmacitoma (SP-2/0/Ag14), tumor de Walker 256 e o carcinoma mamário espontâneo (SP-1), apresentou uma acentuada inibição do crescimento tumoral acompanhada de aumento na expectativa de vida desses animais (Durán *et al.*, 1993, 1997, 1999; Justo *et al.*, 1999, 2000).

Estudos de citotoxicidade *in vitro* utilizando 53 linhagens celulares tumorais diferentes mostraram que o tratamento com P-MAPA não foi capaz de alterar as taxas de crescimento celular (Durán *et al.*, 1993). A partir daí surgiu a hipótese de que fatores adicionais, particularmente de âmbito imunológico, estivessem envolvidos.

O crescimento progressivo de tumores é regularmente acompanhado de mudanças na constituição celular do sistema imune. A depleção de progenitores hematopoéticos ou a inibição da hematopoese em sistemas tumorais humano e animal, pode representar um efeito agudo de crescimento rápido de tumores. Uma

vez que a resposta de células da medula óssea a fatores de crescimento hematopoéticos é parte integrante da resposta imune, a investigação dos efeitos do P-MAPA no crescimento e diferenciação de unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) de camundongos saudáveis e portadores do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) foi avaliada (Justo *et al.*, 2000). Para animais controles portadores do tumor foi observada mielossupressão com aumento do número de CFU-GM no baço. A administração subcutânea (s.c.) de P-MAPA nesses animais durante 7 dias levou à estimulação da mielopoese de maneira dose-dependente. A administração da dose ótima biologicamente ativa de P-MAPA (5,0 mg kg⁻¹), antes ou depois da inoculação do tumor, aumentou o número de CFU-GM na medula óssea sem, no entanto, aumentar o número total de células ou a composição de suas subpopulações. De maneira similar, essa mesma dose também estimulou a mielopoese na medula óssea de animais normais. Além disso, o composto não afetou o número de CFU-GM no baço dos animais normais, embora tenha reduzido a formação de colônias no baço dos animais portadores do tumor. A administração da dose de 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA após a inoculação do tumor, dobrou a sobrevivência dos animais portadores do TAE e reduziu em cerca de 50% o número de células tumorais na cavidade peritoneal. Esses resultados sugeriram que o efeito modulador do P-MAPA na resposta mielopoética estivesse relacionado a sua atividade antitumoral como um possível mecanismo de regulação da produção de granulócitos / macrófagos e expressão de suas atividades funcionais (Justo *et al.*, 2000). Resultados do efeito do P-MAPA no número de CFU-GM na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* reforçaram a hipótese inicialmente estabelecida (Melo *et al.*, 2001_b). Esses achados indicam que o P-MAPA potencializa os mecanismos imunológicos reguladores das células precursoras da medula óssea, os quais estão envolvidos no controle das alterações provocadas pelo tumor no sistema hemolinfopoético do hospedeiro, sendo encorajadores ao se considerar possíveis abordagens terapêuticas mais eficientes em combinação com quimioterápicos, para proteger o hospedeiro da hematotoxicidade e suplementar a eficiência tumoricida (Justo *et al.*, 2000).

Os efeitos do P-MAPA também foram estudados na proliferação de células do baço induzida por concanavalina A, na produção de citocinas e na atividade de células “natural killer” (NK) de camundongos portadores do TAE (Justo *et al.*, 2003). A atividade total de células NK e a proliferação de células do baço diminuem a níveis subnormais em camundongos portadores do TAE, conforme já descrito na literatura (Parhar e Lala, 1985, 1988). Além do aumento do baço e do número de células totais no órgão, ocorre também um incremento nos níveis de IL-10 paralelo a uma diminuição nos níveis de IL-2 e manutenção dos níveis de IL-4 e interferon- γ (IFN- γ) (Parhar e Lala, 1988; Subiza *et al.*, 1989; Viñuela *et al.*, 1991; Ruiz de Morales *et al.*, 1999; Segura *et al.*, 2000; Justo *et al.*, 2003). O tratamento dos camundongos com P-MAPA ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$) durante 7 dias promoveu, em adição à redução do crescimento tumoral, a proliferação das células do baço, a produção de IL-2 e a atividade de células NK. Além disso, o tratamento com P-MAPA aumentou os níveis de IFN- γ , reduziu a produção de IL-10 em relação aos animais não tratados e proporcionou a diminuição em 35% da esplenomegalia que foi acompanhada de um restabelecimento do número normal de células nucleadas neste órgão (Justo *et al.*, 2003). Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados são de particular importância, pois, apontam para uma capacidade restauradora da imunocompetência celular, proporcionada por um efeito modulador direto ou indireto do P-MAPA.

1.2. A EVOLUÇÃO NATURAL: PRODUTOS NATURAIS

Há centenas de anos a medicina e os produtos naturais estiveram intimamente ligados pelo uso de medicamentos tradicionais e venenos naturais. Os primeiros registros, escritos em cuneiforme sob placas de argila, eram da Mesopotâmia e datavam cerca de 2600 AC. Dentre as substâncias listadas encontravam-se óleos de espécies de *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e *Papaver somniferum* (papoula), todos eles ainda utilizados hoje para tratamento de indisposições como tosses e

resfriados e doenças como infecções parasitárias e inflamações. Os estudos clínicos, farmacológicos e químicos desses medicamentos tradicionais, os quais derivaram predominantemente de plantas, foram a base dos medicamentos mais atuais como a aspirina e morfina (Anexo 1) (Newman *et al.*, 2000; Butler, 2004).

Os produtos naturais possuem um histórico de grande sucesso como principais ativos biológicos para agentes terapêuticos, sendo ainda considerados inestimáveis ferramentas para decifrar lógicas de biossínteses e como plataformas para desenvolver drogas de primeira linha contra doenças infecciosas (bacteriana e fúngica), câncer e para uso em imunomodulação (Clardy e Walsh, 2004; Ganesan, 2004). Eles podem ser divididos em diversas classes estruturais: terpenos, peptídeos, poliquetídeos e alcalóides, dentre outros. As pequenas moléculas mais clássicas existentes na natureza são metabólitos secundários - produtos de vias condicionais que são ativadas em contextos ou situações particulares. Isso inclui metabólitos produzidos por microrganismos durante seus diferentes períodos de desenvolvimento, insuficiência de nutrientes e sinalização (Clardy e Walsh, 2004).

A Natureza abriga uma encantadora e fascinante biodiversidade de vida microbiana, vegetal e animal e, dentro desta perspectiva, esperar-se-ia que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada fauna e flora. No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada nesta área e assim todos os extratos de amostras de plantas, organismos marinhos e microrganismos entre outros que por ventura pudessem ser estudados, permanecerão aqui como mistérios perdidos ou então patenteados como novas descobertas em países mais desenvolvidos.

Dentre as drogas derivadas de plantas e aprovadas para uso pela Food and Drug Administration (FDA) (vinblastina, vincristina, etoposídeo - Anexo 1), o composto mais visado foi o paclitaxel (Anexo 1), triterpeno polihidroxilado extraído da casca de *Taxus brevifolia* - árvore conhecida como teixo do Pacífico, e isolada pela primeira vez em 1971. Na década de 90, devido a sua eficácia, o paclitaxel foi desenvolvido e comercializado pela companhia americana Bristol-Meyer Squibb sob o nome de Taxol®. Usado com sucesso em diferentes tipos de tumores

sólidos (ovário, mama e pulmão), foi o primeiro medicamento no mercado capaz de impedir a despolimerização da tubulina (Wani *et al.*, 1971; Mann, 2002; De Souza, 2004). Uma vez que dependia do extrativismo, o suprimento natural do paclitaxel tornou-se um problema, pois para obter 1 kg do composto eram necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da árvore, sendo preciso abater cerca de 3.000 árvores cuja espécie demora de 100 a 200 anos para atingir a maturidade, além de encontrar-se em extinção. Essa quantidade do composto poderia ser utilizada no tratamento de apenas 500 pacientes durante o período de um ano. Considerando o número de pessoas portadoras da doença e o número muito reduzido de pessoas que seriam beneficiadas, encontrou-se a solução para o problema nas folhas da árvore *Taxus baccata*, da qual se pode extrair a molécula 10-desacetilbaccatina-III que apresenta o esqueleto básico e as funcionalidades do paclitaxel. Por via de uma semisíntese e em poucas etapas, o paclitaxel, que possui 11 centros assimétricos, foi obtido. Uma vantagem deste método para a obtenção do paclitaxel é que não foi necessário abater as árvores, sendo uma fonte renovável (Kingston, 2000; Mann, 2002). As reservas vegetais nativas, apesar de serem a única opção para certas drogas como o taxol®, não são inesgotáveis e o extrativismo puro e simples tem consequências nefastas no que diz respeito à conservação das espécies de interesse.

Depois do sucesso terapêutico e econômico do taxol® para a empresa produtora, inúmeros análogos foram sintetizados em laboratório por diferentes grupos de pesquisa, com o objetivo de se identificar os grupos farmacofóricos (responsáveis pela atividade biológica), estabelecendo, assim, a relação estrutura-atividade na tentativa de se obter fármacos mais potentes (Kingston, 2000). A partir deste momento, grandes mudanças ocorreram nos meios pelos quais as companhias farmacêuticas conduzem a pesquisa de novos fármacos, desde a identificação de novos alvos moleculares exploráveis, estabelecimento de programas de triagem de produtos naturais em larga escala (HTS: High Throughput Screening), avanços no projeto racional de drogas, até sínteses e química combinatória (Yunes *et al.*, 2001; Mann, 2002; Rothenberg *et al.*, 2003; Butler, 2004; Ganesan, 2004; Westwell e Stevens, 2004).

Não foram somente as plantas que serviram de fontes para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer. Os microrganismos, que sempre foram a principal fonte de agentes antibacterianos, também proporcionaram algumas drogas-chaves para a quimioterapia do câncer. Alguns exemplos notáveis são as bleomicinas (Blenoxana), dactinomicina, plicamicina, mitomicina C e as antraciclínicas daunorrubicina e doxorubicina (adriamicina) (Anexo 2). No entanto, o melhor exemplo dessa nova classe de drogas antitumorais obtidas de microrganismos é a das epotilonas (Anexo 2), cujo isolamento foi obtido a partir da bactéria *Sorangium cellulosum*. Elas possuem o modo de ação similar ao do Taxol® - estabilização dos microtúbulos durante o processo de divisão celular - mas oferecem vantagens no que diz respeito à solubilidade em água e à disponibilidade pelo emprego da tecnologia de fermentação (Colwell, 2002; Mann, 2002; Clardy e Walsh, 2004).

A medicina moderna também tem encontrado no oceano uma vasta fonte de compostos com importante potencial terapêutico. Alguns exemplos de produtos naturais marinhos são: briostatina, discodermolida, eleuterobina, sarcodictina e laulimalida (Anexo 3), que também apresentam potente atividade antitumoral e mecanismo de ação similar ao do paclitaxel, sendo compostos promissores na luta contra o câncer. A briostatina inclusive vem sendo avaliada em testes clínicos em fase I e II contra melanoma, leucemias, linfomas, e câncer de mama, próstata, pulmão, rim, cérvix, ovário, esôfago e estômago. Como quase todos os produtos de origem natural marinha, enormes dificuldades estão associadas com a coleta do material, geralmente de ambientes hostis, e com as baixas concentrações presentes nos organismos (Colwell, 2002; Mann, 2002; De Souza, 2004; Ganesan, 2004).

Diversos produtos naturais mostraram atividade proveitosa como inibidores da angiogênese. A fumagilina (Anexo 3), obtida a partir do fungo *Aspergillus fumigatus* é provavelmente a mais bem estudada. Sua atividade inibitória foi demonstrada, mas a toxicidade associada a excluiu da avaliação clínica. Entretanto, sua atividade proporcionou a base para a preparação de uma série de

análogos (Liekens *et al.*, 2001; Keyhani *et al.*, 2001; Mann, 2002; Kerbel e Kamen, 2004).

As drogas derivadas de produtos naturais estão bem representadas dentre as 35 drogas de ponta mais vendidas em todo o mundo nos anos de 2000, 2001 e 2002. A porcentagem de drogas derivadas de produtos naturais no ano de 2000 foi de 40% e permaneceu aproximadamente constante nos anos de 2001 e 2002 com 24 e 26% respectivamente (Nielsen, 2002; Rothenberg *et al.*, 2003; Butler, 2004).

A descoberta de novas drogas é uma complexa busca interdisciplinar de química, farmacologia e ciências clínicas que vem beneficiando a humanidade imensamente no decorrer dos últimos 100 anos. Embora tenha havido uma desaceleração por parte das indústrias farmacêuticas na pesquisa de produtos naturais nos últimos anos (2001-2003), os avanços obtidos na biologia molecular e nas novas tecnologias de química combinatória e programas de triagem em larga escala, devem proporcionar a identificação de novos agentes ativos que por sua vez poderão ainda servir como moldes para a construção de novos compostos com atividades biológicas melhoradas. É evidente que ainda existe um potencial imenso para a identificação de uma diversidade química terapeuticamente relevante na natureza, particularmente dos muitos microrganismos que ainda não foram cultivados. Isto aumenta a responsabilidade dos químicos acadêmicos que trabalham com produtos naturais em testar sistematicamente seus extratos e compostos purificados na busca de atividade biológica (Mann, 2002; Newman *et al.*, 2003; Butler, 2004; Clardy e Walsh, 2004; Ganesan, 2004).

1.3. CÂNCER

O câncer foi uma das doenças mais terríveis no século XX e sua contínua disseminação reflete-se no aumento da incidência da doença no século XXI. O câncer já é a principal causa de morte no mundo e mais de 6 milhões de mortes são registradas para 10 milhões de novos casos de câncer que ocorrem anualmente (Sinha e El-Bayoumy, 2004; Balachandran e Govindarajan, 2005).

No Brasil, é a segunda causa de mortes por doença e as estimativas para o ano de 2005 apontam a ocorrência de 467.440 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo de útero para o sexo feminino, acompanhando a mesma magnitude observada no mundo (Estimativa - 2005, INCA, 2004).

Muitos tipos de câncer variam acima de uma ordem de magnitude em incidência entre populações diferentes, e todo tipo é raro em alguma parte do mundo. Algumas evidências indicam que mais de 80% dos tipos de câncer em humanos são potencialmente preveníveis uma vez que os fatores que determinam suas incidências são em grande parte exógenos (Peto, 2001; Sinha e El-Bayoumy, 2004). Esses fatores etiológicos exógenos incluem fatores de dieta, fumo, radiação, exposição ocupacional e ambiental a produtos químicos ocupacionais e ambientais, fatores sócio-econômicos, parasitas específicos, bactérias, vírus e hormônios exógenos em mulheres. Além disso, fatores endógenos como hereditariedade, fatores imunológicos e hormonais e interações gene / meio ambiente são críticos para determinar a susceptibilidade individual. Em algumas formas raras de câncer os fatores hereditários exercem papel decisivo, entretanto, os fatores exógenos são claramente mais responsivos às intervenções direcionadas à prevenção primária do câncer (Reddy *et al.*, 2003; Sinha e El-Bayoumy, 2004; De Almeida *et al.*, 2005).

Os avanços nos estudos da base molecular do câncer carregam consigo a promessa de terapias mais refinadas e efetivas para a doença. Assumindo a múltipla etiologia do câncer e a progressão tumoral desorientada combinadas com alterações genéticas e epigenéticas que dão origem à disparidade dessa doença, a cura do câncer deve ser tão diversa como a das doenças por si. Desta maneira, a comunidade científica envolvida em pesquisa do câncer estabeleceu como fato esta ser uma doença múltipla para a qual não há uma cura única (Hanahan e Weinberg, 2000; Evan e Vousden, 2001; Kasibhatla e Tseng, 2003).

O sucesso da cirurgia e radioterapia, duas das terapias mais utilizadas e bem sucedidas no tratamento do câncer, só é contemplado se a doença for diagnosticada em estágio precoce e localizado (Gibbs, 2000; Green, 2004).

A quimioterapia surgiu na década de 40 a partir de estudos toxicológicos com a mostarda nitrogenada e foi introduzida na clínica há mais de 50 anos. Em certos neoplasmas - como algumas leucemias agudas na infância, subgrupos da doença de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin - a quimioterapia é frequentemente reparadora e a promessa de uma maior sobrevida torna a terapia recomendável mesmo considerando seus efeitos adversos e custos financeiros altos (Johnstone *et al.*, 2002; Green, 2004; Lee e Macgregor, 2004). Além disso, a quimioterapia adjuvante para câncer de mama, colo e pulmão pode aumentar a sobrevida proporcionada pelo processo cirúrgico. Mesmo em pacientes com tumores sólidos avançados ou recidivas pós-cirúrgicas, a quimioterapia oferece uma melhoria na sobrevida em termos de qualidade e longevidade. Às vezes, entretanto, o índice terapêutico para determinados pacientes pode ser baixo, com respostas parciais, curtas e imprevisíveis. Estas circunstâncias apontam algumas das limitações da quimioterapia citotóxica tradicional (Johnstone *et al.*, 2002; Green, 2004; De Almeida *et al.*, 2005).

A quimioterapia agressiva tem sido a base para a terapia do câncer e uma pesquisa extensiva está voltada para o desenvolvimento de agentes anti-neoplásicos mais específicos, menos tóxicos e em terapias baseadas em mecanismos que envolvam vias moleculares críticas dos tumores (Green, 2004; Papageorgiou *et al.*, 2005). Infelizmente, muitos dos compostos quimioterápicos utilizados possuem eficácia limitada devido a problemas de acesso ao tumor e de penetração além de um grau moderado de seletividade às células tumorais, provocando danos graves a tecidos saudáveis. Entretanto, a atividade desses compostos é principalmente restringida pelo fato dos tumores desenvolverem resistência a drogas. As células tumorais são alvos que sofrem alterações rapidamente devido à instabilidade genética, heterogeneidade e alta taxa de mutações, levando à seleção e multiplicação exacerbada da população de células tumorais droga-resistente.

Como todo sistema biológico, os tumores utilizam-se de inúmeros mecanismos oportunistas para garantir sua sobrevivência e desenvolvimento. O poder e influência desses processos tornam a imunoterapia um verdadeiro desafio para a terapia do câncer. O sucesso desta terapia depende de uma ótima ativação imune tumor-específica e deve envolver ambos os ramos do sistema imunológico, o humoral (mediado por anticorpos) e o celular. Desta maneira, do ponto de vista imunológico, a célula tumoral é vista como alvo potencial de anticorpos, células NK, células killer ativadas (lymphokine-activated killer cells - LAK) e linfócitos T citotóxicos (LTCs) (Fishman e Seigne, 2002; Mesa e Fernández, 2004; Zbar, 2004). Algumas investigações pré-clínicas e clínicas estão sendo realizadas na tentativa de desenvolver tratamentos baseados em vacinação com células tumorais inativadas, antígenos tumorais ou epitopos, células dendríticas ativadas como também o uso terapêutico de anticorpos monoclonais e certas citocinas (Mihich e Ehrke, 2000; Yannelli e Wroblewski, 2004).

Recentemente, uma ênfase maior vem sendo dada por pesquisadores com relação à medicina complementar e alternativa para a prevenção do câncer. O uso de agentes quimioprotetores como antioxidantes potentes encontrados em frutas, vegetais, extratos de plantas e ervas (Reddy *et al.*, 2003; Papageorgiou *et al.*, 2005), compostos de selênio (Sinha e El-Bayoumy, 2004), uso de terapias microbianas (Samuilov, 2003) e até mesmo o emprego da ciência Ayurveda, medicina indiana tradicional de fármacos obtidos de plantas (Balachandran e Govindarajan, 2005).

As limitações da quimioterapia tradicional para o tratamento da doença avançada aliadas à demonstração inequívoca do potencial da imunoterapia para induzir remissão completa, motivam a busca de compostos alternativos com propriedades diferenciadas. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao câncer faculta a possibilidade de terapias empregando-se estratégias adjuvantes, capazes de modular a resposta imune contra o tumor. De fato, a imunoterapia com modificadores da resposta biológica (MRB) tem se mostrado promissora, porém, fatores éticos associados às restrições para a aplicação de terapias baseadas na transferência de células, têm

contribuído para que compostos de origem sintética ou natural sejam considerados de importância estratégica na pesquisa de novas substâncias seguras e eficazes, preferencialmente de baixo custo, para o uso isolado ou como adjuvantes no tratamento do câncer (McDermott e Akins, 2004; Shin *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2005).

A terapia antiangiogênica, que atua sobre as células endoteliais ativas, oferece uma alternativa com várias vantagens sobre a terapia dirigida às células tumorais (Liekens *et al.*, 2001; Kerbel e Kamen, 2004). A angiogênese, crescimento de novos capilares sanguíneos a partir de vasos já existentes, é um fenômeno crítico para o desenvolvimento, reprodução e reparo do organismo além de dominar várias condições patológicas. A hipótese de que o crescimento tumoral é angiogênese-dependente foi proposta em 1971 e comprovada subsequentemente por uma variedade de experimentos. Um tumor em crescimento necessita uma extensa rede de capilares para fornecer nutrientes e oxigênio. É por essa razão que existem inúmeras evidências de que as terapias antiangiogênicas possam induzir uma inatividade tumoral ou sua estabilização (Bertolini *et al.*, 2000; Liekens *et al.*, 2001; Folkman, 2003; Kerbel e Kamen, 2004).

As análises de fontes de novos compostos aprovados por agências regulatórias como a americana FDA para tratamento de doenças humanas, indicaram que os produtos naturais possuem um papel altamente significativo na descoberta de fármacos e desenvolvimento de novos processos. Isso foi particularmente evidente em áreas de câncer e doenças infecciosas, onde mais de 60 e 75% desses medicamentos respectivamente, eram de origem natural (Newman *et al.*, 2003).

1.4. MODELOS TUMORAIS *IN VIVO* E *IN VITRO*

1.4.1. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) é originalmente um carcinoma mamário de origem espontânea em camundongos BALB/c, facilmente transplantável em

qualquer linhagem murina e que apresenta crescimento em 100% dos camundongos inoculados. A forma ascítica deste tumor desenvolve-se após inoculação intraperitoneal (i.p.) das células tumorais, enquanto que a forma sólida pode ser obtida por inoculação subcutânea (s.c.) ou intramuscular (i.m.). Quando injetadas intraperitonealmente, as células multiplicam-se rapidamente e matam o hospedeiro em um período de tempo mais curto quando comparado ao desenvolvimento do tumor intramuscular ou subcutâneo (Culo *et al.*, 1978; Subiza *et al.*, 1987).

Diversos trabalhos descritos na literatura demonstraram a atividade antitumoral de produtos naturais frente às células do tumor de Ehrlich (TE), como por exemplo, o 1-acetoxicavicol (ACA) (Moffatt *et al.*, 2002), curcumina (Pal *et al.*, 2001), P-MAPA (Justo *et al.*, 2000, 2003), outros extratos fúngicos (Kaneno *et al.*, 2004) e extratos de plantas (Kennedy *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000, 2004; Matsuzaki *et al.*, 2003; Sunila e Kuttan, 2004; Melo *et al.*, 2004). Os aspectos mais estudados nesses trabalhos abordam temas envolvendo o efeito dos compostos no sistema antioxidante celular e/ou do animal pela avaliação de parâmetros como variação nos níveis de glutathiona (GSH), atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase e outras enzimas relacionadas ao metabolismo de GSH tal como a glutathiona S-transferase (GST). A capacidade desses agentes antitumorais de induzir apoptose nas células tumorais também foi relatada discutindo inclusive o envolvimento de proteínas de choque térmico ("heat shock") e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Estrela *et al.*, 1992; Gabai *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2001; Pal *et al.*, 2001; Chattopadhyay *et al.*, 2002; Moffatt *et al.*, 2002). Outros trabalhos da literatura demonstraram que o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich altera os padrões de migração e ativação de células fagocíticas, secreção de citocinas e outros fatores humorais como prostaglandina E₂ e antígenos tumorais capazes de bloquear a resposta de anticorpos, e principalmente, comprometer a função de macrófagos, células T e células NK (Parhar e Lala, 1985, 1988; Subiza *et al.*, 1989; Viñuela *et al.*, 1991; Segura *et al.*, 1997; Ruiz de Morales *et al.*, 1999; Justo *et al.*, 2000, 2003;

Valadares *et al.*, 2003; Kaneno *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2004; Sunila e Kuttan, 2004).

1.4.2. Carcinoma Renal Murino (RENCA)

O carcinoma renal murino (RENCA) surgiu espontaneamente em camundongos BALB/c e foi originalmente isolado pela Dra. Sarah Stewart no National Cancer Institute nos Estados Unidos e, em seguida, seu crescimento foi caracterizado em animais singênicos (Murphy e Hrushesky, 1980; Williams *et al.*, 1981). O RENCA é um tumor de imunogenicidade baixa a moderada que pode ser injetado no sítio ortotópico, tornando-se altamente vascularizado durante seu desenvolvimento, podendo invadir localmente e formar metástases em linfonodos regionais, pulmões e fígado (Murphy e Hrushesky, 1973). Seu crescimento progressivo a partir do sítio ortotópico de maneira similar ao descrito para o câncer renal humano permite considerá-lo um dos principais modelos para avaliação de abordagens quimio e imunoterapêuticas ao tratamento do câncer renal (Wiltrout, 1993; Wigginton e Wiltrout, 2002).

O RENCA pode ser transplantado para uma variedade de sítios anatômicos, dependendo do tipo de abordagem terapêutica a ser estudada. As vias de inoculação subcutânea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) e intrarrenal (i.r.) são amplamente empregadas para a inoculação das células RENCA. Em geral, as velocidades de crescimento dos tumores primários resultantes são similares, com exceção do tumor i.p. que apresenta um desenvolvimento mais rápido em relação aos demais. Da mesma forma, o tempo de sobrevivência dos camundongos inoculados i.p. é ligeiramente menor, em torno de 28-32 dias, do que o determinado para as outras vias de inoculação (35-45 dias) (Wiltrout, 1993).

No modelo RENCA, diferentes abordagens terapêuticas podem ser avaliadas contra a doença progressivamente mais avançada e contra a doença localizada em diferentes órgãos bem como quando o tumor primário cresce no rim e depois se dissemina espontaneamente para outros órgãos. Entretanto, esse tipo de experimento exige habilidades cirúrgicas. Os animais podem ser tratados com

o tumor primário ainda presente no rim. Aproximadamente 7 dias após a inoculação tumoral, o tumor começa a invadir localmente e, a partir do dia 11, as metástases começam a aparecer. Em alguns experimentos realiza-se a ressecção do tumor primário (nephrectomia) previamente ao uso de quimioterapia e/ou imunoterapia para tratar a doença residual disseminada. A localização do tumor primário no rim torna a sua ressecção relativamente simples e mimetiza a situação clínica de um paciente portador de tumor renal que tem seu órgão retirado (nephrectomia) previamente ao tratamento da fase metastática da doença (Wiltrout, 1993).

O RENCA espontaneamente invade os pulmões a partir de um implante i.r.; um aspecto bastante interessante uma vez que os pulmões são um dos alvos principais de metástase no câncer renal humano. Durante o crescimento progressivo de um implante i.r. de células RENCA também podem ser observadas metástases hepáticas. De fato, esse modelo também é usado para o estudo de metástases hepáticas pois, a formação de metástases neste órgão é frequente durante a progressão de vários tipos de câncer humano, inclusive o renal. Por outro lado, a injeção de células RENCA através da via intravenosa (i.v.) induz a formação de metástases pulmonares, enquanto que a injeção intra-esplênica, leva à formação de metástases hepáticas. A grande vantagem desses experimentos para avaliação de abordagens terapêuticas é a reprodutibilidade com relação ao crescimento do tumor e a duração relativamente curta do experimento. No entanto, a principal desvantagem é o estado clínico aparentemente estável em que se encontra o camundongo hospedeiro quando se inicia a terapia, geralmente 3-10 dias após a injeção do tumor (Wiltrout, 1993).

1.4.3. Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)

O Carcinoma Pulmonar de Lewis, denominado 3LL ou LLC, foi isolado pela Dra. Margaret R. Lewis em 1951 a partir de um carcinoma epidermóide espontâneo de pulmão de camundongo C57BL/6 (Sugiura e Stock, 1955). Esse tumor maligno transplantável é pouco hemorrágico e a maior parte do tecido

tumoral é uma massa homogênea semifirme. O carcinoma de Lewis é um modelo tumoral importante em estudos sobre o desenvolvimento de metástases e de angiogênese assim como de quimioterapia (O'Reilly *et al.*, 1994).

Estudos demonstraram que a inoculação do carcinoma pulmonar de Lewis no tecido subcutâneo e sua posterior remoção favorecem o crescimento de metástases (O'Reilly *et al.*, 1994). Li e colaboradores (1990) reportaram que o implante ortotópico de uma suspensão de células do tumor pulmonar de Lewis não aumentou sua tumorigenicidade. Outros autores mostraram metástases somente nos linfonodos mediastinos após a injeção ortotópica de células tumorais (Doki *et al.*, 1999). Resultados mais recentes comprovaram que o tumor pulmonar de Lewis é um excelente modelo para se estudar o mecanismo de progressão tumoral incluindo metástases regionais e distantes, representativas do câncer pulmonar. Além disso, esse modelo possibilita a investigação do papel da angiogênese no desenvolvimento tumoral e a triagem de agentes capazes de inibir ou reverter esse processo (Rashidi *et al.*, 2000).

1.4.4. Células Endoteliais

Os pequenos vasos sanguíneos consistem somente de células endoteliais enquanto vasos maiores são cercados por células murais. As células endoteliais diferenciam-se a partir de angioblastos no embrião e a partir de células endoteliais progenitoras, mesoangioblastos, células progenitoras pluripotentes adultas ou outras subpopulações celulares da medula óssea de adultos. As células endoteliais contribuem para o crescimento de vasos pela liberação de fatores de crescimento angiogênicos e por isso, sua proliferação e função são importantes em diversos processos como desenvolvimento do organismo e neoplasias. Por este motivo, as células endoteliais vêm recebendo considerável atenção em estudos de terapias gênica e farmacológica de doenças cardiovasculares e de câncer (Rhim *et al.*, 1998; Browder *et al.*, 2000; Carmeliet, 2003).

1.4.4.1. Células Endoteliais Humanas derivadas de Cordão Umbilical (HUVEC)

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) são sensíveis a compostos que modulam a resposta angiogênica. A angiogênese envolve a formação de novos vasos sanguíneos e é essencial para o crescimento de tumores, havendo um grande interesse no desenvolvimento de compostos com atividade antiangiogênica para aplicação na terapia antitumoral. Compostos pró-angiogênicos, no entanto, promovem aumento na taxa de crescimento e diferenciação dessas células (Rhim *et al.*, 1998; Farinelle *et al.*, 2000).

1.4.4.2. Células do Hemangioendotelioma Murino (EOMA)

O endotélio é considerado a porta de entrada dos tecidos da perspectiva da corrente sanguínea. Alterações no endotélio são determinantes importantes na regulação do tráfego de células e moléculas através da corrente sanguínea para os tecidos. A linhagem de células EOMA, derivada de um hemangioendotelioma murino, um tumor caracterizado principalmente pela presença de cordões celulares maciços e estruturas endoteliais vasculares (Hoak *et al.*, 1971), mantém as propriedades características de células endoteliais (Obeso *et al.*, 1990). Além disso, as células EOMA expressam vários fatores relacionados a angiogênese: colágeno XVIII, que é uma das características de células endoteliais tubulares (Muragaki *et al.*, 1995), metaloproteases de matriz (MMPs), que são necessárias para a degradação de componentes da membrana basal subendotelial (Brown e Whittaker, 1999), catepsina L e a proteína multifuncional de matriz BM-40/SPARC/osteonectina, as quais também estão envolvidas na regulação da angiogênese (Felbor *et al.*, 2000). Além disso, a capacidade das células EOMA de sobreviver em pH ácido provavelmente reflete a expressão de H⁺-ATPases, as quais são encontradas especificamente em vasos em crescimento (Moser *et al.*, 1999). Há anos existe interesse pelo estudo da dependência do crescimento tumoral em função do suprimento vascular, focalizando inclusive a inibição do crescimento de tumores secundários e metastáticos (Hoak *et al.*, 1971).

1.4.5. Células da Leucemia Mielocítica Humana (HL60)

A linhagem HL60 foi estabelecida a partir do sangue periférico de pacientes com leucemia mielocítica aguda e que mostrou proliferação continuamente em culturas em suspensão. Além de serem utilizadas em estudos de eventos associados à indução de diferenciação, as células HL60 também são utilizadas como sistema modelo para análise de expressão gênica e em estudos de quimioterapia associada a eventos apoptóticos-proteolíticos (Martins *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1999; Uzunoglu *et al.*, 1999). Dentre as linhagens celulares utilizadas como modelos na pesquisa do câncer, a linhagem HL60 foi a primeira, e por muitos anos a única, disponível como modelo (Drexler *et al.*, 1995; Uzunoglu *et al.*, 1999).

Essa linhagem celular tem exercido um papel importante em estudos de diferenciação e crescimento celular de leucemias humanas. A diferenciação das células HL60 é acompanhada de uma mudança na expressão de antígenos de superfície e na aquisição de inúmeras funções como a geração de ânions superóxido e a adesão aos frascos de cultura. Diversos compostos induzem diferenciação de células HL60 em neutrófilos e monócitos, além de inibirem o crescimento celular (Ujihara *et al.*, 1998). A diferenciação celular de células HL60 em neutrófilos terminais maduros também foi associada com a inibição da proliferação celular seguida de morte celular programada ou apoptose. A diferenciação das HL60 em granulócitos após tratamento com ácido retinóico foi associada com mudanças no fenótipo apoptótico que estão relacionadas à susceptibilidade das células à apoptose. No entanto, o exato mecanismo que desencadeia a apoptose durante a diferenciação ainda não foi esclarecido (Doyle *et al.*, 2004). Outros estudos indicaram que o tratamento de células HL60 com vários agentes quimioterápicos era acompanhado de degradação proteolítica de uma série de polipeptídeos nucleares incluindo PARP (poli (ADP-ribose) polimerase) e laminina B₁ (Martins *et al.*, 1997).

Um progresso apreciável vem sendo obtido na terapia da leucemia mielocítica aguda (LMA) nos últimos 20 anos, que pode ser atribuído parcialmente à intensificação do tratamento, especialmente durante a fase de remissão. A

fração de células mortas após exposição a drogas citotóxicas freqüentemente aumenta com a dose, conforme evidências de diversos estudos clínicos, sugerindo que altas doses de quimioterapia melhoram a resposta ao tratamento. Entretanto, em alguns casos a intensificação das doses não aumenta significativamente a melhora do paciente devido a problemas de toxicidade (Masquelier *et al.*, 2004; Bradstock *et al.*, 2005). Estudos de indução de apoptose pela daunorrubicina ou mitoxantrona em linhagens celulares forneceram uma faixa terapêutica de indução de apoptose por agentes anticâncer em células leucêmicas, onde um aumento na concentração da droga acima da faixa estabelecida resultou em menor taxa apoptótica. Esses estudos contradizem outros resultados obtidos para a citotoxicidade *in vitro*, principalmente com relação à mudança no mecanismo de morte celular de apoptose para necrose com o aumento da dose (Masquelier *et al.*, 2004). Apesar disso, resultados mais recentes com pacientes portadores da LMA demonstraram o valor da administração de sessões quimioterápicas constituídas de altas doses de citarabina na terapia utilizando o protocolo ICE (idarrubicina, citarabina e etoposídeo) e também em terapia combinada com clofarabina (Bradstock *et al.*, 2005; Faderl *et al.*, 2005).

A primeira causa de fracasso no tratamento de pacientes adultos com leucemia é o aparecimento da resistência da doença. Diversos mecanismos podem explicar porque as células leucêmicas tornam-se resistentes à quimioterapia. A causa comum a todos os mecanismos inclui defeitos nas vias do processo apoptótico. Esses defeitos podem prejudicar a capacidade de atingir remissão e cura com a quimioterapia. Na tentativa de superar a resistência às drogas e aprimorar a aplicação clínica, grande enfoque está sendo dado para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que possam superar os defeitos no processo apoptótico (Schimmer *et al.*, 2001; Masquelier *et al.*, 2004).

1.5. TERAPIA DO CÂNCER E APOPTOSE

Apesar de todos os avanços no diagnóstico e inovações na terapia de alguns tipos de tumores específicos, o câncer continua a representar a principal

preocupação médica, limitando a longevidade e qualidade de vida das pessoas (Leszczyniecka *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2003; Sinha e El-Bayoumy, 2004). Embora a razão precisa para a ausência de uma maior eficácia das terapias atuais não esteja esclarecida, ela deve estar relacionada ao fato de o câncer não ser causado por uma única alteração genética, mas em vez disso, representar a associação de mudanças gênicas frequentes e específicas para os diferentes neoplasmas. Isso inclui alterações na expressão de proto-oncogenes, genes supressores de tumor recessivos e genes que afetam diretamente a progressão do câncer (genes moduladores de progressão) que resultam na perda do controle de proliferação das células tumorais (Leszczyniecka *et al.*, 2001; Kasibhatla e Tseng, 2003; Sinha e El-Bayoumy, 2004).

Assim que o câncer é diagnosticado, uma série de opções de tratamentos deve ser considerada dependendo do tipo de tumor, extensão e localização. As modalidades terapêuticas mais utilizadas são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia (Leszczyniecka *et al.*, 2001; Hu e Kavanagh, 2003; Westwell, 2004; De Almeida *et al.*, 2005). Além disso, a utilização de terapia fotodinâmica, imunoterapia e terapia antiangiogênica vêm crescendo nos últimos anos (Via e Magno, 2001; Folkman, 2003; Mesa e Fernández, 2004; Kerbel e Kamen, 2004; De Almeida *et al.*, 2005).

A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástases; no caso da leucemia, por exemplo, costuma ser necessário o uso conjunto de outros tipos de terapia, incluindo o transplante de medula óssea. A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia, com incremento da eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástases, sendo uma metodologia antineoplásica muito usada. Entretanto, mesmo que sejam usados os sensibilizadores (que diminuem os efeitos colaterais), o tratamento por radiação é sujeito a sérias limitações (Samuilov, 2003; Papageorgius *et al.*, 2005).

Nenhuma dessas abordagens é suficientemente efetiva por si, pois a maioria dos tumores malignos contém grandes áreas pouco vascularizadas caracterizadas por hipóxia ou anóxia. Essas zonas são menos sensíveis à radiação ionizante, pois os efeitos da radiação requerem oxigênio, e à terapia antiangiogênica que requer vascularização. O desenvolvimento de resistência à droga e a toxicidade sistêmica estão frequentemente associados à quimioterapia convencional, limitando assim a eficiência terapêutica. Na tentativa de diminuir e eliminar essas complicações de tratamento, estão sendo enfatizadas abordagens alternativas que incluem o uso da quimioterapia em combinação com outras modalidades como radioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia, terapia de diferenciação e terapia antiangiogênica. O objetivo desses protocolos de tratamento múltiplo é eliminar os problemas associados com a resistência de células cancerosas a uma droga particular ou classe de drogas e, de diminuir a toxicidade associada com a quimioterapia de alta dose. A imunoterapia, utilizada em conjunto com a quimioterapia, foca a estimulação do sistema imune do paciente com câncer no intuito de oferecer maior resistência contra a doença. Neste caso, infelizmente, as drogas utilizadas também não são tumor-específicas e estão associadas a efeitos colaterais intensos incluindo imunossupressão (Leszczyniecka *et al.*, 2001; Fishman e Seigne, 2002; Samuilov, 2003; Kerbel e Kamen, 2004; Mesa e Fernández, 2004; De Almeida *et al.*, 2005).

Os avanços nos estudos da biologia molecular do câncer desvendam um espectro amplo de alterações em uma variedade imensa de genes, incluindo aqueles envolvidos nas cinéticas temporais associadas a processos fisiológicos complexos tais como os de regulação de crescimento, diferenciação, resposta à quimioterapia e progressão tumoral. Abordagens como “microarrays” para triagem de cDNA e análise em série de expressão gênica diferencial dentre outros, são capazes de identificar novos genes que exercem papel importante na fisiologia e crescimento tumoral. Esses novos genes representarão alvos potenciais para definir a susceptibilidade do câncer a protocolos de tratamentos específicos, para a identificação de novas drogas para aperfeiçoamento de terapias e para o

desenvolvimento de reagentes genéticos para a terapia do câncer baseada em genes (Leszczyniecka *et al.*, 2001; Green, 2004; Lee e Macgregor, 2004).

A pesquisa do câncer tem sido um processo contínuo de geração de uma base rica e complexa de conhecimentos reveladores das mudanças genéticas dinâmicas envolvidas na doença. A vasta variedade de genótipos de células cancerosas é uma manifestação de alterações essenciais na fisiologia celular que ditam o crescimento maligno: mutações que dão origem à proliferação excessiva e interrupções nas vias de sinalização de sobrevivência que asseguram a persistência dessas células hiperproliferativas. Essa teoria estabelece a ligação fundamental existente entre neoplasia e apoptose (Hanahan e Weinberg, 2000; Johnstone *et al.*, 2002; Kasibhatla e Tseng, 2003; Mita e Tolcher, 2005).

O fenômeno de apoptose foi descrito pela primeira vez por Carl Vogt em 1842. Desde a descoberta de sua relevância para o câncer, não demorou muito para que os princípios e a complexidade da sinalização da apoptose em nível molecular fossem esclarecidos (Igney e Krammer, 2002; Reed, 2003; Guimarães e Linden, 2004).

A apoptose é um processo de auto-destruição organizada das células sem, no entanto, provocar uma resposta inflamatória. Morfologicamente, células que sofrem apoptose apresentam redução do volume celular, estrangulamento da membrana celular sem perda de integridade e formação de vesículas (corpos apoptóticos), condensação nuclear, agregação da cromatina e degradação endonucleocítica de DNA em fragmentos nucleossomais. Molecularmente, a apoptose clássica é causada pela ativação de caspases embora existam evidências crescentes de que o processo de morte celular com características apoptóticas possa ocorrer sem a ativação de caspases (Saraste e Pulkki, 2000; Schimmer *et al.*, 2001; Hu e Kavanagh, 2003; Guimarães e Linden, 2004; Mita e Tolcher, 2005).

As caspases são uma família de cisteína-proteinases intracelulares que se encontram em estado latente (zimogênio) nas células, mas, tornam-se ativas em resposta a uma grande variedade de estímulos de morte celular (Ashe e Berry, 2003). As caspases iniciadoras (caspase-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10 e -14) são

ativadas via autoprocessamento induzido por oligomerização, enquanto as caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) são ativadas por outras proteases, incluindo caspases iniciadoras e granzima B. A clivagem proteolítica de substratos celulares pelas caspases efetoras determina as características da morte celular por apoptose (Ashe e Berry, 2003; Guimarães e Linden, 2004; Mita e Tolcher, 2005).

Três vias principais foram identificadas de acordo com suas caspases iniciadoras: a via de receptores de morte envolvendo a caspase-8 (via de receptores de morte ou extrínseca), a via de estresse no retículo endoplasmático atribuída à ativação da caspase-12 e a via mitocondrial (via intrínseca), na qual vários sinais podem desencadear a liberação de proteínas, levando à ativação de caspase-9 e, conseqüentemente, à cascata de ativação da caspase-3, -7 ou -6 (Reed, 2003; Ashe e Berry, 2003; Guimarães e Linden, 2004; Sheikh e Huang, 2004).

Defeitos no mecanismo apoptótico exercem um papel importantíssimo na patogênese de tumores, aumentando a sobrevivência das células neoplásicas, que possuem menor necessidade de fatores de crescimento exógenos e apresentam alterações genéticas cumulativas que desregulam a proliferação celular, promovem angiogênese, exibem proteção contra hipóxia e estresse oxidativo com expansão da massa tumoral, além de maior motilidade celular e capacidade de invasão durante a progressão tumoral (Reed, 1999; Hanahan e Weinberg, 2000; Samuilov, 2003). De fato, defeitos na apoptose são reconhecidos como importantes complementos à ativação proto-oncogênica, uma vez que a desregulação de oncoproteínas leva a divisão celular a desencadear o processo apoptótico (Green e Evan, 2002; Johnstone *et al.*, 2002; De Almeida *et al.*, 2005). De maneira similar, defeitos no reparo de DNA e segregação cromossômica normalmente ativam o suicídio celular como um mecanismo de defesa para erradicar células instáveis geneticamente. Então, defeitos no processo apoptótico permitem a sobrevivência de células geneticamente instáveis, propiciando a seleção de clones cada vez mais agressivos (Ionov *et al.*, 2000; Kasibhatla e Tseng, 2003). Defeitos apoptóticos também facilitam metástases, pois garantem a sobrevivência de células endoteliais que não se encontram aderidas à matriz

extracelular. Esses defeitos também estão associados à resistência ao sistema imune, visto que células T citotóxicas (CTLs) e células NK dependem da integridade da maquinaria apoptótica para atacar os tumores (Frisch e Screaton, 2001; Reed, 2003; Mesa e Fernández, 2004). Por fim, defeitos apoptóticos associados ao câncer contribuem para a resistência a drogas e radioresistência, aumentando o limiar da dose requerida para a morte das células tumorais (Makin e Hickman, 2000; De Almeida *et al.*, 2005). Durante a quimioterapia citotóxica, a apoptose de células endoteliais na região vascularizada dos tumores precede a apoptose de células tumorais, mesmo quando o tumor já se tornou resistente às drogas. A administração de inibidores de angiogênese, que não são citotóxicos diretamente às células tumorais, podem aumentar a apoptose de células cancerígenas e inibir o crescimento tumoral devido a inibição da proliferação e migração das células endoteliais e/ou indução da apoptose dessas células (Liekens *et al.*, 2001; Folkman, 2003; Kerbel e Kamen, 2004).

Vários antagonistas endógenos das vias de ativação das caspases foram identificados e exemplos da desregulação da expressão dessas moléculas e das suas funções em vários tipos de câncer foram descritos. Esses supressores apoptóticos tornaram-se alvos para a descoberta de drogas com capacidade de anular suas funções citoprotetoras e restaurar a sensibilidade das células tumorais a apoptose. Diversos estudos tentaram induzir apoptose interferindo em etapas da via apoptótica desencadeadas por receptores de morte, proteínas da família Bcl-2, caspases e proteínas intracelulares antiapoptóticas (IAPs). A maior parte dessas terapias ainda está em fase pré-clínica de desenvolvimento, no entanto, existem diversos agentes promissores que possuem componentes principais da maquinaria de morte celular como alvos, induzindo a apoptose por intermédio da modulação da atividade de proteínas quinases, fosfatases, fatores de transcrição e receptores de superfície celular (Igney e Krammer, 2002; Darnell, 2002; Hu e Kavanagh, 2003; Reed, 2003; Graaf *et al.*, 2004; Green, 2004; Sheikh e Huang, 2004; Mita e Tolcher, 2005).

Embora o uso de indutores de apoptose tenha sido introduzido na terapia do câncer, efeitos citotóxicos ainda ocorrem em células normais devido à

similaridade dos genes que evocam apoptose em células normais e em células tumorais. Assim, o desenvolvimento de indutores apoptóticos mais seletivos é necessário para minimizar os efeitos colaterais e maximizar a eficácia (Hu e Kavanagh, 2003; Reed, 2003).

Assim, a regulação dos defeitos apoptóticos é um aspecto fundamental da biologia do câncer. Na era pós-genômica a terapia do câncer será caracterizada por tratamento personalizado e seleção cuidadosa dos alvos terapêuticos. O proteoma deve ajudar a identificar rapidamente novas proteínas em vias preferenciais relacionadas à apoptose em amostras de pacientes. Um melhor conhecimento dos mecanismos celulares, da regulação da indução de apoptose por estímulos intrínsecos ou extrínsecos e de drogas anticâncer deve fornecer sólido suporte para a individualização dos regimes quimioterapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

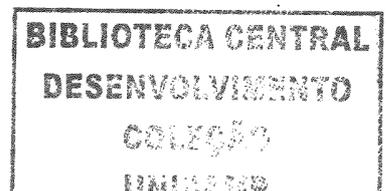
O objetivo geral deste trabalho é a avaliação do potencial antitumoral de dois compostos de origem natural, a violaceína - pigmento majoritário produzido pela *Chromobacterium violaceum* - e o P-MAPA - agregado protéico de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio produzido pelo *Aspergillus oryzae* - utilizando experimentos *in vitro* com diferentes linhagens de células tumorais e/ou experimentos *in vivo* com modelos tumorais de camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta tese foram:

- Avaliação da sobrevida de camundongos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) ou com o carcinoma renal murino (RENCA) e tratados com violaceína;
- Avaliação da sobrevida de camundongos inoculados com o tumor pulmonar de Lewis (3LL) e tratados com P-MAPA;
- Avaliação da disseminação metastática e sobrevida de camundongos inoculados com RENCA e tratados com P-MAPA;
- Estudo da atividade de células “natural killer” (NK) no baço de camundongos inoculados com RENCA e tratados com P-MAPA;
- Avaliação da produção das citocinas no soro de camundongos inoculados com RENCA e tratados com P-MAPA;
- Determinação da atividade citotóxica da violaceína em culturas de células do tumor de Ehrlich (TE), RENCA, 3LL, HL60 e células de origem endotelial, e
- Investigação da indução de apoptose pela violaceína como um possível mecanismo de morte celular nas linhagens de TE, RENCA e HL60.

3. MATERIAL E MÉTODOS



3.1. BIOSÍNTESE DA VIOLACEÍNA

A violaceína (3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona) foi isolada a partir da *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496), purificada e caracterizada como descrito anteriormente (Rettori e Durán, 1998; Bromberg, 2000).

3.2. BIOSÍNTESE DO P-MAPA

O composto P-MAPA foi gentilmente cedido pelo Centro de Desenvolvimento de Compostos com Atividades Biológicas de São Paulo (CEDECAB), sendo obtido a partir de culturas selecionadas de *Aspergillus oryzae* (AO-93) por fermentação em bioreatores, purificado por cromatografia e caracterizado conforme descrito anteriormente (Durán *et al.*, 1990, 1993).

3.3. ANIMAIS

Camundongos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), foram utilizados para a realização dos experimentos *in vivo* e para a manutenção do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Para a realização dos experimentos *in vivo* e manutenção do carcinoma renal murino (RENCA), os camundongos BALB/c machos de mesma idade já citada, foram fornecidos pelo centro de bioterismo do National Cancer Institute (NCI) (Animal Production Area - Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, MD - EUA). Para a experimentação *in vivo* empregando-se o carcinoma pulmonar de Lewis (3LL) foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de idade entre 6 e 8 semanas, também fornecidos pelo centro de bioterismo do NCI. Os animais foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em biotério tipo convencional controlado devido à implantação de barreiras de proteção e técnicas de manejo capazes de manter o

padrão sanitário SPF ("specific pathogen free") dos animais. A temperatura da sala foi mantida constante em $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão (Labina, Purina, São Paulo - SP) e água estéreis fornecidas *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante um período de 72 horas previamente à realização dos experimentos.

3.4. MANUTENÇÃO DOS MODELOS TUMORAIS *IN VIVO* E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DOS EXPERIMENTOS

3.4.1. Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

O tumor de Ehrlich, originalmente descrito como um carcinoma mamário de origem espontânea (Loewenthal e John, 1932), foi obtido de uma linhagem do Hospital do Câncer (S.P.) e é mantido em nosso laboratório na forma ascítica por passagens sucessivas intraperitoneais (i.p.) entre animais. Dessa forma, células tumorais de Ehrlich, armazenadas em frascos criogênicos a -170°C (nitrogênio líquido), foram descongeladas e reativadas pela reinoculação na cavidade peritoneal do camundongo. Para os grupos experimentais foram utilizadas células após 3 a 5 passagens sucessivas pela cavidade peritoneal de camundongos doadores.

Após a retirada do líquido ascítico do peritônio, a suspensão de células tumorais foi diluída em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4, estéril gelado e, em seguida, o número e a viabilidade das células tumorais foram determinados em câmara hematocimétrica após diluição em solução de azul de tripan 1%. A viabilidade das células tumorais foi sempre superior a 95%, e a inoculação de 20×10^6 células tumorais viáveis / camundongo BALB/c macho em 0,2 mL de PBS foi realizada por passagem intraperitoneal sucessiva (Justo *et al.*, 2000). Os repasses foram realizados a cada 7 a 10 dias.

3.4.1.1. Avaliação da atividade antitumoral da violaceína administrada intraperitonealmente (i.p.)

Para os experimentos *in vivo*, grupos de 10 camundongos BALB/c machos foram inoculados via intraperitoneal (i.p.) com 6×10^6 células TAE / animal (Justo *et al.*, 2000) em um volume de 0,2 mL de PBS, pH 7,4 e após 24h iniciou-se o tratamento com as soluções de violaceína (0,1 e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 5,0, 7,5, 10 ou 30 mg kg^{-1}). Os animais foram tratados por 5 dias consecutivos com 0,2 mL das soluções administradas i.p. diariamente. As soluções de violaceína foram preparadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 10% de Tween 80 (veículo). Camundongos controles inoculados com o TAE receberam apenas o veículo na mesma razão dose-volume administrada aos animais tratados com violaceína. Para determinação da sobrevida os animais foram monitorados diariamente até o óbito.

3.4.2. Carcinoma Renal Murino (RENCA)

O Carcinoma renal murino (RENCA) foi gentilmente cedido pelo Dr. Robert H. Wiltout (Laboratory of Experimental Immunology - National Cancer Institute (NCI), Frederick - MD, EUA). As células tumorais foram obtidas a partir de tumores assepticamente removidos do rim e intestino do animal portador e dissociados por compressão com o êmbolo de uma seringa em solução salina balanceada de Hanks sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (HBSS) estéril (Bio-Whittaker, Walkersville, MD). O tecido dissociado foi transferido para um tubo de Falcon de 50 mL e ressuspendido em 50 mL de meio de cultura RPMI 1640 (meio desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute - Bio-Whittaker, Walkersville, MD) completo, ou seja, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 2 mmol L^{-1} de L-glutamina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 1% de solução de aminoácidos não essenciais (NEAA) 100X concentrada (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 1 mmol L^{-1} de piruvato de sódio (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), solução de antibióticos benzilpenicilina dissódica (100 UI mL^{-1}) e sulfato de estreptomicina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) e 10 mmol L^{-1} de

HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazina ácido etanosulfônico) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD). O sobrenadante foi removido após sedimentação e as células foram centrifugadas e ressuspendidas para contagem em câmara hematocimétrica após diluição em azul de tripan 1%. A viabilidade das células tumorais foi sempre superior a 95%. A concentração da suspensão de células tumorais foi ajustada a 2×10^5 células mL^{-1} e então 0,2 mL foram injetados i.p. por animal. O repasse i.p. foi realizado a cada 14 dias com 0,1 mL de células (1×10^5 células mL^{-1}) obtidas da cavidade peritoneal de camundongos doadores (Salup e Wiltrout, 1986).

3.4.2.1. Anestesia dos animais

Para a anestesia dos camundongos foram utilizados dois protocolos: inalação da mistura de isoflurano líquido vaporizado com 4,5% de oxigênio em câmara fechada e anestesia injetável i.p. de 0,2 mL por 20 g de peso do animal de uma mistura de 1% de ketamina (100 mg mL^{-1}) e 0,6% de xilazina (20 mg mL^{-1}) em HBSS estéril (Spinosa *et al.*, 2002).

3.4.2.2. Inoculação intrarrenal (i.r.) do RENCA

As células tumorais utilizadas foram obtidas de passagens i.p. em animais BALB/c conforme descrito anteriormente. Após anestesia dos animais, realizou-se uma incisão lateral de aproximadamente 2 cm de comprimento no flanco esquerdo do camundongo, cerca de 1,0 cm abaixo da espinha dorsal. Após localização do rim esquerdo contra a membrana peritoneal, 1×10^5 células tumorais em 0,1 mL de HBSS foram injetadas cuidadosamente sob a cápsula renal utilizando-se agulha de 13 x 4,5. Em seguida, a incisão foi fechada com autoclips e a recuperação pós-cirúrgica dos animais monitorada (Wiltrout *et al.*, 1988).

3.4.2.3. Nefrectomia de rim portador do RENCA

Após anestesia dos animais portadores de tumor renal de 11 dias, os autoclips foram removidos e uma incisão foi realizada sobre a primeira. A seguir realizou-se uma pequena incisão na membrana peritoneal, pela qual o rim contendo o tumor foi exposto com auxílio de um fórceps, enquanto a artéria foi preza com um homeostato. Depois a artéria foi amarrada abaixo do homeostato com uma linha cirúrgica e realizou-se a ressecção acima do homeostato com um bisturi. A ligadura foi retornada ao peritônio, as duas peles foram aproximadas e a incisão fechada com autoclips. Os animais foram colocados em gaiolas forradas com papel toalha até estarem completamente acordados. Um período de recuperação superior a 3 - 4 h foi respeitado para início de imunoterapia ou quimioterapia (Wiltrout *et al.*, 1988).

3.4.2.4. Protocolo de tratamento do experimento 1: avaliação da atividade antitumoral da violaceína administrada i.p. após nefrectomia

Neste experimento foram utilizados 7 grupos de 10 camundongos BALB/c machos: um grupo controle negativo, um grupo controle positivo e cinco grupos tratados com diferentes doses de violaceína. No dia 0 do experimento, todos os animais foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL de HBSS estéril. No 11^o dia, realizou-se a nefrectomia do rim no qual as células tumorais haviam sido injetadas, e 24 h após, iniciou-se o tratamento i.p. dos animais. Aos grupos tratados foram administradas diferentes doses de violaceína (0,1, 1,0, 4,0, 8,0 e $16 \mu\text{g kg}^{-1}$) preparadas em HBSS estéril contendo 1% de DMSO. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO) na mesma razão dose volume administrada aos animais tratados com violaceína. Os animais dos grupos tratados e controle negativo foram tratados com uma dose diária de 0,2 mL, 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. O grupo controle positivo recebeu tratamento com interleucina-12 (IL-12) / pulso interleucina-2 (IL-2), que consistiu de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2)

(Proleukin® - Chiron, Emeryville, CA) em 0,2 mL, de PBS estéril administradas aos camundongos somente um dia por semana e 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (rmlL-12) (Peptrotek®, Bethesda, MD) em 0,2 mL de PBS estéril, administrada diariamente aos camundongos 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais (Wigginton *et al.*, 1996). As soluções estoques de rhIL-2 e rmlL12, preparadas em água estéril, foram armazenadas a -70°C para uso. Para a administração aos animais, as soluções estoques foram diluídas em PBS estéril contendo 5% de soro de camundongos BALB/c para obtenção das concentrações de 11×10^6 UI mL⁻¹ para rhIL-2 e 1 µg µL⁻¹ para rmlL-12. A Figura 3 a seguir esquematiza os protocolos de inoculação tumoral e de tratamento empregados nesse experimento. Os animais foram monitorados diariamente para sobrevivência.

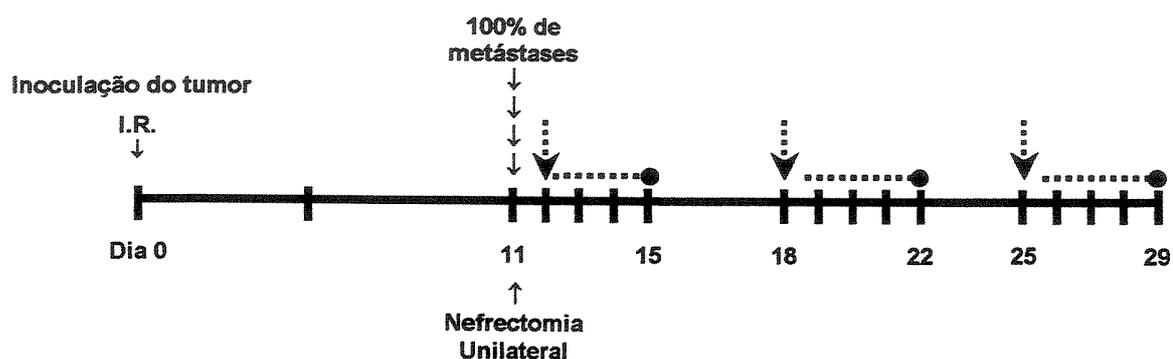


Figura 3: Esquema de tratamento do experimento 1. Células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas i.r. em camundongos BALB/c machos (dia 0). O tratamento dos animais (i.p.) iniciou 24 h após a nefrectomia (dia 11) e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.

3.4.2.5. Protocolos de tratamento do experimento 2: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado pela mesma via de inoculação do RENCA, subcutânea (s.c.) ou intraperitoneal (i.p.)

Neste experimento avaliou-se a sobrevivência dos animais utilizando duas vias diferentes (subcutânea e intraperitoneal) de administração das células tumorais e de tratamento com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA. A administração s.c. foi realizada no dorso do animal na região lombar. Além disso, realizou-se um estudo preliminar da atividade de células NK do baço de camundongos submetidos aos dois protocolos de tratamento, utilizando-se as células YAC-1 como alvo. Os animais do grupo tratado com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA receberam doses diárias de 0,2 mL de P-MAPA em HBSS estéril contendo 1% de DMSO. O grupo controle negativo recebeu uma dose diária do veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO) na mesma razão dose volume administrada aos animais tratados com P-MAPA. O grupo controle positivo recebeu tratamento com $0,5 \mu\text{g}$ de IL-12 em 0,2 mL de PBS estéril, administrada diariamente aos camundongos. Todos os tratamentos foram realizados 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. O experimento foi composto por 3 grupos de 13 camundongos BALB/c machos atribuídos da seguinte maneira:

Grupo I: Grupo controle negativo - animais inoculados i.p. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados i.p. com 0,2 mL de veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

Grupo II: Grupo controle positivo - animais inoculados i.p. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados i.p. com 0,2 mL de rIL-12 ($0,1 \mu\text{g}$ / camundongo em PBS estéril).

Grupo III: Grupo tratado - animais inoculados i.p. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados i.p. com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA (em 0,2 mL de HBSS contendo 1% de DMSO).

Grupo IV: Grupo controle negativo - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados s.c. com 0,2 mL do veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

Grupo V: Grupo controle positivo - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados s.c. com 0,2 mL de rmlL-12 (0,1 μg /camundongo em PBS estéril).

Grupo VI: Grupo tratado - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL) e tratados s.c. com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA (em 0,2 mL de HBSS contendo 1% de DMSO).

A Figura 4 a seguir esquematiza os protocolos de inoculação tumoral e de tratamento empregados nesse experimento. Somente quando os tumores dos animais dos grupos IV - VI (inoculação tumoral subcutânea) atingiram 5 mm de diâmetro (dia 0 do experimento), os animais dos grupos I - III foram inoculados i.p. com as células tumorais. O tratamento de todos os grupos iniciou no 3º dia do experimento.

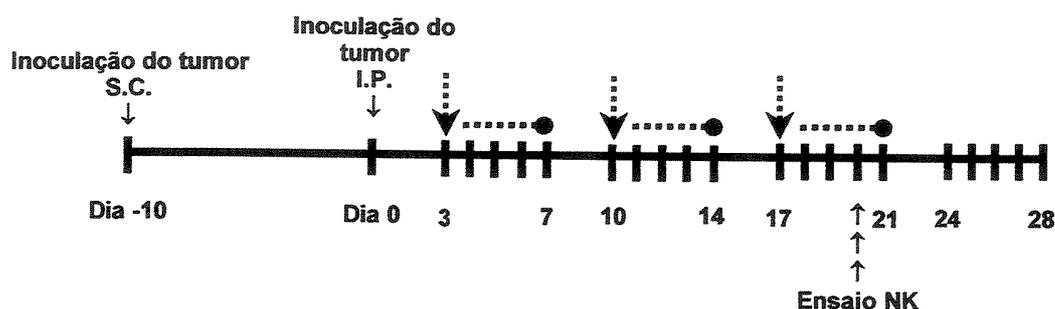


Figura 4: Esquema de tratamento do experimento 2. Células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL em HBSS estéril) foram injetadas s.c. (dia -10) nos animais dos grupos IV-VI e i.p. (dia 0) nos grupos I-III. O tratamento de todos os grupos iniciou no 3º dia e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os animais dos grupos I-III receberam o tratamento pela via i.p. enquanto os dos grupos IV-VI receberam pela via s.c. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.

No 20º dia do experimento, foram coletados baços de 3 animais de cada grupo para a avaliação da atividade das células NK, conforme descrito a seguir.

Ensaio de avaliação de atividade de células “natural killer” (NK):**• Manutenção e preparação das células alvo**

A linhagem de células tumorais YAC-1, linfoma originário de camundongos A/Sn induzido pelo vírus Moloney, foi utilizada como célula alvo para o ensaio. Essas células crescem em suspensão e foram mantidas em cultura contínua em meio RPMI 1640 (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ na atmosfera.

Para o ensaio de citotoxicidade, uma suspensão de aproximadamente 5 x 10⁶ células alvo foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 0,2 mL de soro fetal bovino. As células foram marcadas com 200 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear - Boston, MA) por 60 minutos em estufa a 37°C sob agitação periódica. A seguir, as células foram lavadas (duas vezes) com meio RPMI para células NK: meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos essenciais 1X concentrada, 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), solução de antibióticos benzilpenicilina dissódica (100 U mL⁻¹) e sulfato de estreptomicina (100 µg mL⁻¹) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 1 mmol L⁻¹ de piruvato de sódio (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) e 10 mmol L⁻¹ de HEPES (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) e a densidade celular ajustada para 1 x 10⁵ células mL⁻¹ (Salup *et al.*, 1992).

• Obtenção de células efectoras esplênicas para ensaio de citotoxicidade

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus baços coletados assepticamente em HBSS estéril. As suspensões celulares (“pool” de 3 baços por grupo) foram obtidas após 30-60 segundos de desrupção dos baços no Stomacher (Tekmar, Cincinnati, OH). As células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (d=1,077; Pharmacia, Piscataway, EUA), lavadas e ressuspendidas em meio RPMI (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) para células NK. A seguir, as suspensões foram filtradas em membranas de nylon de 100 µm (Falcon®-Becton Dickinson) e coletadas em tubos de Falcon. Após adição de meio RPMI para células NK, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000

rpm e ressuspensas em 3 mL de meio RPMI para células NK, considerando-se 1 mL de meio para cada baço (Salup *et al.*, 1992). As células foram contadas após diluição em azul de tripan 1%, e sua concentração ajustada para 1×10^7 células mL^{-1} .

- **Ensaio de liberação de ^{51}Cr**

Foram feitas diluições seriadas 1:3 das suspensões obtidas no item anterior para obtenção das razões de 100:1, 33:1, 11:1 e 3:1. Em microplacas de cultura de 96 poços foram adicionados 100 μL das suspensões de células efectoras em triplicata para cada diluição, com reserva de 3 cavidades para lise máxima (100 μL de Triton X-100 50%) e outros 3 para a lise espontânea (100 μL de meio de cultura de células NK). Depois de plaquear as células efectoras, foram adicionados 100 μL das células alvo marcadas. Após incubação da microplaca por 4 horas em estufa a 37°C , os sobrenadantes foram coletados automaticamente (Titertek, Flow Laboratories, McLean, VA) e a radioatividade medida em contador gama (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) (Salup *et al.*, 1992). A porcentagem de lise específica foi calculada pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de lise específica (\%)} = \frac{\text{lise teste} - \text{lise espontânea}}{\text{lise máxima} - \text{lise espontânea}} \times 100$$

3.4.2.6. Protocolo de tratamento do experimento 3: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado i.p. após nefrectomia

Neste experimento foram utilizados 7 grupos de 15 camundongos BALB/c machos: um grupo controle negativo, um grupo controle positivo e cinco grupos tratados com diferentes doses de P-MAPA. No dia 0 do experimento, todos os animais foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL de HBSS estéril. No 11^o dia, realizou-se a nefrectomia do rim no qual as células tumorais haviam sido injetadas, e 24 h após, iniciou-se o tratamento i.p. dos animais. Aos grupos tratados foram administradas diferentes doses de P-MAPA (0,1, 1,0, 2,5,

5,0 e 10,0 mg kg⁻¹) preparadas em HBSS estéril contendo 1% de DMSO. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO) na mesma razão dose volume administrada aos animais tratados com P-MAPA. Os animais dos grupos tratados e controle negativo foram tratados com uma dose diária de 0,2 mL, 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. O grupo controle positivo recebeu tratamento com IL-12 / pulso IL-2, que consistiu de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) (Proleukin® - Chiron, Emeryville, CA) em 0,2 mL, de PBS estéril administradas aos camundongos somente um dia por semana e 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (rmIL-12) (Peptrotek®, Bethesda, MD) em 0,2 mL de PBS estéril, administrada diariamente aos camundongos 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais (Wigginton *et al.*, 1996). As soluções estoques de rhIL-2 e rmIL12, preparadas em água estéril, foram armazenadas a -70°C para uso posterior. A Figura 3 do experimento 1 (item 3.4.2.4) esquematiza o protocolo de inoculação tumoral e de tratamento empregados nesse experimento. Os animais foram monitorados diariamente para sobrevida.

Os animais foram pesados antes da realização da nefrectomia e seus pesos foram monitorados no decorrer do experimento. Neste experimento, além da realização da curva de sobrevida, os níveis de citocinas séricas e a formação de metástases também foram avaliados.

As metástases foram avaliadas macroscopicamente em diferentes órgãos após o óbito do animal e classificadas em escala de 5 pontos. Os resultados foram expressos em porcentagem de animais portadores de metástases classificadas segundo a intensidade pela escala de 5 pontos.

Dosagem de citocinas séricas

Para a dosagem de citocinas nas amostras de soro dos camundongos, o sangue de 3 animais por grupo foi obtido por punção da veia retro-orbital nos dias 1, 2, 3, 8, 9, 10 e 14 após o início do tratamento com veículo ou P-MAPA e separados em "pool". As amostras de sangue foram mantidas a 4°C por 24 h para retração do coágulo e, a seguir, centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos. As

amostras de soro foram armazenadas a -20°C para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, TNF- α , IFN- α e IFN- γ . A análise quantitativa das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α , e IFN- γ foi realizada utilizando-se o kit BD TM Cytometric Bead Array - Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA (BD Biosciences, CA - EUA), segundo as instruções do fabricante (Anexo 4). As demais citocinas, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18 e IFN- α , foram determinadas utilizando-se kits de ELISA sanduíche (R&D Systems, MN - EUA), segundo as instruções do fabricante (Anexo 5).

3.4.2.7. Protocolo de tratamento do experimento 4: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA administrado pela via i.p. aos animais inoculados i.r. com RENCA

Neste experimento avaliou-se a sobrevivência de animais inoculados i.r. com 1×10^5 de células RENCA em 0,1 mL de HBSS estéril e tratados i.p. com P-MAPA. Os animais do grupo tratado com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA receberam doses diárias de 0,2 mL em HBSS estéril contendo 1% de DMSO. O grupo controle negativo recebeu uma dose diária do veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO) na mesma razão dose volume administrada aos animais tratados com P-MAPA. O grupo controle positivo recebeu tratamento com 0,1 μg de IL-12 em 0,2 mL de PBS estéril, administrada diariamente aos camundongos. Todos os tratamentos foram realizados 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Este experimento foi composto por 3 grupos de 10 camundongos BALB/c machos atribuídos da seguinte maneira:

Grupo I: Grupo controle negativo - animais inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados i.p. com 0,2 mL de veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

Grupo II: Grupo controle positivo - animais inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados i.p. com 0,2 mL de rmlL-12 (0,1 μg / camundongo em PBS estéril).

Grupo III: Grupo tratado - animais inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados i.p. com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA (0,2 mL de HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

A Figura 5 esquematiza os protocolos de inoculação tumoral e de tratamento empregados nesse experimento. As células RENCA foram inoculadas pela via intrarrenal no dia 0 do experimento e o tratamento de todos os grupos iniciou no 1º dia, sendo realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os animais foram monitorados diariamente para sobrevivência.

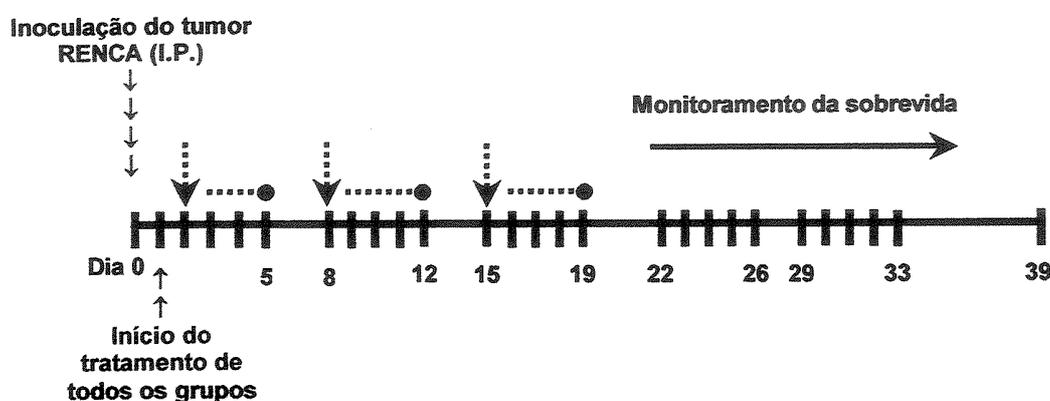


Figura 5: Esquema de tratamento do experimento 4. As células RENCA (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas i.p. nos animais, correspondendo ao dia 0 do experimento. O tratamento de todos os grupos iniciou no dia 1 e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os grupos portadores de RENCA receberam P-MAPA, veículo ou rml-12 pela via i.p. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.

3.4.3. Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL)

O Carcinoma Pulmonar de Lewis (3LL) foi gentilmente cedido pelo Dr. Robert H. Wiltrout (Laboratory of Experimental Immunology - NCI, Frederick - MD, EUA). O tumor foi mantido por passagens subcutâneas sucessivas de $1,0 \times 10^5$

células tumorais na região lombar do dorso de cada camundongo C57BL/6. Para obtenção de células tumorais um tumor foi assepticamente removido do animal doador e dissociado por compressão com o êmbolo de uma seringa em solução salina balanceada de Hanks sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (HBSS) estéril. O tecido dissociado foi transferido para um tubo de Falcon de 50 mL e ressuscitado em 50 mL de meio de cultura RPMI 1640 completo (item 3.4.2). O sobrenadante foi removido após sedimentação e as células foram centrifugadas e ressuscitadas para contagem em câmara hematocitométrica após diluição em azul de tripan 1%. Para inoculação s.c. foram injetadas $1,0 \times 10^5$ células em 0,1 mL de HBSS estéril por animal.

3.4.3.1. Protocolo de tratamento do experimento: avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA no modelo do carcinoma pulmonar de Lewis (3LL)

Neste experimento avaliou-se a sobrevivência de animais inoculados s.c. com 1×10^5 de células 3LL em 0,1 mL de HBSS estéril na região lombar do dorso dos animais e tratados i.p. com P-MAPA. Os animais do grupo tratado com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA receberam doses diárias de 0,2 mL em HBSS estéril contendo 1% de DMSO. O grupo controle negativo recebeu uma dose diária do veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO) na mesma razão dose volume administrada aos animais tratados com P-MAPA. O grupo controle positivo recebeu tratamento com $0,1 \mu\text{g}$ de IL-12 em 0,2 mL de PBS estéril, administrada diariamente aos camundongos. Todos os tratamentos foram realizados 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Este experimento de monitoração de sobrevivência dos animais foi composto por 3 grupos de 10 camundongos C57BL/6 machos atribuídos da seguinte maneira:

Grupo I: Grupo controle negativo - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células 3LL (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados s.c. com 0,2 mL de veículo (HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

Grupo II: Grupo controle positivo - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células 3LL (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados s.c. com 0,2 mL de rmlL-12 (0,1 μg /camundongo em PBS estéril).

Grupo III: Grupo tratado - animais inoculados s.c. com 1×10^5 células 3LL (em 0,1 mL de HBSS estéril) e tratados s.c. com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA (em HBSS estéril contendo 1% de DMSO).

A Figura 6 esquematiza os protocolos de inoculação tumoral e de tratamento empregados nesse experimento. As células 3LL foram inoculadas pela via subcutânea no dia 0 do experimento e o tratamento de todos os grupos iniciou no 1º dia, sendo realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os animais foram monitorados diariamente para sobrevida.

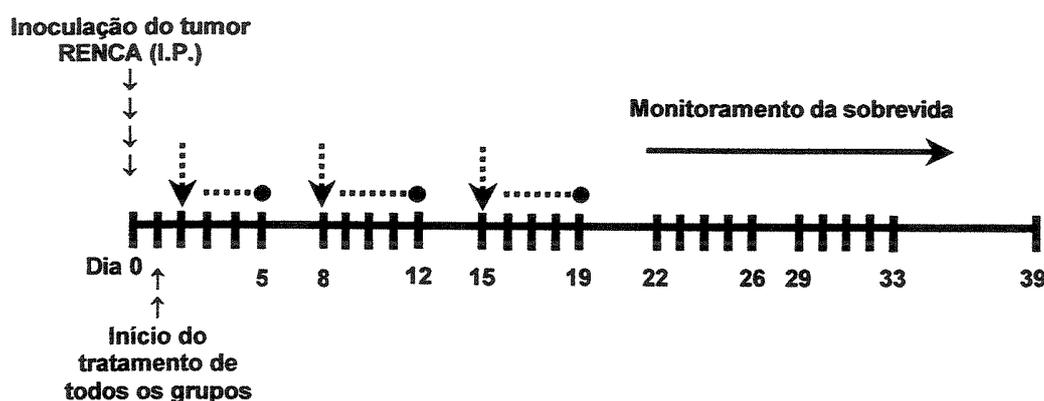


Figura 6: Esquema de tratamento do experimento com o carcinoma pulmonar de Lewis (3LL). As células 3LL (1×10^5 em 0,1 mL de HBSS estéril) foram injetadas s.c. nos animais, correspondendo ao dia 0 do experimento. O tratamento de todos os grupos iniciou no dia 1 e foi realizado 5 vezes por semana, por 3 ciclos semanais. Os grupos portadores do 3LL receberam P-MAPA, veículo ou rmlL-12 pela via s.c. As setas tracejadas indicam o início do tratamento no ciclo e as barras tracejadas indicam a duração do tratamento em cada ciclo.

3.5. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES E ENSAIOS *IN VITRO*

3.5.1. Tumor de Ehrlich (TE)

Para os experimentos *in vitro*, as células do tumor de Ehrlich foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos doadores em fase exponencial de crescimento (7-10 dias). Após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos e lavagem com solução de Hanks sem Ca^{2+} e Mg^{2+} estéril, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) suplementado com 25 mmol L⁻¹ de HEPES (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 25 mmol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Sigma), 100 µg mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 100 UI mL⁻¹ de benzilpenicilina dissódica (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de 2-mercaptoetanol (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Sigma) (meio completo). As células TE somente foram utilizadas em experimentos após três passagens em cultura. As células tumorais foram incubadas em garrafas de cultura na densidade de 3 x 10⁵ células mL⁻¹ a 37°C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Melo *et al.*, 2004). O número e a viabilidade das células tumorais (> 95%) foram determinados em câmara hematocitométrica, através da exclusão do corante azul de tripan.

Para os ensaios *in vitro* as células TE (3 x 10⁵ células mL⁻¹) foram incubadas por 72 h com violaceína na faixa de concentração de 0,01 - 12 µmol L⁻¹ em microplacas de 96 cavidades (Corning) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.5.2. Carcinoma renal murino (RENCA), tumor pulmonar de Lewis (3LL) e hemangioendotelioma murino (EOMA)

As células RENCA (5 x 10⁴ células mL⁻¹) (Salup *et al.*, 1985), as células 3LL (2,5 e 5 x 10⁴ células mL⁻¹) (Lee *et al.*, 2003) e as células EOMA (2,5 x 10⁴ células

mL⁻¹) (Wen *et al.*, 1999) foram mantidas em meio RPMI 1640 completo (item 3.4.2) em estufa úmida a 37°C e com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao atingirem confluência, as culturas foram tratadas com 0,25 % Tripsina - 0,02% (Quality Biological Inc., Walkersville, MD, EUA) EDTA para liberação das células e então, a viabilidade das células foi avaliada pela exclusão do corante azul de tripan em câmara hematocitométrica.

Para os ensaios *in vitro*, sempre foram utilizadas células com viabilidade superior a 95%. As células RENCA, 3LL e EOMA foram plaqueadas, nas respectivas densidades descritas acima, em meio RPMI completo (item 3.4.2) em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de violaceína (0,1 - 0,7 µmol L⁻¹) por períodos de 12, 24 ou 48 h.

3.5.3. Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)

As células HUVEC (3.000 células mL⁻¹) foram mantidas em meio M199 (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) suplementado com 1,5 g L⁻¹ de NaHCO₃ (Sigma), 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 60% de SFB (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 0,25 mg mL⁻¹ de heparina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), 0,5% de suplemento de crescimento de células endoteliais (ECGS) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), solução de antibióticos 100 UI mL⁻¹ benzilpenicilina dissódica e 100 µg mL⁻¹ sulfato de estreptomicina (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) e 250 µL de 2% de gelatina em água estéril (meio completo) (Hay *et al.*, 1992).

Para os ensaios *in vitro*, sempre foram utilizadas células com viabilidade superior a 95%. As células HUVEC foram plaqueadas no meio anteriormente descrito em microplacas de 96 cavidades, e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de violaceína (0,05 - 2,0 µmol L⁻¹) por 72 h.

3.5.4 Células da leucemia mielocítica humana (HL60)

As células HL60 foram cultivadas em suspensão em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2 mmol L⁻¹ de L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 25 mmol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Sigma), solução de antibióticos com 100 µg mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 100 UI mL⁻¹ de benzilpenicilina dissódica (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), 5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de 2-mercaptoetanol (Sigma) e 10% de SFB (Sigma) (meio completo) em estufa úmida a 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ (Melo *et al.*, 2003).

Para os ensaios *in vitro* as células HL60 (3 x 10⁵ células mL⁻¹) foram incubadas com violaceína na faixa de concentração de concentração 0,25 - 2,0 mmol L⁻¹ em microplacas de 96 cavidades (Corning) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ por períodos de 12, 24, 48 ou 72 h.

3.6. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

3.6.1. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan

O teste de exclusão de azul de tripan avalia a integridade estrutural da membrana celular. A viabilidade de células que crescem em suspensão, células TE e HL60, foi determinada após diluição da amostra com solução de azul de Tripan 1% e contagem em câmara hematocitométrica (O'Hare e Atterwill, 1995). As culturas de células aderentes foram tratadas com 0,25 %Tripsina - 0,02% EDTA (Quality Biological Inc., Walkersville, MD, EUA) e após diluição em PBS, a viabilidade da amostra foi determinada com solução azul de tripan 1% em câmara hematocitométrica. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às médias ± DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicata para cada amostra.

3.6.2. Ensaio de determinação do conteúdo protéico

As células TE (3×10^5 células mL⁻¹) foram incubadas com violaceína nas concentrações de 0,01 - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em microplacas de 96 cavidades (Corning), em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂, por 72 horas.

Após incubação das células, o conteúdo das cavidades da microplaca de cultura foi retirado cuidadosamente. À cada cavidade foram adicionados 250 μL de tampão acetato 0,001 mol L⁻¹ (tampão de lise) e a placa foi agitada durante 20 minutos. Foram adicionados em tubos de ensaio, 200 μL do volume de cada cavidade da microplaca e 2,0 mL do reagente C (50 A: 1B; onde A é carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e B é sulfato de cobre pentahidratado 0,5% em tampão tartarato de sódio 1%). Após 10 minutos, foram adicionados 200 μL do reagente de Folin (1:1 em água Milli-Q). A leitura espectrofotométrica a 660 nm foi realizada após 30 minutos de incubação (Aoyama *et al.*, 2000). Os resultados correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra.

3.6.3. Ensaio de redução de sais de tetrazólio

3.6.3.1. Ensaio de redução do MTT [3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]

Após incubação das células TE em meio RPMI 1640 completo (item 3.5.1) com violaceína (0,01 - 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 72 h, foram retirados 100 μL de sobrenadante das cavidades da microplaca de cultura e adicionados 50 μL de MTT (concentração final de 1 mg mL⁻¹). As microplacas foram incubadas por 4 horas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Este é o tempo necessário para o corante ser reduzido pelas células viáveis a um composto azul (formazan), insolúvel em água. O meio foi removido cuidadosamente e os cristais de formazan produzidos em cada poço foram solubilizados em 100 μL de etanol absoluto. As microplacas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a

cada poço determinada espectrofotometricamente a 570 nm em leitor de microplacas (Labsystems). A viabilidade das células foi estimada comparando-se os valores de absorvância das células tratadas com os valores de absorvância dos controles. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) (Denizot e Lang, 1986; Barltrop *et al.*, 1991) e correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra.

Avaliação do efeito da glutathiona reduzida (GSH) na citotoxicidade da violaceína em células HL60:

Para avaliar o efeito da glutathiona reduzida (GSH) sobre a citotoxicidade da violaceína em células HL60 foram utilizados dois protocolos de tratamento, descritos a seguir.

Protocolo 1: Células HL60 (300.000 células mL⁻¹) foram cultivadas em meio RPMI completo (item 3.5.4) contendo 5 mmol L⁻¹ de GSH (concentração final) em microplacas de 96 cavidades, em estufa úmida a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 2 horas de incubação, o sobrenadante das culturas foi removido e as células lavadas duas vezes com meio de cultura. A seguir, foram adicionados 200 μ L / cavidade de meio RPMI completo contendo violaceína (0,2 - 5,0 μ mol L⁻¹) e as placas foram incubadas por 72 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Protocolo 2: Células HL60 (300.000 células mL⁻¹) foram incubadas em microplacas contendo meio RPMI completo (item 3.5.4), GSH (5 mmol L⁻¹) e violaceína (0,2 - 5,0 μ mol L⁻¹) por 72 horas em estufa úmida a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂.

A viabilidade das células foi estimada empregando-se o ensaio de redução do MTT e comparando-se os valores de absorvância das células tratadas com os valores de absorvância dos controles. Os resultados foram expressos em

porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em triplicata para cada amostra.

3.6.3.2. Ensaio de redução do MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]

As células RENCA (5×10^4 células mL⁻¹) foram plaqueadas em meio RPMI completo (item 3.5.2) em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após remoção do meio de cultura das cavidades, adicionou-se meio fresco contendo violaceína (0,1 - 0,7 μ mol L⁻¹) em um volume total de 200 μ L / cavidade. As microplacas foram então incubadas por 24, 48 ou 72 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 10 μ L do reagente contendo o sal de tetrazólio MTS (concentração final de 317 μ g mL⁻¹; CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent, Promega, WI, EUA). Após 2 h de incubação em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂, a absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 490 nm em leitor de microplacas (Wallac-VictorTM 1420 Multilabel Counter / Perkin Elmer). O CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent contém o sal de tetrazólio MTS e um reagente acoplador de elétrons (etosulfato de fenazina; PES). O PES possui uma alta estabilidade química que permite sua combinação com o MTS, formando uma solução estável única (Barltrop *et al.*, 1991). A viabilidade das células foi estimada comparando-se os valores de absorbância das células tratadas com os valores de absorbância dos controles. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra.

As células 3LL (2,5 e 5×10^4 células mL⁻¹) foram plaqueadas em meio RPMI completo (item 3.5.2) em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após remoção do meio de cultura das cavidades, adicionou-se meio fresco contendo violaceína (0,1 - 0,9

$\mu\text{mol L}^{-1}$) em um volume total de 200 μL / cavidade. As microplacas foram então incubadas por 48 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

As células EOMA ($2,5 \times 10^4$ células mL^{-1}) foram plaqueadas em meio RPMI completo (item 3.5.2) em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após remoção do meio de cultura das cavidades, adicionou-se meio fresco contendo violaceína (0,1 - 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em um volume total de 200 μL / cavidade. As microplacas foram então incubadas por 48 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

As células HUVEC (3.000 células mL^{-1}) foram plaqueadas em meio M199 completo (item 3.5.3) em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após remoção do meio de cultura das cavidades, adicionou-se meio fresco contendo violaceína (0,1 - 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em um volume total de 200 μL / cavidade. As microplacas foram então incubadas por 72 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

A viabilidade dessas culturas de células também foi estimada empregando-se o ensaio de redução do MTS e comparando-se os valores de absorvância das células tratadas com os valores de absorvância dos controles. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em triplicata para cada amostra.

Avaliação do tipo de dano (reversível ou irreversível) ocorrido em células RENCA após tratamento com a violaceína:

Para avaliação do tipo de dano (reversível ou irreversível) ocorrido nas células RENCA após tratamento com a violaceína, as células foram plaqueadas em meio completo (item 3.5.2) na densidade de 50.000 células mL^{-1} em microplacas de 96 cavidades e incubadas por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . O meio das placas foi retirado e foram adicionados 200 μL de meio contendo violaceína em diferentes concentrações (0,1 - 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Após incubação por 24 h, o meio de cultura contendo violaceína foi

retirado, as células foram lavadas 2 vezes com meio de cultura completo e incubadas com 200 μL de meio RPMI completo por mais 24 ou 48 h. A viabilidade celular foi determinada pela redução do sal de tetrazólio (MTS) conforme descrito no protocolo anterior. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra.

Avaliação do efeito da glutathiona reduzida (GSH) na citotoxicidade da violaceína em células RENCA:

O efeito da glutathiona reduzida (GSH) sobre a citotoxicidade da violaceína em células RENCA foi avaliado utilizando-se dois protocolos. Após 24 h de incubação de células RENCA (50.000 células mL^{-1}) em meio RPMI completo (item 3.5.2) em microplacas de 96 cavidades em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 , os sobrenadantes foram removidos e as células foram submetidas aos seguintes tratamentos:

a) Após lavagem das células com meio RPMI completo, 200 μL de meio contendo 5 ou 15 mmol L^{-1} de GSH foram adicionados. Após 2 h de incubação em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 , o meio de cultura contendo GSH foi removido e as monocamadas de células foram lavadas 2 vezes com meio de cultura. A seguir, adicionou-se meio RPMI completo contendo violaceína em diferentes concentrações (0,1 - 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em um volume total de 200 μL / cavidade e as microplacas foram incubadas por 72 h nas mesmas condições já descritas.

b) Após lavagem com meio RPMI completo, as células foram incubadas por 72 h em meio RPMI completo contendo GSH (concentrações finais de 5 ou 15 mmol L^{-1}) e diferentes concentrações de violaceína (0,1 - 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em um volume total de 200 μL / cavidade, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

Em ambos tratamentos, a viabilidade celular foi determinada pela redução do MTS conforme descrito no primeiro protocolo deste item. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) e correspondem às

médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra.

3.6.4. Ensaio de determinação da atividade fosfatásica

Após incubação das células TE (3×10^5 células mL⁻¹) com a violaceína (0,01 - 12 μ mol L⁻¹) por 72h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente das cavidades da microplaca e foram adicionados 150 μ L de uma solução de *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) em tampão acetato de sódio 0,001 mol L⁻¹, pH 5,5 (1,5:28,5 - v/v). Após 30 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 150 μ L de uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹. A absorbância da solução de cada cavidade foi medida espectrofotometricamente em 405 nm. O valor de IC₅₀ para o composto foi obtido por interpolação do valor de A₄₀₅ em um gráfico de atividade fosfatásica de células tratadas em relação ao controle versus concentração do composto. Os resultados correspondem às médias \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em quadruplicata para cada amostra (Aoyama *et al.*, 2000).

3.7. AVALIAÇÃO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE PELA VIOLACEÍNA

3.7.1. Reação de Feulgen

As células TE (3×10^5 células mL⁻¹) foram tratadas em meio RPMI completo (item 3.5.1) com violaceína na concentração correspondente ao IC₅₀ (5 μ mol L⁻¹) em placas de Petri de 35 mm por 72 horas em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Células sem tratamento foram utilizadas como controle. Depois da incubação, as suspensões celulares foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. A seguir, os sobrenadantes foram removidos e o botões celulares ressuspensos em 5 mL de PBS. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e depois

centrifugadas novamente a 1000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, as células lavadas com PBS - Ca^{2+} e ressuspensas em 20 - 30 μL de PBS. As células foram depositadas em lâminas recobertas com poli-lisina e fixadas com etanol absoluto:ácido acético 3:1 (v/v) por 5 minutos. As lâminas foram transferidas para etanol 70% e depois secadas ao ar. As lâminas foram lavadas com PBS por 30 minutos e, em seguida, com água destilada. A seguir, o material foi submetido à hidrólise com HCl 4N à temperatura de 25°C durante 90 minutos. As lâminas foram mergulhadas rapidamente em NaOH 0,1 N a frio para interromper a hidrólise ácida e então, transferidas para uma câmara úmida e protegida de luz. O reagente de Schiff (Merck) foi gotejado sobre as lâminas que foram incubadas por 3 h. Após lavagem em 3 banhos de água sulfurosa (HCl 1 N, metabissulfito de sódio 10% e água destilada 1:1:18 (v/v/v)) durante 5 minutos, as lâminas foram novamente lavadas rapidamente com água destilada, secadas à temperatura ambiente, diafanizadas em xilol por 15 minutos e montadas com bálsamo do Canadá ($n_D=1,54$) (Mello, 1992).

3.7.2. Avaliação da fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose

As células HL60 foram incubadas em meio RPMI completo (item 3.5.4) com 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 12 h. Após o tratamento, as células foram transferidas para tubos de Falcon de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 600 rpm. Após lavagem das células com PBS, pH 7,4, procedeu-se a extração do DNA cromossomal conforme o procedimento descrito a seguir. Como controle negativo foram utilizadas células incubadas em meio de cultura, enquanto células tratadas com 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina foram utilizadas como controle positivo (Jakubowicz-Gil *et al.*, 2002). Em cada tubo de Falcon foram adicionados 500 μL de tampão de lise (10 mmol L^{-1} Tris, 0,2% Triton X-100, 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 8,0). Após homogeneização, os tubos foram agitados cuidadosamente e incubados em gelo por 30 minutos. As

amostras foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos Eppendorf e 800 μL de etanol absoluto gelado (-20°C) e 24 μL de NaCl 5 mol L^{-1} foram adicionados em cada amostra. Após agitação cuidadosa, as amostras foram incubadas a -70°C por 30 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm e os sobrenadantes obtidos foram descartados. A cada amostra foram adicionados 300 μL de tampão TE (10 mmol L^{-1} Tris, 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 8,0), 12,5 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 4 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após incubação em banho a 50°C por 1,5 h, adicionou-se 1 volume da mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando-se cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa das amostras foi transferida para novos tubos Eppendorf e adicionou-se 1 volume da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após agitação cuidadosa, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. As fases aquosas obtidas foram transferidas para novos tubos Eppendorf e foi adicionado 0,1 volume da solução de acetato de sódio 3 mol L^{-1} , pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C). Os tubos foram agitados cuidadosamente e incubados a -20°C por 72 horas. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes desprezados e então 200 μL de etanol 70% foram adicionados. Após 5 minutos de centrifugação a 13.000 rpm, os sobrenadantes das amostras foram descartados. Após secagem, os "pellets" foram então ressuspensos em solução TE 1X para aplicação em gel de agarose 1,5%. Utilizou-se TBE 1X (89 mmol L^{-1} Tris, 2 mmol L^{-1} EDTA, 89 mmol L^{-1} Ácido Bórico, pH 8,0) como tampão de corrida e 100 V de tensão elétrica (Zhao *et al.*, 1997).

Após a eletroforese, o gel contendo o DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em tampão TBE) e fotografado sob luz ultravioleta.

3.7.3. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina

Células TE (3×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas com violaceína ($2,0 - 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 por 72 h enquanto células HL60 (3×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas com violaceína ($0,5 - 1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 por 72 h. A fragmentação do DNA foi analisada pelo método da difenilamina descrito por Zhu *et al.* (1998) com modificações. Foram colocadas 5×10^6 células em tubos de Falcon, denominados tubos B-centrifugados, e centrifugadas a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Aos botões celulares dos tubos B adicionou-se 1 mL da solução de TTE (10 mmol L^{-1} Tris, 1 mmol L^{-1} EDTA, pH 8,0, 10% de Triton X-100), agitando-se vigorosamente em vortex. Esse procedimento permite a liberação da cromatina fragmentada do núcleo após lise da célula devido à presença de Triton X-100 na solução TTE e ruptura da estrutura nuclear após quelatação de Mg^{2+} pelo EDTA da solução TTE. Para separar o DNA fragmentado da cromatina ainda intacta, os tubos B foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram transferidos cuidadosamente para novos tubos, denominados tubos T. Aos botões celulares dos tubos B foi adicionado 1 mL de solução TTE. Aos tubos T, B e S foi adicionado 1 mL de TCA 25%, agitando-se vigorosamente em vortex. Os tubos foram mantidos 12 h a 4°C para a precipitação do DNA. A seguir, os “pellets” de DNA foram recuperados por centrifugação a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados por aspiração e o DNA foi hidrolizado adicionando-se $160 \mu\text{L}$ de TCA 5% a cada “pellet” e aquecendo-se 15 minutos a 90°C . O branco foi preparado contendo apenas $160 \mu\text{L}$ de TCA 5%. Foram adicionados em cada tubo, $320 \mu\text{L}$ de solução de difenilamina recém preparada (15 mg de difenilamina, $15 \mu\text{L}$ de ácido sulfúrico concentrado e $90 \mu\text{g}$ de acetaldeído para cada mL de volume final da solução em água Milli-Q), agitando-se vigorosamente em vortex. Após 4 horas de reação a 37°C (com desenvolvimento de coloração), duas alíquotas de $200 \mu\text{L}$ da solução colorida de cada tubo foram transferidas para uma microplaca de 96

poços. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro. A porcentagem de DNA fragmentado foi calculada usando-se a fórmula:

$$\% \text{ DNA fragmentado} = \frac{T}{T + B} \times 100$$

onde T e B são as absorbâncias a 600 nm das frações T e B, respectivamente.

3.7.4. Determinação da atividade de caspase-2 e caspase-9

A atividade de caspases foi avaliada utilizando-se kits colorimétricos de protease (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, onde X representa a seqüência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas: VDVAD e LEHD para caspase-2 e -9 respectivamente. Células TE foram incubadas por 72 horas com diferentes concentrações de violaceína (3,5 - 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Após centrifugação de 2×10^6 células para a obtenção do botão celular, as células foram lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para proteína Bio-Rad que se baseia no método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA). Neste ensaio, 200 μg de proteína foram incubadas com cada substrato X-pNA concentração final de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em uma microplaca em estufa a 37°C. A densidade óptica das amostras foi medida em comprimento de onda de 405 nm, utilizando-se como branco água Milli-Q ao invés de amostra com proteína. A atividade de caspase nas amostras foi determinada em relação ao controle não tratado.

3.7.5. Determinação da expressão de Bcl-2 por imunocitoquímica

Células HL60 foram incubadas por 12 h com violaceína ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Células HL60 não tratadas foram utilizadas como controle. Lâminas contendo as amostras celulares foram preparadas por citospin colocando-se $500 \mu\text{L}$ de suspensão celular em cada suporte de filtro citológico e centrifugando-se a 800 rpm durante 5 minutos. Primeiramente, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário para a oncoproteína Bcl-2 humana em PBS contendo 2% de albumina de soro bovino numa diluição 1:40 durante 1h. A seguir, as lâminas foram incubadas por 45 minutos em uma solução de imunoglobulina anti-rato biotinizada preparada em PBS (diluição 1:50) e com estreptoavidina conjugada com fosfatase alcalina (Dako, Massachussets, EUA) por mais 45 minutos. Entre cada incubação, as lâminas foram lavadas com TBS / Tween. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada utilizando-se o substrato cromógeno que consiste de fosfato naftol AS-MX 0,2%, dimetilformamida 2%, levamisole 0,24% e o sal Fast Red TR 0,1% em $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.1. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer. As lâminas foram montadas com glicerol (Sigma) para leitura em microscopia óptica. O número de células positivas para a oncoproteína Bcl-2 e a intensidade de coloração por meio de escala de 5 pontos foram determinadas pela contagem de pelo menos 300 células por lâmina (Maung *et al.*, 1994; Bincoletto *et al.*, 1999).

3.7.6. Marcação com anexina V/iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo

As células HL60 foram incubadas com violaceína ($0,5$, $1,0$ e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 12 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . O kit ApoDETECT™ Annexin V-FITC (Zymed Laboratories Inc., EUA) foi utilizado para a detecção por citometria de fluxo de células em apoptose. As amostras de células foram centrifugadas a 3000 rpm por 1 minuto e os sobrenadantes desprezados. As

células foram lavadas com PBS pH 7,4 gelado e após centrifugação a 3000 rpm durante 1 minuto, foram ressuspensas em tampão ligante 1X (10 mmol L⁻¹ Hepes / NaOH, pH 7,4, 140 mmol L⁻¹ NaCl, 2,5 mmol L⁻¹ CaCl₂ filtrados em membrana Millipore de 0,2 µm de poro). Foram adicionados 10 µL de Anexina V-FITC a 190 µL de suspensão celular (5 x 10⁵ céls mL⁻¹), agitando-se cuidadosamente. A mistura foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. As células foram lavadas com o Tampão ligante 1X e centrifugadas novamente a 3000 rpm durante 1 minuto. Após a retirada do sobrenadante, as células foram ressuspensas com 190 µL do Tampão ligante e foram adicionados 10 µL da solução estoque de iodeto de propídio 20 µg mL⁻¹. As amostras foram analisadas utilizando-se o aparelho FACScan Becton Dickinson (Mountain View, CA) e o programa Cell Quest, seguindo as instruções fornecidas no kit.

3.7.7. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação com o corante JC-1

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial de amostras de células foi utilizado o protocolo de marcação com o corante JC-1 (Molecular Probes Inc., OR-EUA) fornecido pelo fabricante.

Células RENCA foram incubadas com violaceína (0,2 - 0,4 µmol L⁻¹) por 4, 12, 24 e 36 horas em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Células sem nenhum tratamento foram utilizadas como controle. O volume correspondente a 5 x 10⁵ células de cada amostra de suspensão celular foi transferido para tubos de FACS e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o meio de cultura foi descartado e 100 µL de uma solução 2,5 µg mL⁻¹ do corante JC-1, diluída imediatamente antes do uso a partir de uma solução estoque (2,5 mg mL⁻¹ em DMSO) em tampão de FACS (HBSS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ contendo albumina de soro bovino (BSA) 1% e NaN₃ 1%) foram adicionados. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37°C em estufa úmida com atmosfera contendo 5% de CO₂ e em seguida, lavadas 2 vezes com tampão

de FACS. Os botões celulares foram ressuspensos em 300 μL de tampão de FACS e analisados por citometria de fluxo. Uma amostra de células controle foi submetida às mesmas etapas, mas sem a marcação com o JC-1 para seleção do gate (R1) na amostra de células. As amostras foram analisadas utilizando-se o aparelho FACScan Becton Dickinson (Mountain View, CA) e o programa Cell Quest, seguindo as instruções fornecidas no respectivo kit.

3.7.8. Determinação da atividade de caspase-3 por citometria de fluxo (FACS) após marcação intracelular

Células RENCA foram incubadas com violaceína (0,20 - 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4, 12, 24, 48 e 72 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Células sem nenhum tratamento foram utilizadas como controle. Para a determinação da atividade intracelular de caspase-3 em amostras de células foi utilizado o protocolo do kit Caspase-3 Intracellular Activity Assay Kit I (PhiPhiLux™G₁D₂) (CALBIOCHEM®, CA, EUA) fornecido pelo fabricante. O PhiPhiLux™ é um substrato peptídico da caspase-3 conjugado a 2 fluorocromos (G₁D₂). Quando o peptídeo é clivado, um intenso sinal fluorescente é obtido na região do visível. Simultaneamente, a população celular foi marcada com o corante iodeto de propídeo (PI).

As amostras foram ajustadas para a densidade de 1×10^6 células em 2-3 mL em tubos de FACS e após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, os botões celulares foram obtidos para determinação da atividade de caspase-3. Um volume de 50 μL da solução do substrato peptídico (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi adicionado a cada botão de amostra. Os tubos foram incubados abertos por 1 h em estufa úmida a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram lavadas com 1 mL do tampão de FACS. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e 0,2 mL do tampão de FACS gelado foi adicionado para a realização da citometria. As amostras foram analisadas utilizando-se o aparelho FACScan Becton

Dickinson (Mountain View, CA) e o programa Cell Quest, seguindo as instruções fornecidas no kit.

3.8. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE GSH

As células TE (3×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas com violaceína (2,0 - 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 por 72 h enquanto células HL60 (3×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas com concentrações de violaceína variando de 0,5 - 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 também por 72. Foram realizados dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Foram transferidas para tubos de Falcon 5×10^6 células de cada amostra e centrifugadas a 3.000 rpm por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 50 mL de solução fisiológica para lavagem das células. Em seguida as células foram centrifugadas por 2 minutos a 3.000 rpm e os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram ressuspensos em 2 mL de água Milli-Q para lise celular e os tubos agitados no vortex. A 2 mL do lisado celular foram adicionados 3 mL da solução de precipitação e após 5 minutos, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm durante 3 minutos.

A concentração de grupos sulfidrilas totais foi determinada pelo método de Tietze (1969) modificado, utilizando-se o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) - na reação a seguir. Em uma cubeta adicionou-se 400 μL de tampão fosfato 1 mol L^{-1} , pH 7,4, 500 μL de DTNB 0,5 mmol L^{-1} e 1,100 μL do lisado celular. Após 5 minutos de reação, a absorvância foi medida em 412 nm utilizando-se uma solução de Na_2HPO_4 0,2 mol L^{-1} como branco. A porcentagem de grupos sulfidrilas totais foi determinada em porcentagem com relação ao controle.

Soluções:

- Solução de precipitação: 100 mL de água Milli-Q contendo 1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 2 g de ácido tetracético etilenodiamina dissódico (EDTA) e 30 g de NaCl.
- Solução tampão fosfato (1 mol L^{-1}), pH 7,4.
- Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitro benzóico (DTNB) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em citrato de sódio 1%.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas de sobrevida dos animais foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal ($p < 0,05$). As metástases foram avaliadas macroscopicamente após o óbito dos animais e os resultados foram expressos em porcentagem de animais portadores de metástases classificadas segundo a intensidade por escala de 5 pontos.

Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados nos experimentos foi utilizada análise de variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos.

Os testes não paramétricos aplicados para avaliar diferenças significativas entre os protocolos experimentais no ensaio de expressão de Bcl-2 foram ANOVA de Kruskal-Wallis e teste a posteriori de comparações múltiplas de Dunn.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)

4.1.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células do tumor de Ehrlich (TE)

Quatro metodologias foram utilizadas para a avaliação da citotoxicidade (Anexo 6) da violaceína na cultura de células TE - ensaio de determinação da atividade fosfatásica, ensaio de redução do MTT e a avaliação do conteúdo protéico - fornecendo informações sobre a viabilidade celular e susceptibilidade de organelas celulares (Jones *et al.*, 1999; Rodriguez e Haun, 1999; Aoyama *et al.*, 2000).

A citotoxicidade da violaceína em cultura de células TE foi avaliada após tratamento de 72 h utilizando-se a determinação do conteúdo protéico, a redução do MTT e a determinação da atividade fosfatásica (Figura 7).

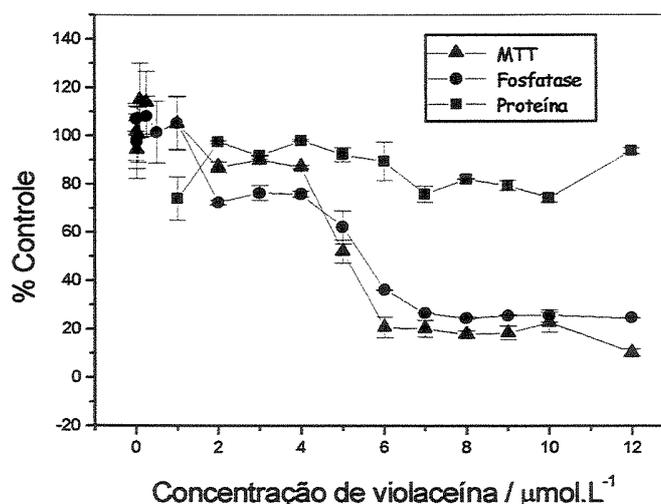


Figura 7: Citotoxicidade da violaceína em células TE (3×10^5 células mL^{-1}) após 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de determinação do conteúdo protéico, teste de redução do MTT e pelo ensaio de determinação da atividade fosfatásica. Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata.

De acordo com a figura, nos ensaios de redução do MTT e determinação da atividade fosfatásica, os resultados foram bastante concordantes, fornecendo um valor de IC_{50} de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, no ensaio de determinação do conteúdo protéico não foi possível a obtenção do valor de IC_{50} , provavelmente devido a expressão de novas proteínas em resposta ao estresse ao qual as células foram submetidas. Corroborando com essa hipótese, a avaliação da viabilidade de células TE após tratamento de 72 h com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína utilizando o método de exclusão do corante azul de tripan, revelou um índice de aproximadamente 75% de viabilidade celular, em relação ao controle (Figura 8).

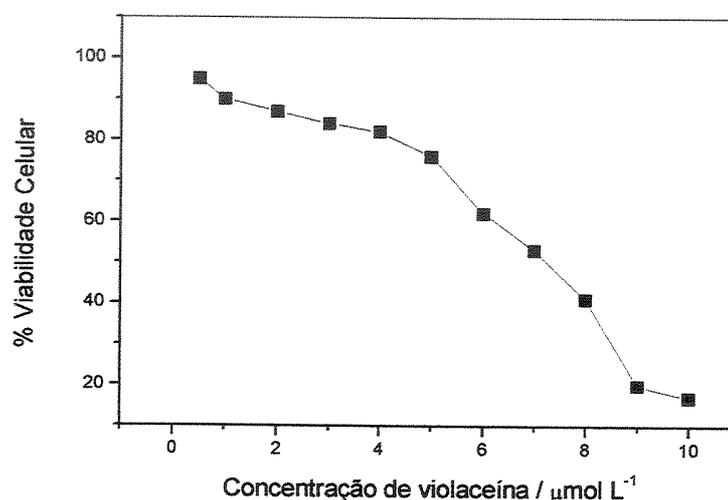


Figura 8: Efeito da violaceína sobre a viabilidade das células TE ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$) determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.1.2. Ensaio de determinação de glutathiona (GSH) (Anexo 7)

Quando as células TE foram tratadas com violaceína ($2,0 - 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 72 h e os níveis de GSH foram determinados, uma diminuição gradual foi

observada com o aumento da concentração de violaceína até o valor de $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 9).

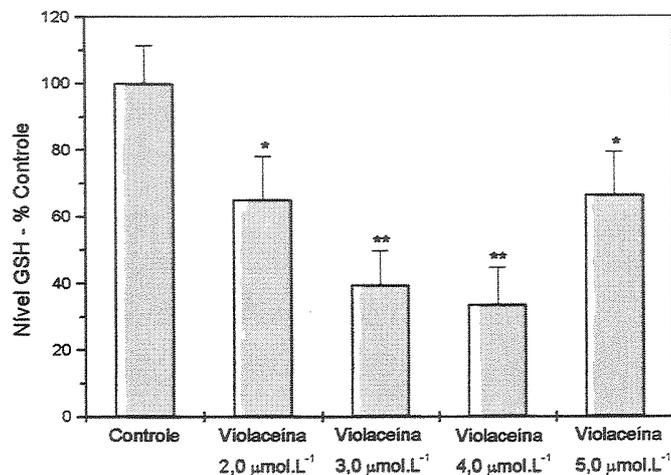


Figura 9: Variação nos níveis de GSH total de células TE (3×10^5 células mL^{-1}) tratadas com diferentes concentrações de violaceína durante 72 horas. * $p < 0,01$ em relação ao controle. ** $p < 0,01$ em relação ao controle e aos tratamentos com $2,0$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Células TE tratadas com $2,0$, $3,0$ e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína apresentaram uma redução significativa de 35, 60 e 66% nos níveis de GSH em relação ao controle ($p < 0,01$). A manutenção de uma ótima razão GSH:GSSG nas células é crítica para a sobrevivência, por isso, é imperativa uma rígida regulação do sistema. Uma deficiência nos níveis de GSH coloca a célula em risco de dano oxidativo (Schafer e Buettner, 2001; Townsend *et al.*, 2003; Klaunig e Kamendulis, 2004). Em geral, um aumento no nível de glutathiona reduzida de uma célula torna-a mais resistente a certos agentes antitumorais e também mais resistente à radiação e efeitos oxidativos. Por outro lado, uma terapia que diminui os níveis de glutathiona reduzida celular pode promover sensibilidade a certas drogas, radiação ou oxigênio. Assim, é evidente que a modulação do metabolismo da glutathiona fornece recursos para seletivamente destruir ou proteger células alvo (Moffat *et al.*,

2002; Pastore *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que o estado de oxidação dos tióis mitocondriais pode funcionar como sensores apoptóticos, regulando a transição de permeabilidade mitocondrial e a abertura de poros (Sies, 1999; Voehringer, 1999; Obrador *et al.*, 2001). Outros autores relataram ainda que a diminuição nos níveis de GSH causada por agentes químicos pode induzir a morte celular apoptótica por estresse oxidativo, ou seja, pelo desequilíbrio na relação redox GSH:GSSG (Ghibelli *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1999).

Estudos em animais portadores do TAE demonstraram uma diminuição nos níveis de GSH nas células tumorais, acompanhando o crescimento do tumor. Essa redução foi relacionada a uma diminuição na razão de proteína e de síntese de GSH (Estrela *et al.*, 1992). Uma vez que a síntese de GSH é adenosina trifosfato (ATP)-dependente, uma mudança na concentração de ATP nas células tumorais poderia explicar as mudanças nos níveis de GSH. O estudo da administração exógena de ATP em animais portadores do TAE inibiu o crescimento do tumor e diminuiu seu conteúdo de GSH. As células tumorais isoladas também apresentaram diminuição nos níveis de GSH e inibição em sua proliferação em consequência da diminuição na atividade da γ -glutamilcisteína sintetase (Lasso de La Vega *et al.*, 1994). Outro trabalho investigou a relação entre grupos sulfidrilícos celulares e a citotoxicidade de polifenóis de chá verde em células TE e também foi observada uma diminuição nos níveis de GSH associada a uma diminuição na viabilidade celular (Kennedy *et al.*, 1999). Estudos de citotoxicidade do acetato de 1'-acetoxichavicol em células TE sugeriram o envolvimento da fosforilação de resíduos de tirosinas de proteínas específicas (27 kDa), assim como, a redução de grupos sulfidrilas intacelulares nos mecanismos mediadores da morte celular (Moffat *et al.*, 2002). A atividade antitumoral e citotóxica da niidrina em animais portadores do TAE também revelou diminuição nos níveis de GSH (Qureshi *et al.*, 2000).

Diversos mecanismos como o consumo de oxigênio, sequestro de radicais livres, inibição do transporte de oxigênio, protegem as células contra danos. Dentre esses protetores estão os tióis celulares, principalmente a GSH. Considerando a vasta literatura que descreve seus efeitos anticâncer, sua ação

quimiopreventiva e a diminuição de seus níveis quando processos de peroxidação lipídica e estresse oxidativo são desenvolvidos (Pompella *et al.*, 2003; Pastore *et al.*, 2003; Townsend *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2004), acredita-se que neste experimento, a diminuição de até 60% dos níveis de GSH observada para as células TE tratadas, tenha ocorrido em decorrência do estresse oxidativo gerado pela adição da violaceína às células. O estresse oxidativo, ou seja, o desbalanço deletério no estado redox das células é dependente das quantidades relativas das formas reduzida e oxidada da glutathiona (GSH/GSSG). Assim, a determinação da concentração das duas formas nas amostras seria importante para compreender o papel da glutathiona no processo de morte das células TE induzido pela violaceína. O aumento observado para o tratamento com $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína em relação às demais concentrações é particularmente intrigante, pois, embora a redução de GSH intracelular pareça contribuir para a maquinaria de morte celular, a propensão das células TE de acumular proteínas de choque térmico sob a ação de agentes indutores de morte pode conferir sobrevivência às células e subsequente desregulação da taxa de células viáveis, ou seja, resistência à apoptose (Gabai *et al.*, 1995; Moffat *et al.*, 2002; Pastore *et al.*, 2003).

Tendo em vista os resultados obtidos até esta etapa e o fato da GSH atuar como protagonista no drama de regulação celular, a participação da GSH em processos celulares primários como a apoptose foi cuidadosamente avaliada.

4.1.3. Verificação da indução de apoptose pela violaceína em células TE - Reação de Feulgen

Por ser um processo ativo, a apoptose é caracterizada por uma seqüência bem definida de alterações morfológicas, que envolvem núcleo, citoplasma e membrana plasmática, produzindo contração da célula, reorganização nuclear e fragmentação celular. Uma característica importante da apoptose é a fragmentação do DNA. Nos estágios iniciais são produzidos fragmentos de 50 Kb e 300 Kb, provavelmente representando a cromatina separada da matriz nuclear,

os quais geralmente são seguidos por uma rápida fragmentação da dupla fita de DNA em sítios internucleossômicos (Israels e Israels, 1999; Reed, 2003; Ashe e Berry, 2003; Guimarães e Linden, 2004). A reação de Feulgen, descrita como específica para o DNA, envolve duas etapas: uma hidrólise ácida seguida da exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff, leucoderivado da fuccina básica (Mello, 1992). A apoptose das células TE foi avaliada por análise morfológica após 72 h de tratamento com violaceína (Figura 10).

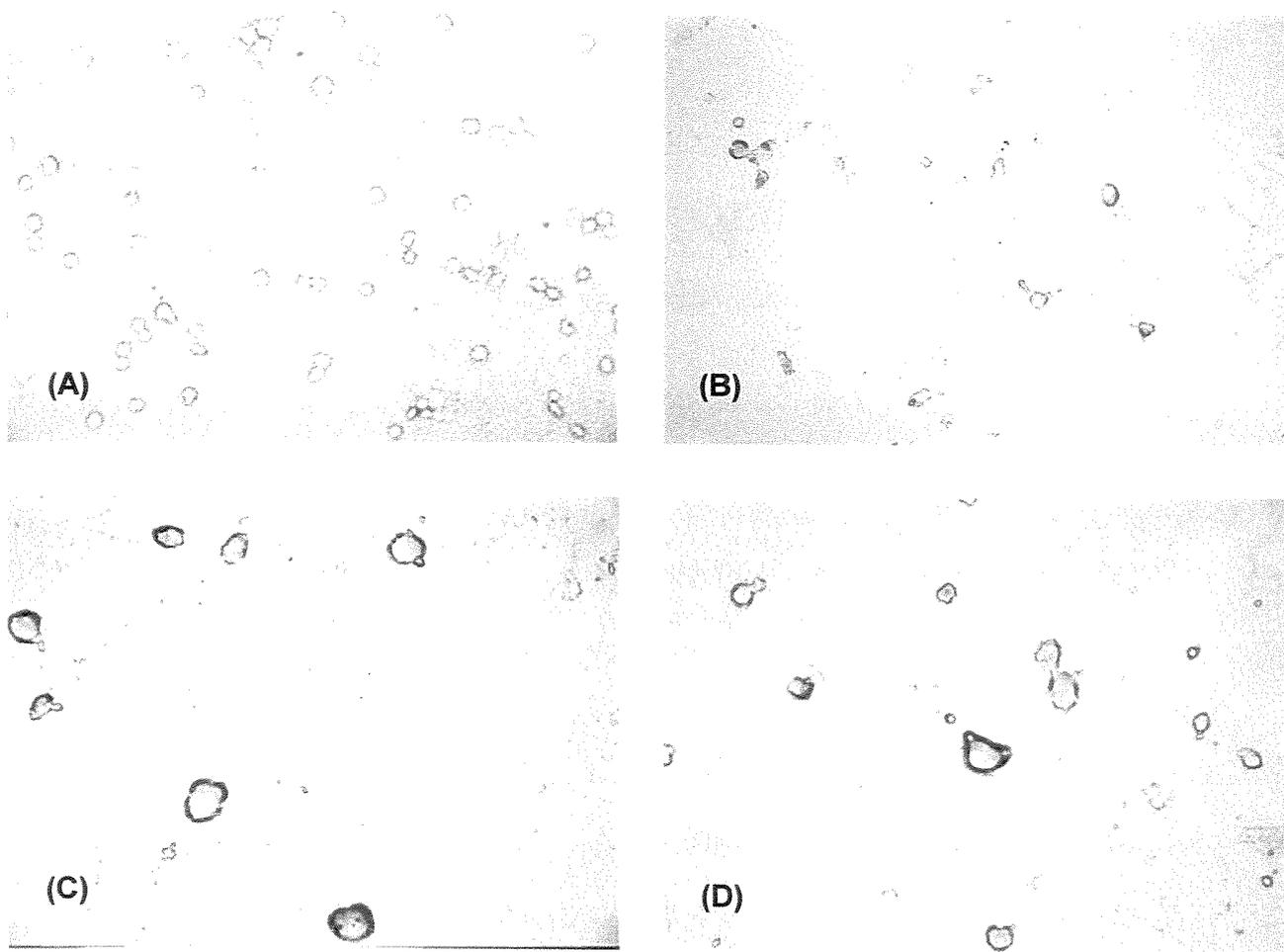


Figura 10: Células do tumor de Ehrlich submetidas à reação de Feulgen: (A) Células do tumor de Ehrlich controle (aumento de 30X), (B) Células do tumor de Ehrlich tratadas com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína por 72 h (aumento de 30X), (C) e (D) (aumento de 50X).

Pela análise morfológica das células observou-se a condensação da cromatina, com aparência esponjosa das células devido à fusão de vesículas formadas pela dilatação do retículo e da membrana nuclear, além de alterações na membrana plasmática das células, aparecendo como pequenas invaginações. Partes esféricas da membrana com aparência de brotamento também foram observadas (Figura 11).

A citotoxicidade da violaceína aliada às alterações morfológicas, típicas de processo apoptótico, observadas após o tratamento das células TE com o composto incentivaram a continuidade de experimentos para demonstrar essa habilidade e iniciar o esclarecimento do mecanismo de ação envolvido.

4.1.4. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina

O método da difenilamina permite a avaliação e quantificação da fragmentação de DNA, uma alteração reconhecível que denota a morte celular, baseado no fato do DNA dupla hélice fragmentado poder ser separado do DNA cromossomal por meio de sedimentação por centrifugação (Zhu *et al.*, 1998). A formação desses fragmentos de DNA de 300 kpb e/ou 50 kpb também pode ocorrer na ausência da formação de oligonucleossomos (Allen *et al.*, 1997; Saraste e Pulkki, 2000; Dartsch *et al.*, 2002).

Após incubação das células TE com diferentes concentrações de violaceína por 72 h, observou-se um aumento dose-dependente na fragmentação de DNA nuclear total em relação ao controle (Figura 11), indicando um processo apoptótico nesta população celular.

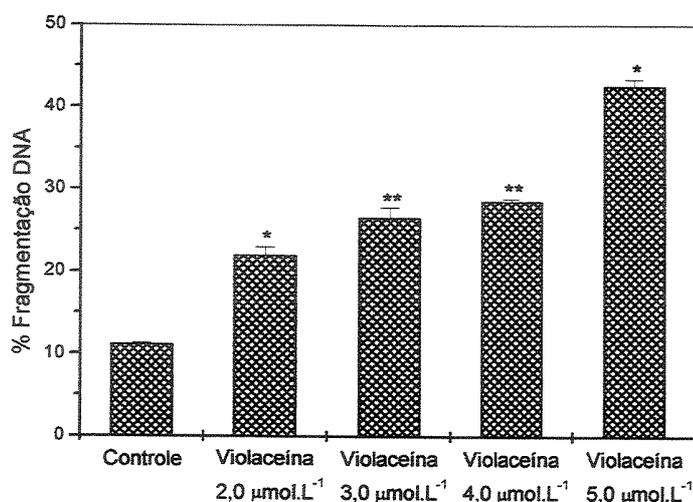


Figura 11: Valores de porcentagem de fragmentação de DNA obtidos pelo método da difenilamina para células TE (3×10^5 células mL⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína por 72 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao controle e aos tratamentos com 2,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em duplicata.

As células não tratadas apresentaram 11% de fragmentação, enquanto as células tratadas com 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína apresentaram 22, 26, 28 e 42% de fragmentação respectivamente ($p < 0,05$). Esse aumento na porcentagem de fragmentação do DNA é uma evidência bioquímica da indução do processo apoptótico nas células TE após tratamento com a violaceína.

Uma vez que a maior parte de agentes indutores de estresse oxidativo também pode induzir o processo apoptótico pela ativação de caspases, o efeito da violaceína na atividade de caspase-2 e caspase-9 de células TE foi avaliado após 72 h de tratamento.

4.1.5. Determinação da atividade de caspase-2 e caspase-9

A ativação de enzimas da família de aspartato-cisteína proteases, chamadas caspases, é um passo chave no processo apoptótico. A caspase-2 foi a primeira caspase apoptótica de mamíferos a ser identificada e sua ativação ocorre nos estágios iniciais do processo de apoptose induzido por estresse celular. A ativação da caspase-9 ocorre posteriormente embora ambas sejam consideradas caspases iniciadoras (Kumar e Vaux, 2002; Fulda e Debatin, 2003; Guimarães e Linden, 2004). Para avaliação dos efeitos da violaceína sobre as atividades das caspases -2 e -9, as células TE foram tratadas por 72 horas com diferentes concentrações de violaceína. Após o tratamento das células com $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína, os níveis de caspase-2 e caspase-9 aumentaram cerca de 2,5 vezes o valor do controle ($p < 0,01$), enquanto que as células tratadas com $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína esses valores aumentaram 4,5 vezes para a caspase-2 e 6 vezes para a caspase-9 ($p < 0,05$) (Figura 12).

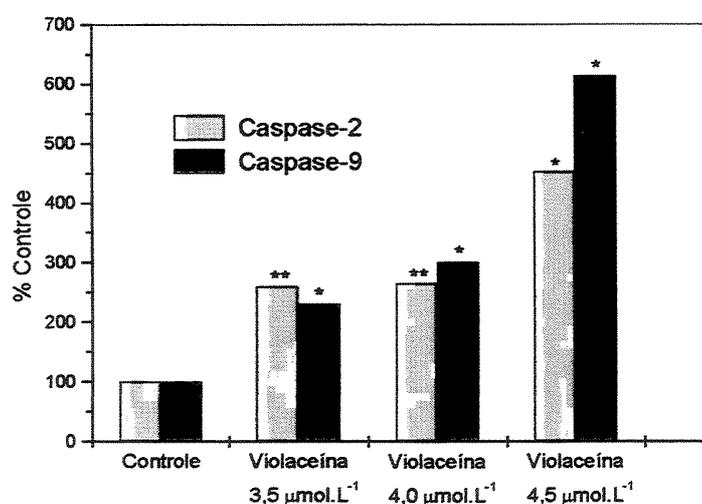


Figura 12: Alterações na atividade de caspase-2 e caspase-9 após 72 horas de incubação de células TE (3×10^5 células mL^{-1}) com diferentes concentrações de violaceína. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao controle e à concentração $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína (ANOVA, teste de Tukey). Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

As caspases por desempenharem um papel central na apoptose, constituem alvos farmacologicamente atraentes para inibição e indução de apoptose. Os níveis de atividade da caspase-2 e da caspase-9 nas células TE tratadas com violaceína apresentaram um aumento significativo (Figura 13), indicando indução do processo de apoptose nas células. Estudos da literatura sugerem que a caspase-8 e a caspase-2 atuam como caspases iniciadoras nas vias extrínsecas e a caspase-9, nas vias intrínsecas. A ativação dessas caspases iniciadoras é o primeiro passo, altamente regulado, irreversível e amplificador da via proteolítica (Kumar e Vaux, 2002; Ashe e Berry, 2003). No modelo proposto por Kumar e Vaux (2002), a via intrínseca, como a iniciada por estresse celular, induz a ativação da caspase-2 que é requerida para a permeabilização da mitocôndria, liberação do citocromo *c* e apoptose. A mitocôndria atua mais como amplificadora do que como iniciadora da atividade das caspases. Durante o processo de apoptose induzido por estresse, a mitocôndria libera citocromo *c* que se liga ao fator Apaf-1, promovendo a formação do apoptossomo e a posterior ativação da caspase-9 (Kumar e Vaux, 2002; Reed, 2003; Ashe e Berry, 2003; Guimarães e Linden, 2004). Assim, acredita-se que o aumento da atividade dessas duas caspases proporcionado pelo tratamento das células com violaceína esteja relacionado com a via mitocondrial de execução do processo apoptótico. Vale lembrar que a investigação de outras vias é necessária. Considerando a caspase-2 como um dos reguladores chaves da via apoptótica ativada pela maioria das terapias citotóxicas, é interessante notar que o aumento da atividade da caspase-2 proporcionado pelo tratamento das células com violaceína, possui um aspecto altamente positivo no sentido de contrapor o aumento da resistência de células tumorais normalmente associado à diminuição da atividade de caspase-2 (Fulda e Debatin, 2003).

Os experimentos *in vitro* realizados com as células TE tratadas com violaceína revelaram a capacidade do composto em induzir apoptose utilizando ao menos a via mitocondrial, conforme os parâmetros bioquímicos avaliados. Considerando esses indicativos e o fato do tumor de Ehrlich possuir um

comportamento bastante agressivo, a tentativa de tratamento de animais inoculados com esse tumor e tratados com violaceína tornou-se um desafio.

4.1.6. Estudo da atividade antitumoral da violaceína *in vivo* empregando-se células TE

O tumor ascítico de Ehrlich (TAE) oferece diversas vantagens como modelo tumoral experimental, sendo amplamente empregado em estudos para avaliação da atividade e mecanismo antitumoral de diferentes compostos. Para avaliação da atividade antitumoral da violaceína *in vivo*, ensaios para determinação da sobrevida de animais inoculados com TAE e submetidos ao tratamento com diferentes doses de violaceína administradas i.p. foram conduzidos. O tratamento dos animais foi realizado com doses de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 5,0, 7,5, 10 e 30 mg kg^{-1} diárias por 12 dias consecutivos após a inoculação das células tumorais. No entanto, apenas as doses de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram alteração na sobrevida dos animais, conforme resultados a seguir.

Conforme a Figura 13, um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na probabilidade de sobrevida dos animais foi observado para ambas as doses testadas. A sobrevida mediana dos animais portadores de tumor não tratados foi de 16 dias, enquanto que, o tratamento com 0,1 e 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de violaceína aumentou a sobrevida mediana dos animais para 20 e 21 dias, respectivamente.

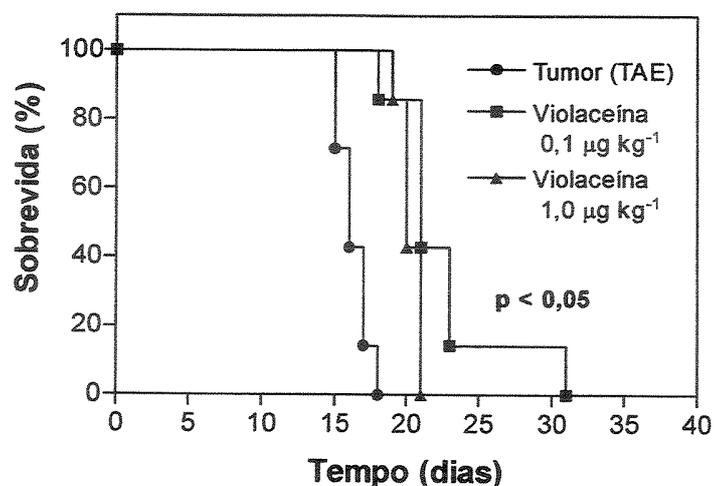


Figura 13: Sobrevida de animais inoculados com TAE e tratados com diferentes concentrações de violaceína. Camundongos BALB/c foram inoculados i.p. com 6×10^6 células TE no dia 0 e após 24 h, tratados com doses diárias i.p. de violaceína (0,2 mL) por 12 dias consecutivos. Os animais do grupo controle foram tratados apenas com 0,2 mL de veículo (PBS contendo 10% de Tween 80). As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($p < 0,05$ e $n = 10$ / grupo).

Os resultados deste experimento demonstram uma atividade antitumoral da violaceína *in vivo*, e à medida que for dada continuidade à pesquisa com a realização de mais experimentos, o composto poderá ser explorado como potencial uso na terapia do câncer.

4.2. CARCINOMA RENAL MURINO (RENCA)

4.2.1. Avaliação da viabilidade das células RENCA pelo ensaio de exclusão do azul de tripan após tratamento com violaceína

O ensaio de viabilidade estima o número de células viáveis em uma suspensão celular. O corante azul de tripan é freqüentemente utilizado para avaliação de viabilidade celular. Este corante vital, excluído por células viáveis, entra somente em células mortas, pois estas apresentam membrana celular danificada, corando o citoplasma (Eisenbrand *et al.*, 2002; Komissarova *et al.*, 2005).

As células RENCA foram tratadas com violaceína (0,1 - 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 24, 48 e 72 h. Conforme a Figura 14, o teste de exclusão de azul de tripan revelou uma diminuição na viabilidade celular dependente da concentração e do tempo de exposição à violaceína. Um maior valor de IC_{50} (0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi observado para as 24 h de incubação das células RENCA com violaceína, enquanto que valores similares (0,30 e 0,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram obtidos para os tratamentos de 48 e 72 h respectivamente. Vários fatores podem interferir na citotoxicidade de um agente químico como o tempo de exposição ao agente, o tipo e a densidade celular. O tempo de exposição (t) e a concentração do composto (C) estão relacionados, embora $C \times t$ nem sempre seja uma constante. Longos períodos de exposição podem aumentar a sensibilidade além da prevista por $C \times t$ como consequência de um efeito cumulativo do composto e também do ciclo celular (Melo *et al.*, 2000).

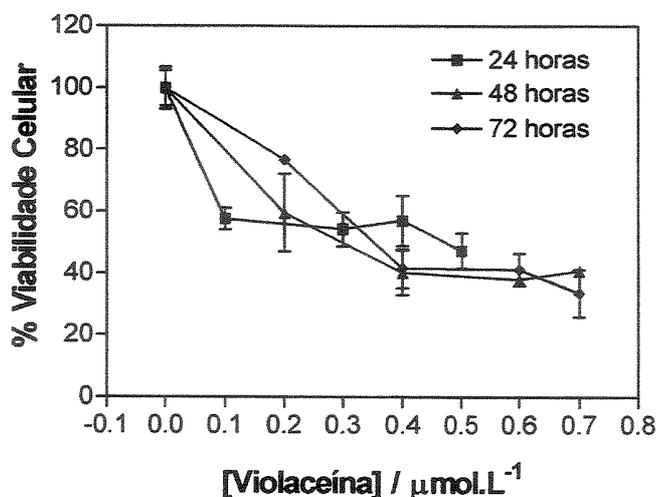


Figura 14: Efeito da violaceína sobre a viabilidade de células RENCA (50.000 células mL^{-1}) após 24, 48 e 72 h de incubação. A viabilidade das células foi determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

4.2.2. Avaliação de citotoxicidade da violaceína em células RENCA pelo Ensaio de Redução do MTS

A avaliação da citotoxicidade da violaceína em células RENCA foi realizada utilizando-se o kit colorimétrico CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Esse kit contém um sal de tetrazólio (MTS), também conhecido como reagente de Owen, que é bioreduzido a um produto colorido formazan, com a vantagem de ser solúvel no meio de cultura. A Figura 15 (A) apresenta as curvas de citotoxicidade da violaceína em células RENCA após tratamento com concentrações variadas por 24, 48 e 72 h. Independentemente do tempo de tratamento, as curvas representadas nesta figura indicam uma citotoxicidade dose-dependente da violaceína. Os valores de IC_{50} obtidos neste experimento foram de 0,35, 0,55 e 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 24, 48 e 72 h de tratamento respectivamente. Este efeito poderia ser causado por uma combinação de eventos incluindo proliferação, necrose, apoptose ou uma alteração morfológica (alteração

no citoesqueleto) suficiente para provocar o descolamento das células da superfície sem provocar necessariamente a sua morte (Melo *et al.*, 2000).

Uma vez que a redução do MTS está associada à função mitocondrial das células, apesar de alguns aspectos como os sistemas enzimáticos envolvidos ainda não terem sido completamente esclarecidos, os dados representados na Figura 15 (A) sugerem que a adição de violaceína ao meio de cultura afeta a função mitocondrial das células, como por exemplo, o transporte de elétrons, ou algum outro evento celular dependente de nucleotídeos piridínicos.

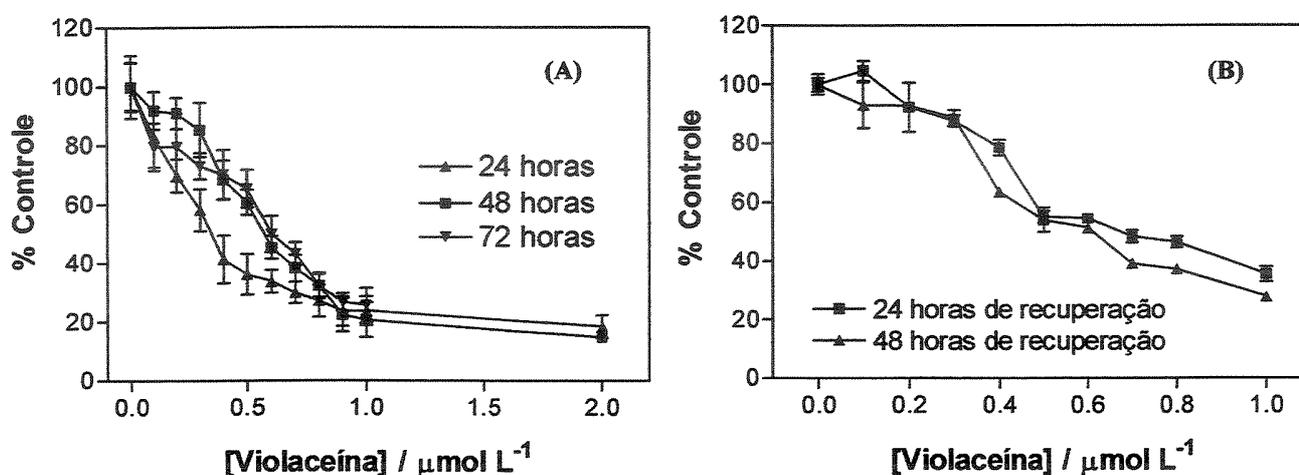


Figura 15: (A) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA ($50.000 \text{ células mL}^{-1}$) após 24, 48 ou 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. (B) Recuperação de células RENCA ($50.000 \text{ células mL}^{-1}$) após tratamento com violaceína por 24 h. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Diante desses resultados, no experimento seguinte foi avaliada a possibilidade de dano reversível às células RENCA. Assim, a monocamada de células foi tratada com diferentes concentrações de violaceína por 24 h e depois, incubada com meio de cultura livre de violaceína por mais 24 ou 48 h. Os resultados apresentados na Figura 15 (B) demonstraram que não houve recuperação das células RENCA após o tratamento com violaceína por 24 h. Os

valores de IC₅₀ obtidos neste experimento foram de 0,65 e 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 24 e 48 h de recuperação respectivamente, sugerindo dano irreversível às células. Considerando que a redução do MTS pela célula também envolve a função mitocondrial (Bartrop *et al.*, 1991; Berridge e Tan, 1993; Komissarova *et al.*, 2005), é provável que o efeito tóxico irreversível da violaceína às células tenha atingido esse componente.

Apesar desses resultados de citotoxicidade terem demonstrado um dano irreversível ao sistema mitocondrial das células RENCA ocasionado pelo tratamento com a violaceína, não foi possível determinar qual ou quais os alvos comprometidos nas mitocôndrias. A investigação da indução de estresse oxidativo pela violaceína às células RENCA foi então considerada e a avaliação do efeito da adição de glutathione (GSH), componente mais importante do sistema de defesa antioxidante celular, foi realizada.

4.2.2.1. Avaliação do efeito da adição de GSH na citotoxicidade da violaceína em células RENCA

O efeito da adição de glutathione reduzida (GSH) na citotoxicidade da violaceína às células RENCA foi avaliado quando as células foram previamente incubadas com GSH por 2 h e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de violaceína por 72 h. A GSH é um protótipo antioxidante envolvido na proteção celular contra o efeito nocivo do excesso de estresse oxidativo (Pompella *et al.*, 2003).

De acordo com a Figura 16 (A), um valor de IC₅₀ de 0,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido quando GSH foi utilizada enquanto 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido na ausência do pré-tratamento, demonstrando que a adição de GSH previamente ao tratamento com violaceína ocasionou um efeito citoprotetor, diminuindo a citotoxicidade da violaceína. Observa-se também que não houve nenhuma diferença na citotoxicidade quando as células foram pré-tratadas com 5 e 15 mmol L^{-1} de GSH.

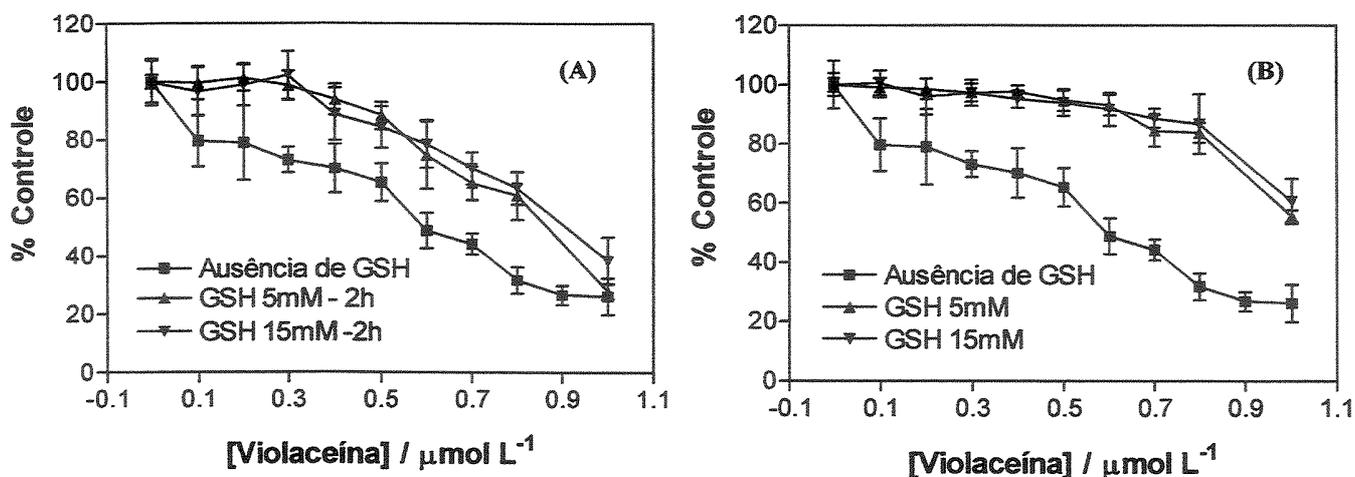


Figura 16: (A) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA ($50.000 \text{ células mL}^{-1}$) pré-tratadas com 5 e 15 mmol L^{-1} de glutathiona reduzida (GSH) por 2 h. Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com diferentes concentrações de violaceína por mais 72 h. (B) Citotoxicidade da violaceína em células RENCA após 72 h de tratamento na presença de 5 e 15 mmol L^{-1} de glutathiona reduzida (GSH). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Em outro experimento, as células RENCA foram tratadas com diferentes concentrações de violaceína na presença de GSH (5 ou 15 mmol L^{-1}) por 72 h. A Figura 16 (B) apresenta as curvas obtidas nesse experimento no qual mais uma vez, foi observado um efeito protetor da glutathiona às células. Um valor de $\text{IC}_{50} > 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi obtido para as células tratadas com violaceína na presença de GSH, enquanto as células tratadas apenas com violaceína apresentaram um valor de $0,60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, resultados similares foram obtidos para as concentrações de 5 e 15 mmol L^{-1} de glutathiona. Esses resultados sugerem que a concentração de 5 mmol L^{-1} de GSH exógena foi suficiente para alterar o balanço redox nas células.

De acordo com os gráficos da figura, obteve-se uma menor citotoxicidade quando as células foram incubadas com violaceína na presença de GSH por 72 h

(Figura 16 B) em relação às células pré-incubadas com GSH por apenas 2 h (Figura 16 A). Provavelmente, o maior período de incubação com GSH prolongou o efeito citoprotetor. Duas hipóteses foram consideradas para explicar esta observação.

A primeira hipótese considera a formação de um aduto entre GSH e violaceína. Diversos trabalhos na literatura descrevem a formação de adutos entre tióis celulares, como a GSH, e compostos indólicos, como a violaceína (Nocerini *et al.*, 1985; Regal *et al.*, 2001; Xu e Thornalley, 2001). Com base nessas informações, um experimento espectrofotométrico (UV-Vis) preliminar foi realizado com o objetivo de averiguar a possível formação de um aduto violaceína-GSH, no entanto, não foram observadas alterações nos espectros em nenhuma das condições estudadas. Estas observações sugerem que não há formação do aduto ou que sua formação depende de um ou mais fatores presentes apenas no sistema celular (Diaz e Squires, 2003). Além disso, fatores como a relação entre a concentração do composto em estudo e a concentração de GSH e a velocidade de reação entre eles, também são importantes (Folkes *et al.*, 2002).

A segunda hipótese considera a indução de estresse oxidativo pela violaceína com a consequente formação de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies podem causar dano generalizado em macromoléculas biológicas, levando à peroxidação lipídica, oxidação protéica, modificações nas bases do DNA e quebras de fitas no DNA (Ghibelli *et al.*, 1998; Voehringer *et al.*, 1999; Klaunig e Kamendulis, 2004).

Considerando que alguns autores sugerem que o estado de oxidação de tióis mitocondriais pode funcionar como um sensor apoptótico regulando a transição de permeabilidade mitocondrial e a abertura de poros (Sies, 1999; Voehringer, 1999; Kowaltowski *et al.*, 2001; Obrador *et al.*, 2001; Pompella *et al.*, 2003; Zhang e Zhao, 2003), decidiu-se avaliar o potencial de membrana em células RENCA tratadas com a violaceína.

4.2.3. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação com o corante JC-1 em células RENCA tratadas com violaceína (Anexo 8)

Neste experimento, a despolarização da membrana mitocondrial é indicada pela diminuição na razão de intensidade de fluorescência vermelho/verde (R2/R4), que depende somente do potencial de membrana (Vermes *et al.*, 2000). A avaliação da razão de fluorescência permite a comparação do potencial de membrana dentro de uma dada população celular que responde ao estímulo aplicado, neste caso, o tratamento com a violaceína.

A Tabela 1 apresenta os valores das razões R2/R4 obtidas no experimento em que células RENCA foram incubadas com concentrações de violaceína por diferentes períodos de tempo.

Tabela 1: Razões R2/R4 obtidas na avaliação do potencial de membrana em células RENCA tratadas com diferentes concentrações de violaceína por diferentes períodos de tempo:

[Violaceína] $\mu\text{mol L}^{-1}$	RAZÃO R ₂ /R ₄ *			
	Período de tratamento			
	4 horas	12 horas	24 horas	36 horas
0	2,5	8,0	3,1	2,9
0,2	—	3,7	2,4	2,1
0,3	2,3	2,7	3,5	2,6
0,4	1,7	1,8	3,3	—

* Resultados representam um experimento.

Para os períodos de 4 e 12 h de incubação das células RENCA com violaceína, observou-se uma diminuição na razão R2/R4 ($p < 0,01$) com o aumento da concentração de violaceína, indicando diminuição do potencial transmembrana mitocondrial e, portanto, despolarização da mitocôndria. Essas alterações observadas no $\Delta\Psi_m$ sugerem que a via mitocondrial está associada ao processo de indução de apoptose nas células RENCA mediado pela violaceína. Uma vez que a detecção da despolarização mitocondrial ocorre nos estágios iniciais de

apoptose, os resultados obtidos nas 24 e 36 h de avaliação, quando não foram observadas diferenças significativas entre as razões R2/R4 de amostras controles e tratadas, poderiam estar associados ao predomínio de células em apoptose tardia e necrose características do processo de morte celular avançado (Gollapudi *et al.*, 2003), ou ainda alguma outra via do processo apoptótico poderia estar mais ativa durante esses períodos.

A permeabilização da membrana mitocondrial possui um papel essencial no processo apoptótico, pois também possibilita a liberação de proteínas ativadoras de caspases que normalmente encontram-se confinadas no espaço intermembrana da mitocôndria (Sartorius *et al.*, 2001; Catteau *et al.*, 2003). Tanto os sinais apoptóticos pela via extrínseca (superfície celular) quanto pela via intrínseca (mitocondrial) podem ativar as caspases iniciais (caspase-8 e -9) levando à ativação proteolítica das caspases efetoras, incluindo a clivagem da caspase-3 (Drakos *et al.*, 2003; Masquelier *et al.*, 2004). Assim, no experimento seguinte, a atividade da caspase-3 de células RENCA tratadas com violaceína foi avaliada.

4.2.4. Determinação da atividade de caspase-3 por citometria de fluxo (FACS) após marcação intracelular em células RENCA

A ativação das caspases é um evento que ocorre nos estágios iniciais do processo apoptótico, precedendo inclusive a externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática das células. A caspase-3 é clivada em dois fragmentos, que podem formar um tetrâmero com duas subunidades heterodiméricas, constituindo a caspase-3 ativa (Drakos *et al.*, 2003; Masquelier *et al.*, 2004). Uma vez ativada a caspase-3, não existe possibilidade de as células recuperarem sua viabilidade e o programa para a morte celular é irreversivelmente ativado (Ashe e Berry, 2003; Guimarães e Linden, 2004).

A ativação de caspase-3 foi avaliada em células RENCA tratadas com violaceína (0,2 - 0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4, 12, 24, 48 e 72 h utilizando-se marcação

intracelular e análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Os valores referentes ao período de incubação de 4 h mostram um aumento gradativo na porcentagem de células RENCA que apresentaram ativação de caspase-3 após o tratamento com concentrações crescentes de violaceína. Um aumento de 4 vezes em relação ao controle foi obtido quando as células foram tratadas com $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína, sugerindo clivagem da pró-caspase-3 e indução de apoptose pela violaceína. Nota-se que para o tratamento das células com violaceína $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, a porcentagem de células exibindo atividade de caspase-3 diminuiu um pouco quando comparada com a obtida para o tratamento com $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Provavelmente nesse período de 4 h, a concentração de violaceína, acima do valor de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, possa ter induzido mecanismos moleculares diferentes de morte celular ou tenha sido demasiadamente tóxica para as células, levando à apoptose tardia ou ainda à morte celular por necrose (Das *et al.*, 1999; Masquelier *et al.*, 2004). Este mesmo efeito somente foi observado para o tratamento das células RENCA com violaceína por 12 h de incubação, mas não após 24, 48 e 72 h de exposição, ainda que nos períodos de 48 e 72 h tenham sido usadas concentrações mais elevadas de violaceína. No entanto, se avaliarmos apenas a concentração de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína para todos os períodos de incubação e calcularmos os resultados em porcentagem em relação aos controles, observamos uma maior porcentagem de células que apresentam atividade de caspase-3 nas 4h de incubação (288%) do que nos períodos de 12, 48 e 72 h, para os quais as porcentagens foram de 70, 44 e 32% respectivamente. Aliás, nesses três últimos períodos mencionados a ativação de caspase-3 foi aproximadamente igual, sugerindo que o número de células em apoptose manteve-se constante. Um outro aspecto importante é que com o aumento no período de tratamento, um maior número de células pode se encontrar no estágio de apoptose tardia ou em necrose contribuindo nos resultados obtidos.

Tabela 2: Dados de porcentagem de células RENCA apresentando atividade de caspase-3 após tratamento com violaceína*:

[Violaceína] $\mu\text{mol L}^{-1}$	% Células apresentando atividade de caspase-3*				
	Período de tratamento				
	4 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
0	0,34	0,74	0,50	0,48	1,19
0,2	0,62	0,90	0,40	—	—
0,3	1,46	1,78	0,28	—	—
0,4	1,32	1,26	0,18	0,72	1,58
0,5	—	—	—	0,44	0,96
0,6	—	—	—	0,62	0,76

* Resultados representam um experimento.

Esses resultados em conjunto com as evidências de indução de alterações no potencial de membrana mitocondrial e o fato da ativação de caspase-3 estar associada à fase de execução da apoptose, sugerem que a citotoxicidade da violaceína às células RENCA esteja relacionada à indução de apoptose pela via mitocondrial. A confirmação desta hipótese é fundamental ao se considerar que as caspases constituem alvos farmacologicamente atraentes para modulação do processo apoptótico.

Os resultados de citotoxicidade aliados aos indicativos de indução de processo apoptótico em células RENCA pela violaceína, incentivaram a realização de experimentos *in vivo* com o composto utilizando animais inoculados com células RENCA.

4.2.5. Ensaios *in vivo* utilizando as células do carcinoma renal murino (RENCA)

4.2.5.1. Experimento 1: animais inoculados intrarrenalmente (i.r.) com células RENCA e tratados intraperitonealmente (i.p.) com violaceína após nefrectomia

Neste experimento os animais foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA (dia 0) e no 11^o dia, realizou-se a nefrectomia do rim no qual as células

tumorais haviam sido injetadas. Após 24 horas, iniciou-se o tratamento i.p. dos animais com violaceína, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Na faixa de dose de violaceína estudada ($0,1 - 16 \mu\text{g kg}^{-1}$) não foram observados sintomas clínicos aparentes de toxicidade nos animais.

Conforme a Figura 17 a seguir, nenhuma alteração significativa foi observada na sobrevida dos animais inoculados com RENCA e tratados i.p. com as diferentes doses de violaceína.

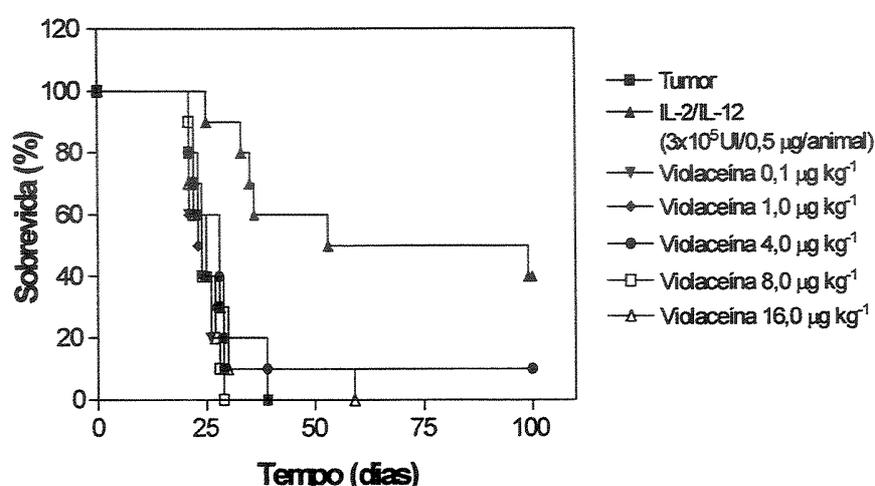


Figura 17: Sobrevida de animais inoculados com RENCA e tratados com diferentes concentrações de violaceína. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após a nefrectomia (dia 11) foram tratados com doses diárias de violaceína ($0,1 - 16 \mu\text{g kg}^{-1}$) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (rmIL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($n = 10$ / grupo).

O grupo tratado com $4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de violaceína apresentou um modesto aumento no tempo de sobrevivência dos animais sem ser, no entanto, estatisticamente diferente do controle negativo. O tratamento dos animais do grupo controle positivo com IL-2 pulso/IL-12 aumentou significativamente a probabilidade de sobrevivência dos animais, atingindo 40% de sobrevivência, conforme o esperado e já descrito na literatura (Wigginton e Wiltrout, 2002). Este protocolo de tratamento (IL-2 pulso/IL-12) vem sendo estudado em diferentes modelos pré-clínicos e apresenta um potencial promissor no tratamento de câncer renal (Portielje *et al.*, 1999; Masztalerz *et al.*, 2003).

4.2.5.2. Experimento 2: animais inoculados i.p. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA / animais inoculados subcutaneamente (s.c.) com células RENCA e tratados s.c. com P-MAPA

Os estudos anteriores de citotoxicidade do P-MAPA *in vitro* utilizando linhagens celulares tumorais mostraram que o composto não foi capaz de alterar as taxas de crescimento celular, no entanto, sua atividade foi observada em diversos experimentos *in vivo* (Durán *et al.*, 1993; Justo *et al.*, 2000, 2003).

Neste experimento, a atividade do P-MAPA foi testada em 2 modelos de inoculação das células RENCA, s.c. e i.p., e o tratamento foi realizado empregando-se a mesma via de inoculação das células tumorais respectivamente. Os animais foram inoculados s.c. ou i.p. com 1×10^5 células RENCA (dia -10 e 0 do experimento respectivamente). Somente quando os tumores dos grupos de inoculação tumoral subcutânea atingiram 5 mm de diâmetro (considerado dia 0 do experimento), os demais grupos foram inoculados i.p. com as células tumorais. O tratamento de todos os grupos iniciou no 3º dia do experimento. Para os grupos tratados com P-MAPA, o tratamento foi realizado com a dose de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$, dose ótima estabelecida em trabalhos anteriores do grupo (Justo *et al.*, 2000, 2003). Não foram observados sintomas clínicos aparentes de toxicidade nessa dose utilizada. Os animais do grupo controle positivo receberam injeções i.p. ou s.c. de

IL-12 (0,1 µg/animal). Os tratamentos foram realizados 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais.

Conforme as curvas apresentadas na Figura 18, os animais do grupo controle negativo que foram inoculados s.c. apresentaram uma sobrevida muito próxima a dos animais controle inoculados i.p. A injeção i.p. de células tumorais é usada como modelo para o tratamento de doença residual e geralmente, o tempo de sobrevida dos animais é menor comparado às inoculações s.c. e i.r. (Wiltrout, 1993). No entanto, neste experimento o tempo de sobrevida dos animais inoculados s.c. foi bem inferior aos 35-45 dias descritos na literatura (Wiltrout, 1993). Este fato pode estar associado à maior agressividade das células tumorais utilizadas para inoculação nos animais devido ao número relativamente alto da passagem entre animais doadores. O tratamento dos animais do grupo controle positivo com IL-12 propiciou uma sobrevida de 30% em ambos os tratamentos. Observou-se um aumento discreto na sobrevida dos animais tratados s.c. com P-MAPA (mediana = 27 dias) em relação ao grupo controle negativo (mediana = 23 dias), no entanto, esta alteração não foi estatisticamente significativa.

Em relação à inoculação i.p. das células tumorais, também foi observada uma sobrevida menor para o grupo controle negativo (mediana = 21 dias) do que a descrita na literatura (28-32 dias) (Wiltrout, 1993). Contudo, foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p=0,0118$) entre o tempo de sobrevida dos grupos estudados (grupo controle positivo, grupo controle negativo e grupo tratado com P-MAPA). O tratamento dos animais do grupo controle positivo com IL-12 propiciou uma sobrevida de 30%. Para o grupo tratado com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA, observou-se um tempo de sobrevida mediano de 24 dias. Embora discreto este aumento na sobrevida dos animais tratados com P-MAPA foi estatisticamente significativo ($p=0,0089$) em relação ao controle negativo. A utilização da via de administração i.p. provavelmente favoreceu a absorção do P-MAPA, uma vez que a cavidade peritoneal oferece uma grande superfície de absorção através da qual substâncias atingem mais rapidamente a circulação.

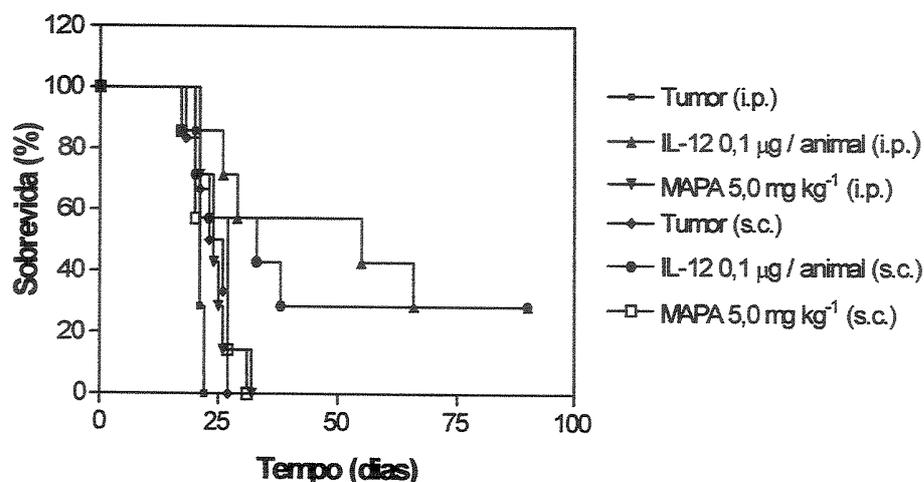


Figura 18: Sobrevivência de animais inoculados com RENCA i.p. ou s.c. e tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA i.p. ou s.c.. Camundongos BALB/c foram inoculados s.c com 1×10^5 células RENCA em $0,1 \text{ mL}$ no dia -10 e no dia 3 foram tratados com doses s.c. de P-MAPA, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais inoculados i.p. receberam 1×10^5 células RENCA em $0,1 \text{ mL}$ no dia 0 e no dia 3 iniciou-se o tratamento com doses diárias i.p. de P-MAPA em $0,2 \text{ mL}$, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento diário com IL-12, $0,1 \mu\text{g} / \text{animal}$ em $0,2 \text{ mL}$. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($n = 13 / \text{grupo}$).

Vários aspectos da resposta imunológica estão envolvidos no controle do crescimento tumoral. As células NK são uma subpopulação de linfócitos com capacidade de lisar uma ampla variedade de células tumorais na ausência de estímulos ativadores específicos (Wiltrout, 2000). O importante papel dessas células na rejeição de tumores *in vivo* e na inibição da formação de metástases está associado à produção de algumas citocinas e quimiocinas (Ortaldo e Heberman, 1984; Wiltrout, 2000; Seki *et al.*, 2003). Em função de resultados

anteriores do grupo, onde um aumento na atividade de células NK e na produção de IFN- γ em animais portadores do TAE tratados com P-MAPA foram observados (Justo *et al.*, 2003), e dos inúmeros trabalhos na literatura demonstrando a importância das células NK na inibição do crescimento do RENCA (Sayers *et al.*, 1998; Wiltrout, 2000; Smyth *et al.*, 2001; Maini *et al.*, 2003), realizou-se um ensaio preliminar concomitante ao ensaio de sobrevivência, para avaliar a atividade dessas células nos animais portadores do RENCA submetidos ao protocolo de tratamento com P-MAPA anteriormente descrito. Para isso, 3 animais de cada grupo tratado com P-MAPA e controle negativo foram sacrificados no 20º dia após a inoculação tumoral do RENCA i.p. ou s.c. e os baços foram separados em “pool” para avaliação da atividade de células NK.

A Figura 19 a seguir mostra os gráficos das variações entre as atividades das células NK do baço de animais controle e tratados. No entanto, os resultados obtidos neste ensaio não mostraram variações entre as atividades das células NK do baço de animais controle e tratados, tanto para o experimento utilizando inoculação de células tumorais e tratamento com P-MAPA via s.c. (Figura 19 A), como para o experimento utilizando a via i.p. (Figura 19 B). Porém, é importante ressaltar que a marcação das células alvo com Na₂⁵¹CrO₄ foi ineficiente, diminuindo a sensibilidade do ensaio. Além disso, fatores como amostragem inadequada (apenas uma amostra - “pool” - por grupo foi analisada) e estágio avançado da doença no momento da coleta dos baços podem ter contribuído na obtenção desses resultados. Experimentos futuros serão necessários para esclarecer o efeito do P-MAPA sobre a atividade de células NK neste modelo tumoral.

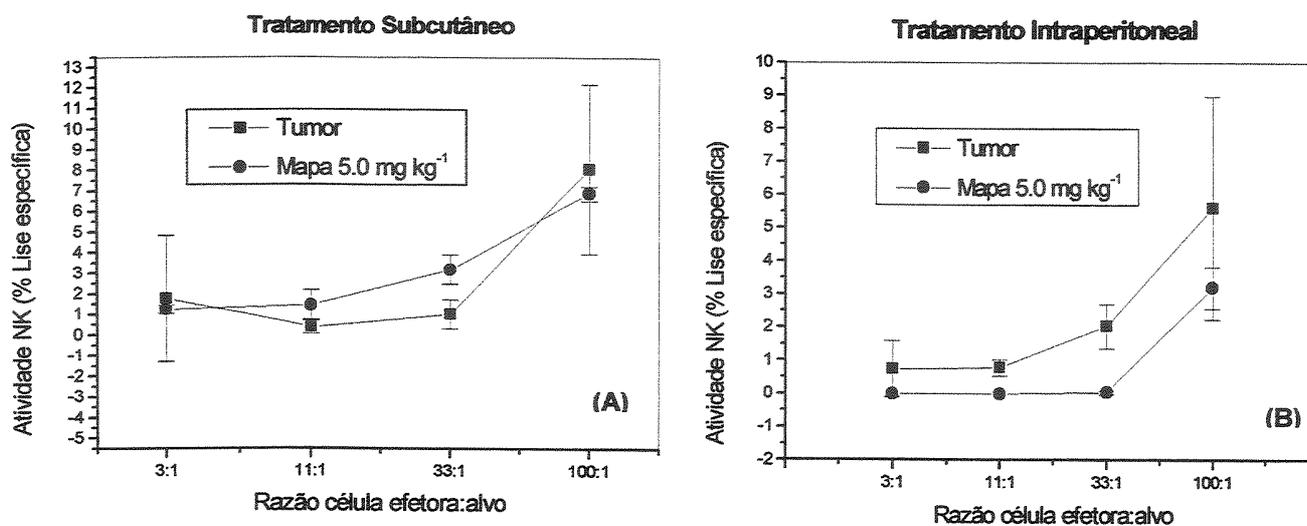


Figura 19: Atividade de células NK do baço de camundongos portadores de RENCA s.c. (Gráfico A) ou i.p. (Gráfico B) tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA, pela via s.c. ou i.p. respectivamente, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais inoculados i.p. receberam 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e no dia 3 iniciou-se o tratamento com doses diárias i.p. de P-MAPA em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. No 20^o dia após a inoculação tumoral, os baços de 3 animais por grupo foram coletados em “pool” para obtenção das células efetoras. O ensaio foi realizado em triplicata para cada razão célula efetora:célula alvo. Os resultados representam as médias \pm DP das triplicatas. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto que os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, $0,1 \mu\text{g}$ / animal em 0,2 mL ($n = 3$ / grupo).

4.2.5.3. Experimento 3: animais inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA após nefrectomia

Neste experimento utilizou-se a via i.r. de inoculação de células RENCA em camundongos e o procedimento de nefrectomia para avaliar o efeito do tratamento com P-MAPA, simulando as condições do câncer renal em pessoas. Assim, foi

utilizada uma faixa de doses de P-MAPA e não somente a dose ótima estabelecida em estudos anteriores (Justo *et al.*, 2000, 2003).

Os animais foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL (dia 0) e no 11º dia, realizou-se a nefrectomia do rim no qual as células tumorais haviam sido injetadas. No dia seguinte, iniciou-se o tratamento i.p. dos animais com doses de P-MAPA na faixa de 0,1 - 10,0 mg kg⁻¹ em 0,2 mL 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Não foram observados sintomas clínicos aparentes de toxicidade em nenhuma das doses utilizadas.

A Figura 20 a seguir apresenta as curvas de sobrevivência obtidas para as diferentes doses de P-MAPA utilizadas. O tratamento do grupo controle positivo (IL-2/IL-12) resultou em 40% de sobrevivência. Dentre as doses de P-MAPA testadas, a única dose que apresentou atividade estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p = 0,0025$) foi a de 5,0 mg kg⁻¹. Os resultados obtidos para as doses de 1,0 e 2,5 mg kg⁻¹ não foram estatisticamente diferentes do controle negativo. Esses resultados corroboram com trabalhos anteriores que descreveram como dose ótima em camundongos, a dose de 5 mg kg⁻¹ (Justo *et al.*, 2000, 2003).

Devido à realização de procedimento cirúrgico, o peso dos animais foi monitorado desde o dia que antecedeu à cirurgia (nefrectomia) até o 19º dia após a cirurgia. Enquanto os animais do grupo controle negativo não recuperaram o peso após a cirurgia, os animais tratados com as diferentes doses de P-MAPA e com IL-2/IL-12 restabeleceram seus pesos. Todos os grupos apresentaram uma maior perda de peso nos 5 dias que sucederam a nefrectomia, conforme esperado para um período pós-operatório. O grupo que apresentou menor variação de peso nesse período (0,1 % em relação ao controle) foi o grupo tratado com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA, indicando um melhor estado geral dos animais.

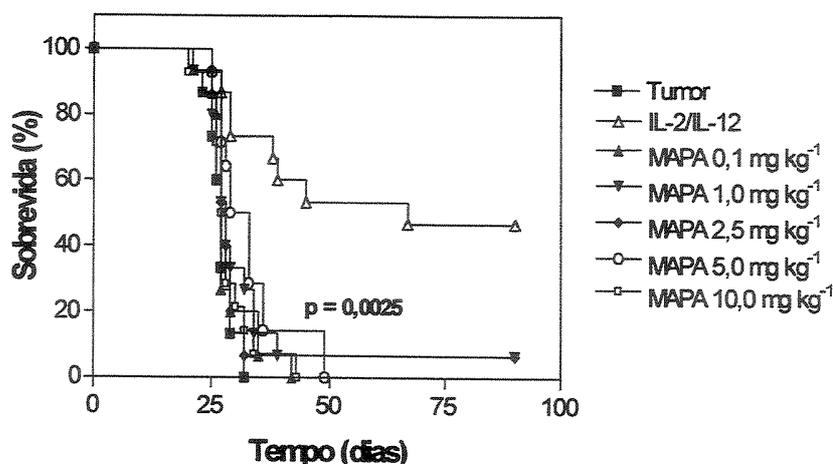


Figura 20: Sobrevida de animais inoculados com RENCA após tratamento com diferentes doses de P-MAPA. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após nefrectomia (dia 11) foram tratados com diferentes doses de P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 μ g de IL-12 recombinante murina (rmlL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($p = 0,0025$, $n = 15$ / grupo).

Após o óbito de cada animal, realizou-se necrópsia para avaliação macroscópica da distribuição de metástases em todos os animais. As metástases foram classificadas segundo a escala de 5 pontos e os resultados expressos em porcentagem de animais portadores de metástases de intensidade definida. A Tabela 3 apresenta os resultados de metástases abdominais, pulmonares e hepáticas encontradas nos animais do grupo controle negativo e do grupo tratado com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA.

Tabela 3: Análise das metástases de animais inoculados i.r. com RENCA após tratamento i.p. com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA ou solução veículo após nefrectomia.

Escala de pontos	Porcentagem de animais portadores de metástases (%)					
	Metástases abdominais		Metástases pulmonares		Metástases hepáticas	
	Controle	P-MAPA	Controle	P-MAPA	Controle	P-MAPA
-	14,30	8,30	0,00	0,00	28,57	33,33
+	14,30	8,30	0,00	33,33	71,43	50,00
++	14,30	25,00	42,86	33,33	0,00	16,67
+++	57,14	33,33	28,57	8,30	0,00	0,00
++++	0,00	25,00	28,57	25,00	0,00	0,00

De acordo com a Tabela 3, é possível observar uma redução no número de metástases hepáticas e pulmonares após a administração de 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA aos animais. No entanto, este efeito não foi observado quando foram analisadas as metástases abdominais. Ao contrário, os dados indicam um aumento no grupo tratado em relação ao grupo controle negativo. Conforme descrito na literatura, em animais não tratados não é observada a formação de nenhum tipo de metástase até o estágio II da doença (em torno do 15^o dia após inoculação do tumor). No período entre os dias 22-24 após inoculação do tumor, classificado como estágio III da doença, quase a totalidade dos animais apresenta metástases nos linfonodos abdominais. No entanto, metástases pulmonares e hepáticas só são observadas no estágio IV da doença, após 24 dias de inoculação do tumor (Salup *et al.*, 1985; 1987). Os resultados obtidos neste experimento sugerem a possibilidade do P-MAPA prevenir a formação de metástases pulmonares e hepáticas e refletir em melhora clínica dos animais em estágio avançado da doença (estágio IV).

Neste experimento também foi realizado um estudo preliminar dos níveis de citocinas séricas em animais controle e tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA. Para isto, amostras de sangue foram coletadas através do plexo retro-orbital dos camundongos nos dias 1, 2, 3, 8, 9, 10 e 14 após o início do tratamento com veículo ou P-MAPA, em grupos de 3 animais por dia para obtenção de "pools" de soro. Nestas amostras foram quantificadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, TNF- α , IFN- α e IFN- γ . Neste momento é importante

ênfatizar que os resultados desse ensaio referem-se a uma única amostra por tempo. Este procedimento justificou-se ao considerarmos que apenas uma pequena quantidade de sangue por peso corporal foi coletada dos animais alternadamente para não prejudicar o ensaio de sobrevivência. Assim, os resultados obtidos devem ser analisados com cautela.

As citocinas são glicoproteínas cruciais na comunicação entre células normais além de poderem promover a ativação de importantes funções celulares especializadas. No sistema imune, elas estão envolvidas em maturação e diferenciação de células e na ativação de suas funções, incluindo respostas contra células tumorais (Parmiani *et al.*, 2000).

A Figura 21 representa as quantificações de citocinas em amostras séricas obtidas de animais do grupo controle e do grupo tratado com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA no 1º dia de tratamento (Figura 21 A) e no 8º dia de tratamento (Figura 21 B).

A única citocina que apresentou variação significativa em relação ao controle e ao tempo de tratamento foi a IL-18. Enquanto os níveis de IL-18 no soro dos animais controles estavam abaixo do limite de detecção do método, valores iguais a 46 e 145 pg mL⁻¹ foram obtidos nas amostras de animais tratados com P-MAPA, no 1º e 8º dia respectivamente. A IL-18, conhecida também como fator de indução de IFN- γ , atua como um potente co-indutor da produção de IFN- γ e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) pelas células T, células NK, células B e macrófagos. Estudos também demonstraram que a IL-18 é um potente indutor da produção de IL-13 pelas células NK e células T (Hoshino *et al.*, 1999). A IL-18 também já foi descrita como capaz de aumentar a atividade de células NK e a expressão de Fas-L tanto em células T quanto em células NK (Hoshino *et al.*, 1999). Atividade antitumoral tem sido relatada para esta citocina, apresentando um efeito sinérgico com IL-12 sobre a ativação de células NK e polarização da resposta tipo Th1 (Hara *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 1999).

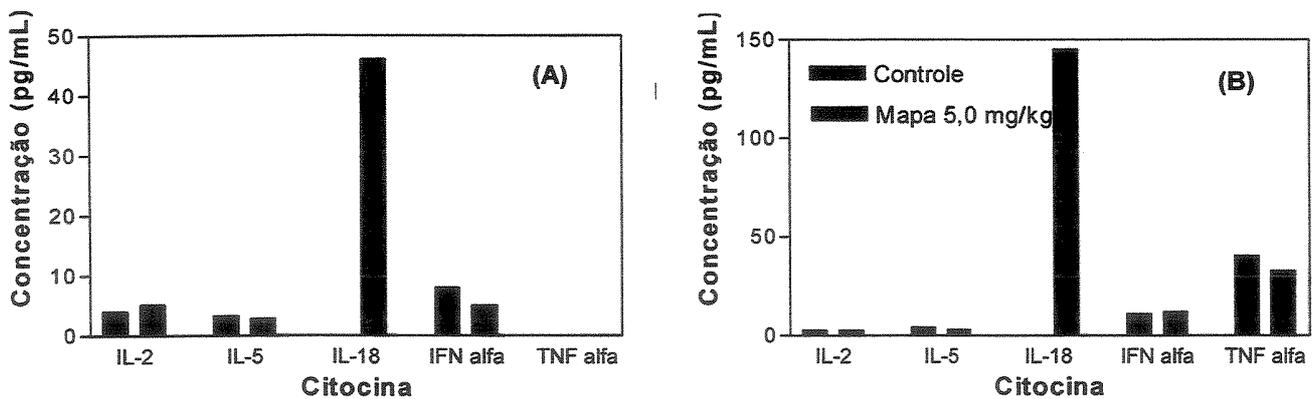


Figura 21: Níveis de citocinas séricas em camundongos BALB/c inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com 5,0 mg kg⁻¹ de MAPA. Os camundongos foram inoculados i.r. com 1 x 10⁵ células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após nefrectomia (dia 11) foram tratados com diferentes doses de P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto. Os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-2-pulso/IL-12, consistindo de 2 doses de 300.000 UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) em 0,2 mL em um único dia por ciclo e uma dose de 0,5 µg de IL-12 recombinante murina (rmIL-12) em 0,2 mL todos os dias do ciclo. Os animais (n = 3 / grupo) foram sangrados no 1º e 8º dias e as amostras analisadas como “pool”.

Apesar do aumento significativo na concentração da IL-18 e a possibilidade de sua contribuição para a ação do P-MAPA, os resultados obtidos neste experimento não são conclusivos quanto a um possível efeito do P-MAPA sobre a produção desta ou outras citocinas.

4.2.5.4. Experimento 4: animais inoculados i.r. com células RENCA e tratados i.p. com P-MAPA

Em função dos resultados obtidos no experimento anterior para a dose de 5 mg/kg de P-MAPA, outro protocolo experimental foi testado utilizando-se inoculação intrarrenal de células RENCA. Assim, 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL foram inoculadas i.r. nos camundongos e o tratamento com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA i.p. em 0,2 mL (5 vezes / semana por 3 ciclos semanais) iniciou 24 h após a inoculação das células tumorais. A nefrectomia não foi realizada e, portanto, todos os animais foram tratados com o tumor primário presente.

Conforme apresentado na Figura 22, o grupo controle positivo, tratado com IL-12, apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p=0,0048$) na probabilidade de sobrevida, que foi de 40% em relação ao controle negativo. Não foi possível observar alteração na sobrevida dos animais tratados com P-MAPA em relação ao controle negativo (mediana = 33 dias, para ambos os grupos). De acordo com Salup *et al.* (1985), a média da sobrevida de animais inoculados i.r. com células RENCA é de 46 ± 3 dias, quando a nefrectomia não é realizada. Essa discrepância na média da sobrevida observada para os animais controle negativo sugere algum equívoco no procedimento experimental com as células tumorais.

O protocolo de inoculação tumoral utilizado neste experimento revelou o desenvolvimento de uma avançada carcinomatose peritoneal e formação de metástases, devido à ausência da nefrectomia simultaneamente à progressão do tumor primário. Ainda assim, a agressividade tumoral, revelada pela morte precoce dos animais, estaria associada ao uso de células RENCA em passagem alta *in vivo*.

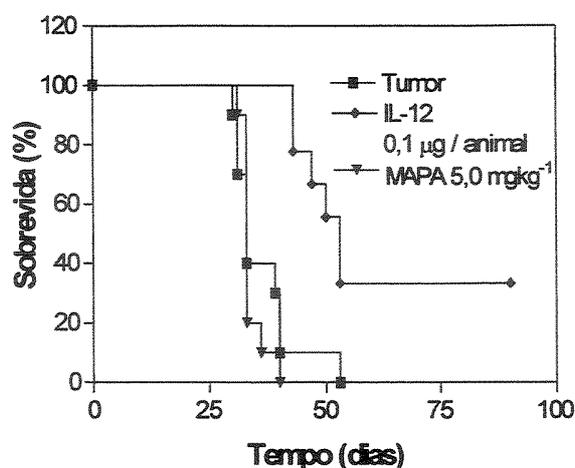


Figura 22: Sobrevida de animais inoculados com células RENCA e tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA. Camundongos BALB/c foram inoculados i.r. com 1×10^5 células RENCA em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após (dia 1) foram tratados com P-MAPA (i.p.) em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam diariamente 0,2 mL de veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, $0,1 \text{ µg / animal}$ em 0,2 mL. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($n = 10 / \text{grupo}$).

O tratamento com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA (i.p.) apresentou atividade efetiva em animais inoculados i.p. com células RENCA, aumentando significativamente a sobrevida dos animais. No entanto, não foi possível observar o mesmo para os animais inoculados s.c. com células RENCA e tratados s.c. com MAPA e nem para animais inoculados i.r. e tratados i.p. com P-MAPA. Os animais inoculados i.r. com células RENCA, submetidos a nefrectomia e ao tratamento i.p. com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de MAPA apresentaram o melhor resultado *in vivo* com este modelo, onde foi observado aumento de sobrevida e redução no número de metástases pulmonares.

4.3. CARCINOMA PULMONAR DE LEWIS (3LL)

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células do carcinoma pulmonar de Lewis pelo Ensaio de Redução do MTS

O ensaio de redução do MTS também foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da violaceína às células do carcinoma de Lewis (3LL). Apenas duas densidades de células, 25.000 e 50.000 células mL⁻¹, foram testadas para a padronização do ensaio. Apesar da menor densidade testada ainda não ser ideal devido ao rápido crescimento das células e saturação da cultura, considerou-se informativo a apresentação das curvas de citotoxicidade da violaceína obtidas nesses ensaios (Figura 23).

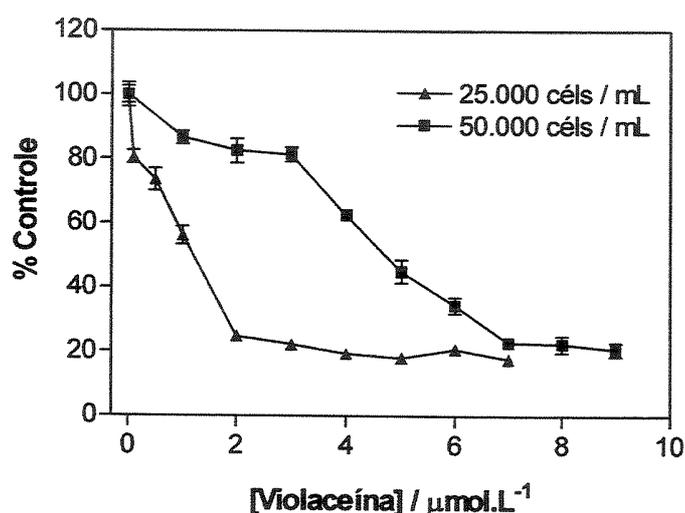


Figura 23: Citotoxicidade da violaceína em células 3LL (25.000 ou 50.000 células mL⁻¹) após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína (0,1 - 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm SD de um experimento realizado em quadruplicata para cada densidade celular.

A toxicidade da violaceína foi significativamente maior para a menor densidade de células utilizada, embora um comportamento dose-dependente

tenha sido observado nas duas densidades. Os valores de IC₅₀ obtidos para os tratamentos foram de 1,5 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para as densidades de 25.000 e 50.000 células mL^{-1} respectivamente.

4.3.2. Ensaio *in vivo* utilizando as células do carcinoma pulmonar de Lewis (3LL)

Uma vez que as metástases formadas a partir de um tumor primário constituem um grave problema no prognóstico do câncer, considerou-se interessante testar o potencial do P-MAPA em um outro modelo tumoral metastático a título comparativo. O 3LL é um importante modelo tumoral em estudos sobre o desenvolvimento de metástases, angiogênese e quimioterapia. A inoculação s.c. de células do 3LL ocasiona principalmente a formação de metástases pulmonares (Tentori *et al.*, 1995). Estas características em conjunto com os resultados obtidos na avaliação das metástases pulmonares de animais inoculados com RENCA no experimento 3 (Página 100), levou à escolha deste modelo tumoral para a realização do estudo.

A Figura 24 apresenta as curvas de sobrevida obtidas para o grupo controle negativo e para o grupo tratado. Sessenta por cento de regressão tumoral foi observada no grupo de animais tratados com 5,0 mg kg^{-1} de P-MAPA, sendo estatisticamente significativo ($p=0,005$) em relação ao controle negativo. É interessante observar que os animais do grupo tratado com 5,0 mg kg^{-1} de P-MAPA no experimento 3 (Figura 20) com células RENCA, apresentaram uma maior sobrevida e um menor número de metástases pulmonares em relação aos animais do grupo controle negativo.

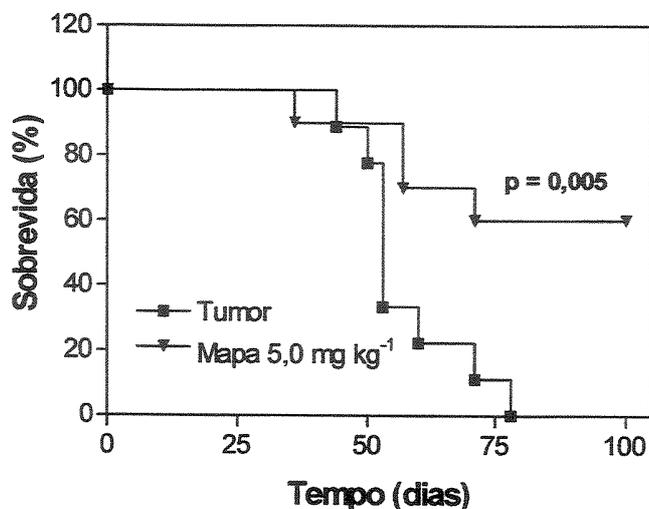


Figura 24: Sobrevivida de animais inoculados com células de 3LL e tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 1×10^5 de células de 3LL em 0,1 mL no dia 0 e 24 h após (dia 1) foram tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA em 0,2 mL, 5 vezes por semana por 3 ciclos semanais. Os animais do grupo controle negativo receberam diariamente 0,2 mL de veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos tratados com o composto, enquanto os animais do grupo controle positivo receberam tratamento com IL-12, $0,1 \mu\text{g}$ / animal em 0,2 mL. As curvas foram representadas pelo método descrito por Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Log-rank (Cox-Mantel) para procedimentos não paramétricos ($p=0,005$, $n = 10$ / grupo).

Apesar de não ser possível afirmar se o P-MAPA inibiu ou não a formação de metástases pulmonares, não há dúvidas de que este efeito merece ser investigado futuramente uma vez que a principal causa de morte em pacientes com câncer continua sendo em decorrência de processos de invasão tumoral e metástases (Shevde e Welch, 2003; Pantel e Brakenhoff, 2004), além da importante ação do composto neste modelo.

4.4. CÉLULAS ENDOTELIAIS

4.4.1. Avaliação da citotoxicidade da violaceína em células HUVEC e EOMA pelo ensaio de redução do MTS

A toxicidade da violaceína, avaliada pelo ensaio de redução do MTS, foi estudada nas duas linhagens de células endoteliais e foi utilizada a faixa de concentrações de 0,1 - 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a determinação dos valores de IC_{50} .

Para o tratamento das células EOMA (25.000 células mL^{-1}) com violaceína por 48 h, obteve-se um valor de IC_{50} igual a 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme representado na Figura 25, enquanto o valor de 1,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido para o tratamento de células HUVEC (3.000 células mL^{-1}) com violaceína por 72 h (Figura 26).

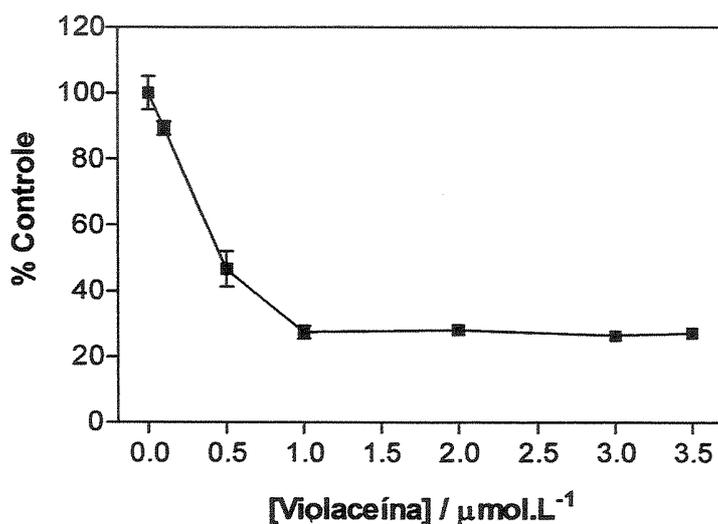


Figura 25: Citotoxicidade da violaceína em células EOMA (25.000 células mL^{-1}) após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata.

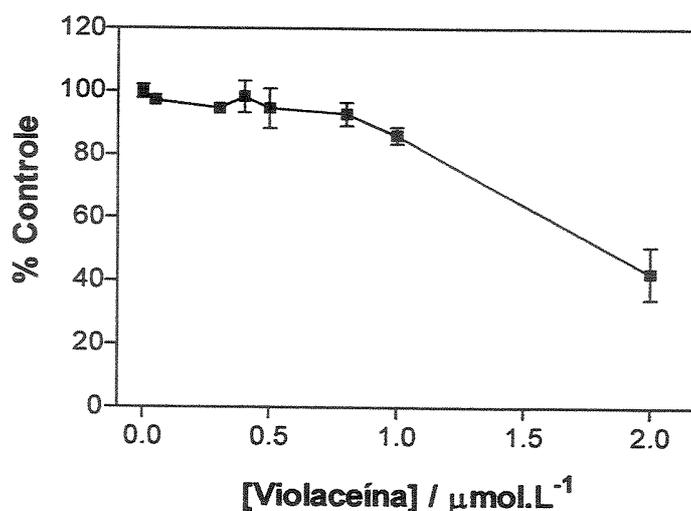


Figura 26: Citotoxicidade da violaceína em células HUVEC ($3.000 \text{ células mL}^{-1}$) após 72 h de tratamento com diferentes concentrações de violaceína. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTS e os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos realizados em quadruplicata.

Os resultados obtidos para a citotoxicidade da violaceína nas linhagens EOMA e HUVEC sugerem potencial antiangiogênico para o composto e devem ser aprofundadas em estudos futuros. Assim, seria interessante averiguar se o tratamento contínuo dessas células com baixíssimas concentrações de violaceína por um longo período de tempo, características da quimioterapia metronômica, também seriam capazes de inibir a proliferação celular.

Metronômica significa continuamente ou de maneira regular como o soar de um metrônomo. O metrônomo (etimologia grega *metron*, que significa medida + lei), é um aparato mecânico destinado a medir os compassos musicais por produzir um som obtido por um pêndulo com período ajustável de oscilação (Word Reference, 2003). A teoria da terapia metronômica, uma quimioterapia antiangiogênica, é a administração de doses bem baixas de drogas anticâncer para atacar células que sustentam os tumores pelo fornecimento de oxigênio e alimento. As doses são muito baixas para matar as células tumorais diretamente, mas altas o suficiente para interromper o crescimento dos capilares, de pequenas veias sanguíneas responsáveis pelo suprimento de nutrientes às células tumorais

(Giovanella, 2003). A base para esse efeito está relacionada à presença de células endoteliais em divisão no processo de neovascularização tumoral. Como outros tipos de células normais em divisão no hospedeiro (progenitores da medula óssea ou células dos folículos capilares), as células endoteliais seriam sensíveis aos agentes quimioterápicos convencionais, mesmo diante da resistência de células tumorais vizinhas (Kerbel, 2001; Bocci *et al.*, 2003).

4.5. CÉLULAS DA LEUCEMIA MIELOCÍTICA HUMANA (HL60)

4.5.1. Avaliação da viabilidade das células HL60 pelo ensaio de exclusão do azul de tripan após tratamento com violaceína

A viabilidade das células HL60 foi determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan após tratamento com violaceína na faixa de concentração de 0,25 - 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ durante 72 horas. O teste de exclusão de azul de tripan avalia a integridade estrutural da membrana celular.

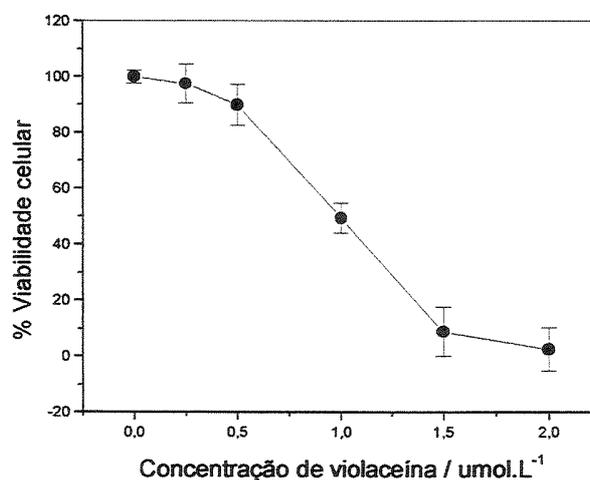


Figura 27: Efeito da violaceína sobre a viabilidade das células HL60 (300.000 células mL^{-1}) determinada pelo teste de exclusão de azul de tripan. Os resultados expressam a média \pm SD de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Na Figura 27, observa-se uma diminuição dose-dependente na viabilidade celular após o tratamento com a violaceína, fornecendo um valor de IC_{50} inferior a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, corroborando com resultados previamente obtidos utilizando-se o teste de redução do MTT (Melo *et al.*, 2000).

4.5.2. Citometria de Fluxo para avaliação de apoptose utilizando o ensaio de anexina V/iodeto de propídeo (PI)

Nesse experimento testou-se o potencial apoptogênico da violaceína nas células HL60 utilizando-se o ensaio de marcação com anexina V/PI e análise por citometria de fluxo. A anexina V é utilizada para detectar a externalização da fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática durante o processo de apoptose. A fosfatidilserina é um fosfolípido carregado negativamente e que está presente normalmente na face interna da membrana plasmática (superfície citosólica). Quando ocorre a apoptose, a simetria da membrana plasmática é rompida e a fosfatidilserina é translocada para a superfície externa da célula. Isso ocorre nos estágios iniciais de apoptose quando a membrana celular está intacta. A anexina V possui a propriedade biológica de se ligar a fosfolípidos e preferencialmente à fosfatidilserina, que normalmente não se encontra na superfície externa da membrana plasmática. Por outro lado, o processo necrótico é acompanhado pela perda da integridade da membrana celular e liberação dos constituintes celulares para o meio (Allen *et al.*, 1997; Festjens *et al.*, 2004). Assim, a avaliação da ligação da anexina V simultaneamente com um marcador de viabilidade celular (PI), permite não só a detecção precoce de células em apoptose, mas também a diferenciação entre apoptose e necrose.

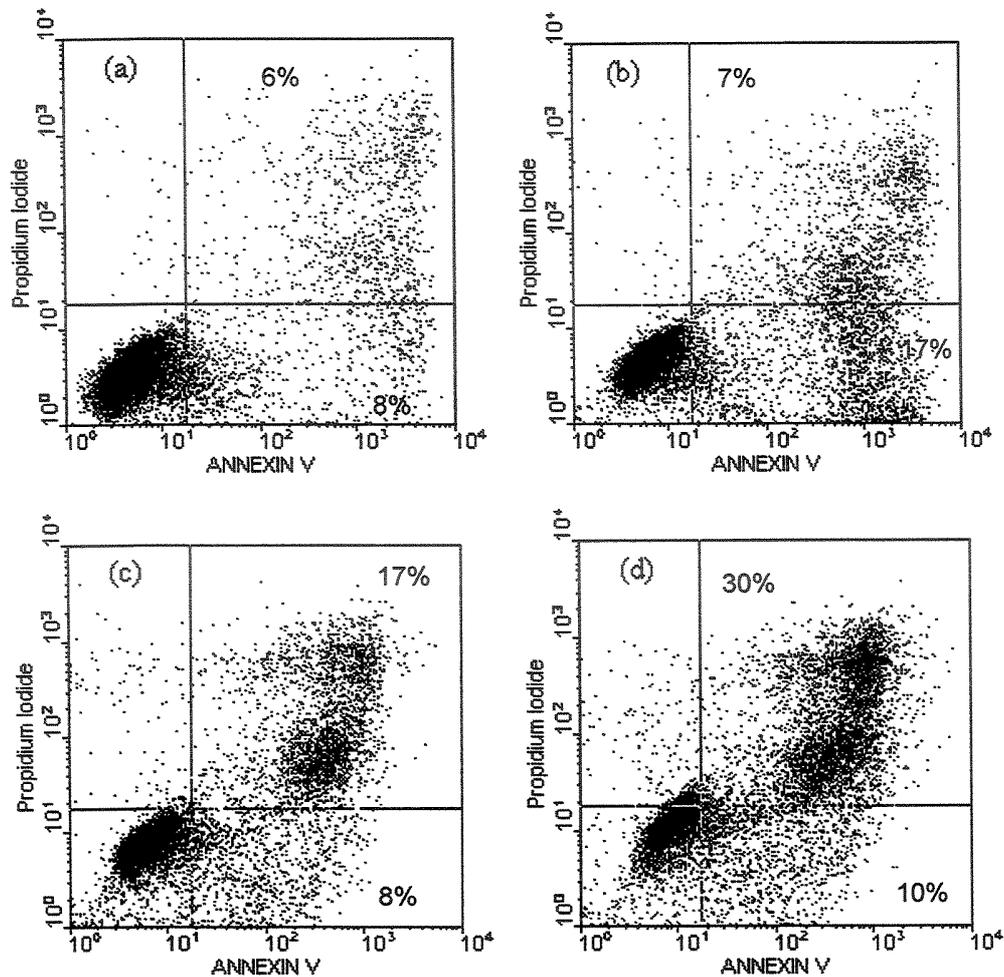


Figura 28: Citogramas obtidos após 12 horas de tratamento de células HL60 com violaceína e marcação com Anexina V / Iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo. Células HL60 controle (a) e tratadas com violaceína nas concentrações de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b), $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (c), e $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (d).

As células HL60 foram tratadas com violaceína ($0,5$, $1,0$ e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) por 12 h. Os citogramas obtidos no experimento (Figura 28) revelaram um aumento na porcentagem de células apoptóticas quando foi realizado o tratamento com $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína (18%) em relação às células não tratadas (8%). No entanto, para as células tratadas com $1,0$ e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína, a porcentagem de células em apoptose permaneceu igual ou muito próxima à porcentagem

encontrada para as células não tratadas (8 e 10% respectivamente). Para as células tratadas com a concentração de violaceína inferior a IC_{50} , ou seja, $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, foi possível verificar um aumento significativo na porcentagem de células em apoptose enquanto a porcentagem de células duplamente marcadas (7%) permaneceu constante em relação às células sem tratamento (6%). Para o tratamento das células com as concentrações de 1,0 e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína, a porcentagem de células duplamente marcadas foi de 17 e 30% respectivamente, levando a um processo apoptótico tardio e/ou necrótico. É importante lembrar que a apoptose é sempre o modo preferencial de morte celular num tratamento de câncer, pois esse processo, ao contrário da necrose, não resulta em reação inflamatória.

Uma das grandes controvérsias do processo apoptótico refere-se ao papel da ceramida produzida pela hidrólise da esfingomielina. Quando as células morrem por apoptose, uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas acontece. Essas mudanças são regidas em sua maioria pelas caspases e dentre elas pode-se destacar a perda da assimetria lipídica da membrana plasmática celular. Isto é, os lipídios estão organizadamente distribuídos na membrana plasmática, por exemplo, a fosfatidilserina encontra-se na face interna da membrana enquanto a esfingomielina encontra-se na face externa da membrana. A ocorrência desse fato deve-se à ação das translocases fosfolipídicas que mantêm a orientação de determinados lipídeos. A perda dessa assimetria pode ser monitorada pelo uso de marcação celular com anexina V, capaz de ligar-se especificamente com a fosfatidilserina, conforme descrito anteriormente. Além disso, a perda da assimetria lipídica da membrana plasmática celular também proporciona o contato da esfingomielina com o citosol, onde as esfingomielinases podem atuar hidrolisando a esfingomielina em fosfatidilcolina e ceramida (Green, 2000). A ceramida por sua vez, atua como segundo mensageiro estimulando proteínas quinases ativadas, proteínas fosfatases e proteína quinase C. A ativação dessas quinases e fosfatases leva a uma variedade de consequências biológicas como proliferação, inibição de crescimento, morte e diferenciação celular além de inflamação. A via de transdução de sinal esfingomielina-ceramida vem sendo cada

vez mais investigada no sentido de esclarecer o seu papel na indução de apoptose causada por diversos tipos de estresse exógeno. Parte do papel da ceramida na indução de apoptose é dependente da mitocôndria. Em alguns casos, essa indução pode ser prevenida por inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial. Em outros casos, ela é dependente da geração de espécies reativas de oxigênio. Outros mecanismos nos quais a ceramida pode mediar a apoptose via mitocondrial incluem a indução da liberação de citocromo *c* e inibição do complexo III da cadeia de transporte de elétrons (Perry e Hannun, 1998; Green, 2000; Chung *et al.*, 2003). Como a perda de assimetria da membrana plasmática não é mediada exclusivamente por caspases e, conseqüentemente, a hidrólise da esfingomielina e produção de ceramida também, a hipótese de contribuição desses eventos na decisão de morte celular deve ser igualmente considerada.

4.5.3. Fragmentação de DNA em gel de agarose

Como já mencionado anteriormente, durante o processo apoptótico pode ocorrer fragmentação do DNA. A indução do processo apoptótico estimula endonucleases que catalisam a quebra da dupla fita de DNA em fragmentos oligonucleossômicos (180 - 200 pb), fornecendo como resultado característico o padrão escada na eletroforese de DNA em gel de agarose (Matsumoto *et al.*, 2003; Festjens *et al.*, 2004). Para examinar a participação de apoptose na inibição do crescimento das células HL60 tratadas com violaceína, as células foram incubadas com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína por 12 horas.

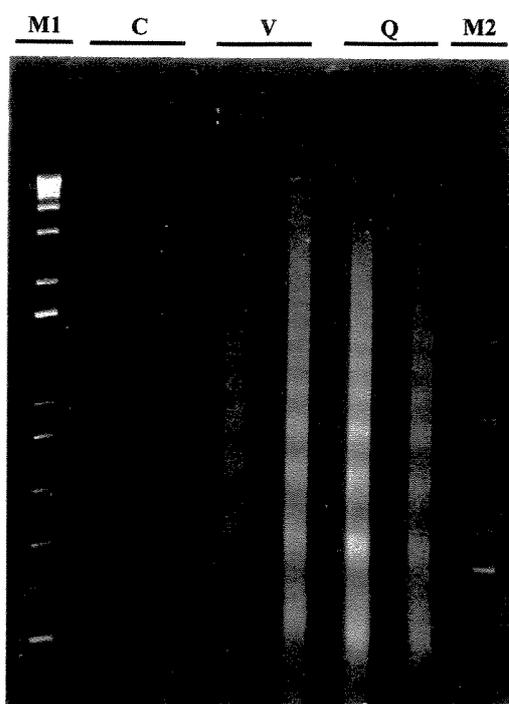


Figura 29: Fragmentação de DNA induzida pela violaceína em células HL60. Células HL60 ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$) foram incubadas com violaceína $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 12 horas. **M1:** Marcador de peso molecular (1 kb). **C:** Células não tratadas - controle negativo. **V:** Células tratadas com violaceína $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. **Q:** Células tratadas com quercetina 120 mmol L^{-1} - controle positivo. **M2:** Marcador de peso molecular (100 pb).

Conforme o gel apresentado na Figura 29, o mesmo padrão escada de fragmentação de DNA obtido para as células HL60 tratadas com quercetina (controle positivo), foi observado para o DNA de células tratadas com violaceína, confirmando a indução de apoptose pelo composto. Embora a análise da fragmentação de DNA em gel seja uma técnica confiável para distinguir apoptose de necrose, o método não é adequado para quantificar o DNA apoptótico. Assim, para confirmar e quantificar o grau de fragmentação de DNA e oferecer novas evidências bioquímicas para a indução de apoptose pela violaceína, realizou-se o ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina.

4.5.4. Ensaio de quantificação de fragmentação de DNA pelo método da difenilamina

As células HL60 foram tratadas com violaceína e incubadas por 72 h para a determinação da fragmentação de DNA pelo método da difenilamina. Conforme a Figura 30, observou-se que após incubação com 0,5, 1,0 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína, a porcentagem de fragmentação de DNA nas células HL60 aumentou 22, 55 e 61% respectivamente, em relação ao controle ($p < 0,01$).

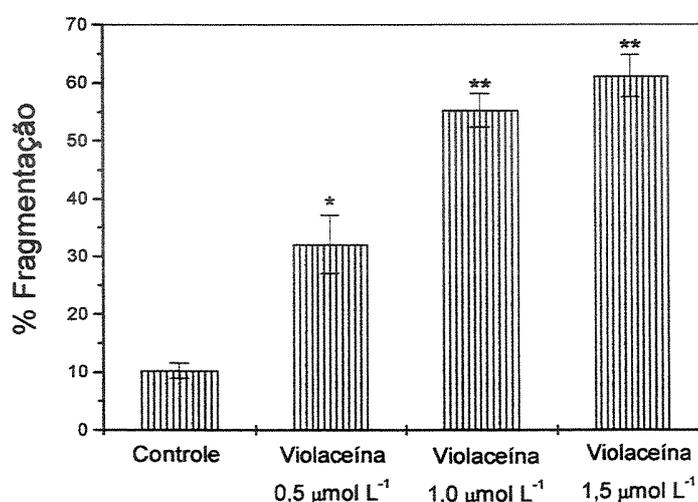


Figura 30: Porcentagens de fragmentação de DNA obtidas pelo método da difenilamina em células HL60 ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$) tratadas com diferentes concentrações de violaceína. * $p < 0,01$ em relação ao controle. ** $p < 0,01$ em relação ao controle e ao tratamento com $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ANOVA, teste de Tukey).

Esses resultados indicam que concentrações superiores à IC_{50} podem levar a um patamar de fragmentação, uma vez que os resultados obtidos para as células tratadas com 1,0 e $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, sugerindo que o processo apoptótico não aumentou.

4.5.5. Determinação da expressão de Bcl-2 (imunocitoquímica)

A susceptibilidade das células à apoptose também é regulada por uma série de genes - incluindo a família Bcl-2 que codifica uma proteína mitocondrial de 25 kD (Bcl-2) - que prolonga a sobrevivência celular suprimindo ou adiando o início do processo apoptótico. A Bcl-2 é expressa por células hematopoéticas normais e malignas (Jang e Surh, 2003; Kirkin *et al.*, 2004). Como membro da família Bcl-2 de proteínas, ela possui um papel importantíssimo para a célula no controle da via apoptótica dependente da mitocôndria. O passo regulatório da Bcl-2 culmina com a prevenção da liberação do citocromo c, que leva à formação do apoptossomo pelo recrutamento do fator Apaf-1 e à ativação da caspase-9 que é responsável pela clivagem de outras caspases (Antonsson e Martinou, 2000; Jang e Surh, 2003). O efeito da violaceína na atividade da caspase-2 e -9 já foi investigado nas células HL60, revelando um aumento de 3 e 4 vezes respectivamente após 72 h de exposição ao composto (Melo *et al.*, 2001). Considerando-se que a caspase-2 além de estar envolvida no mecanismo de indução de apoptose via receptores de morte, também é capaz de atuar diretamente na mitocôndria da célula, levando à liberação de citocromo c no citosol e dando continuidade à ativação das caspases e que a caspase-9 exerce um papel crítico como estímulo apoptótico atuando por meio da disfunção mitocondrial (Paroni *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Kumar e Vaux, 2002), o estudo da expressão da proteína Bcl-2 nas células HL60 foi interessante. É importante observar que a maior expressão de Bcl-2 pelas células malignas de pacientes com leucemia mieloide aguda está associada com uma baixa resposta à quimioterapia. Assim, os mecanismos que regulam a expressão de Bcl-2 são determinantes da sensibilidade de algumas células tumorais aos regimes terapêuticos citotóxicos (Riordan *et al.*, 1998; Araragi *et al.*, 2003; Kirkin *et al.*, 2004).

A avaliação da proteína Bcl-2 no citoplasma de células HL60 tratadas por 12 h com violaceína por imunocitoquímica demonstrou um efeito inibitório do composto sobre a expressão dessa oncoproteína (Figura 31).

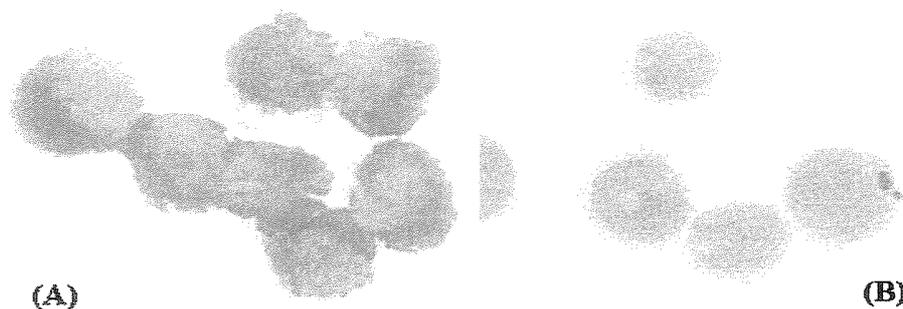


Figura 31: Influência da violaceína na expressão de Bcl-2 em células HL60 ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$). Células controle **(A)** e células tratadas 12 h com violaceína $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ **(B)** (1000X de aumento).

Após contagem das lâminas, determinou-se a porcentagem de células positivas presentes e a intensidade de coloração por meio de escala de 5 pontos. Não houve diferença estatística na intensidade de coloração entre as células controle e as células tratadas com $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína (mediana da pontuação = 3). No entanto, para as demais concentrações de violaceína $0,5$; $1,0$; $1,5$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, determinou-se as respectivas medianas de pontuação de 2, 1, 1 e 1 com $p < 0,001$ em relação ao controle e à concentração de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína (ANOVA de Kruskal-Wallis, teste de comparações múltiplas de Dunn). Essas diferenças significativas observadas nas intensidades de coloração entre as células HL60 controle e as tratadas demonstram que a modulação da expressão de Bcl-2 nas células leucêmicas está envolvida no mecanismo pelo qual o processo apoptótico é induzido pela violaceína. Este resultado reforça a hipótese de que a violaceína poderia atuar sobre diferentes alvos celulares responsáveis por determinar o destino da célula.

4.5.6. Avaliação do efeito de GSH na citotoxicidade da violaceína em células HL60

Na tentativa de explorar alterações bioquímicas que por ventura estejam ocorrendo nas células HL60 após tratamento com violaceína, avaliou-se o efeito da adição da GSH sobre a citotoxicidade da violaceína às células HL60, utilizando-se o ensaio de redução do MTT como marcador de viabilidade celular. As células HL60 foram incubadas com GSH por 2 h para depois serem tratadas com diferentes concentrações de violaceína (0,2 - 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 72 h.

A GSH adicionada ao meio de cultura das células é degradada extracelularmente e os produtos transportados e usados para a biossíntese intracelular de GSH (Xu e Thornalley, 2001). De acordo com a Figura 32 (A), uma diminuição na citotoxicidade da violaceína foi observada quando as células foram pré-tratadas com GSH 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O valor de IC_{50} obtido foi de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quando GSH foi utilizada enquanto 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido na ausência do pré-tratamento ($p < 0,01$).

Em um segundo experimento, as células HL60 foram tratadas com diferentes concentrações de violaceína na presença de GSH 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 72 h. Na Figura 32 (B) pode-se observar um efeito protetor da glutathiona às células HL60. Um valor de IC_{50} de 2,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido para a violaceína em culturas de células tratadas na presença de GSH, enquanto na ausência de GSH o valor obtido foi de 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($p < 0,01$). A hipótese considerada para tentar esclarecer essa citoproteção é a indução de estresse oxidativo pela violaceína, com a formação de espécies reativas de oxigênio. É importante ressaltar que a hipótese de formação de um aduto entre GSH e violaceína foi descartada após realização de experimentos cinéticos utilizando absorção UV-Vis, conforme esclarecido anteriormente.

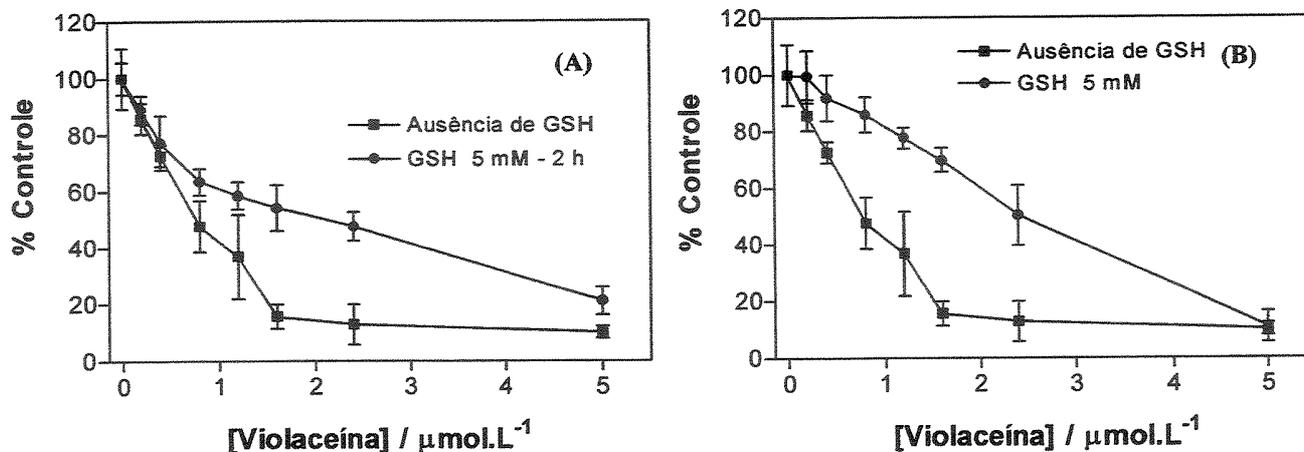


Figura 32: (A) Citotoxicidade da violaceína ($0,2 - 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em células HL60 ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$) pré-tratadas com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glutathiona reduzida (GSH) por 2 h. Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com diferentes concentrações de violaceína por mais 72 h. (B) Citotoxicidade da violaceína em células HL60 ($300.000 \text{ células mL}^{-1}$) após 72 h de tratamento na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de glutathiona reduzida (GSH). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de redução do MTT e os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Ao considerarmos a hipótese de indução de estresse oxidativo pela violaceína e a formação de espécies reativas de oxigênio, sugerimos que alterações no balanço redox celular tenham alterado de maneira dose-dependente a razão GSH:GSSG. A GSH e a GSSG são encontradas fora das células, mas geralmente em quantidades pequenas. A glutathiona extracelular age em processos de destoxificação assim como na proteção contra injúria oxidativa, mas, sua concentração é 100 a 1000 vezes menor que a de GSH intracelular. A maior parte da GSH é encontrada no citosol, principal local onde ocorre a biossíntese de GSH, podendo ser trocada com outros compartimentos intracelulares. Quando células ou tecidos são submetidos a estresse oxidativo, observa-se a exportação de GSSG para fora da célula. O estresse oxidativo resulta na formação de GSSG às custas da GSH. A mudança na razão GSH:GSSG altera o estado redox para um

potencial mais positivo. Se o potencial aumenta muito, isso certamente será prejudicial à célula. A exportação de GSSG previne essa mudança e, portanto, a habilidade para exportar GSSG é um fator importante na sensibilidade de células ao estresse oxidativo (Schafer e Buettner, 2003). Onde houver alteração nos níveis celulares de GSH, não somente a capacidade antioxidativa das células está alterada como todo o equilíbrio redox entre GSH livre e glutathiona ligada a proteínas também está alterado.

4.5.7. Ensaio de quantificação de GSH

As células HL60 (300.000 células mL⁻¹) foram tratadas com violaceína em concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 µmol L⁻¹ por períodos de 24, 48 e 72 horas. O nível de GSH total determinado após 24 h de incubação com diferentes concentrações do composto não sofreu alteração significativa, tanto em relação ao controle como entre os tratamentos com violaceína. Aparentemente, durante o período de 24 h, as células foram capazes de manter o balanço oxidativo GSH:GSSG e portanto, não houve alteração nos níveis de GSH total. Por outro lado, quando as células HL60 foram tratadas por 48 e 72 h, observamos um aumento dose-dependente significativo nos níveis de GSH total em relação aos controles (p<0,01). Conforme representado na Figura 33 (A), o tratamento de células HL60 por 48 h com 0,5 µmol L⁻¹ de violaceína aumentou cerca de 75% o nível de GSH total nas células em relação ao controle, enquanto as concentrações de 1,0 e 1,5 µmol L⁻¹ resultaram num aumento de 140 e 230% respectivamente (p<0,01).

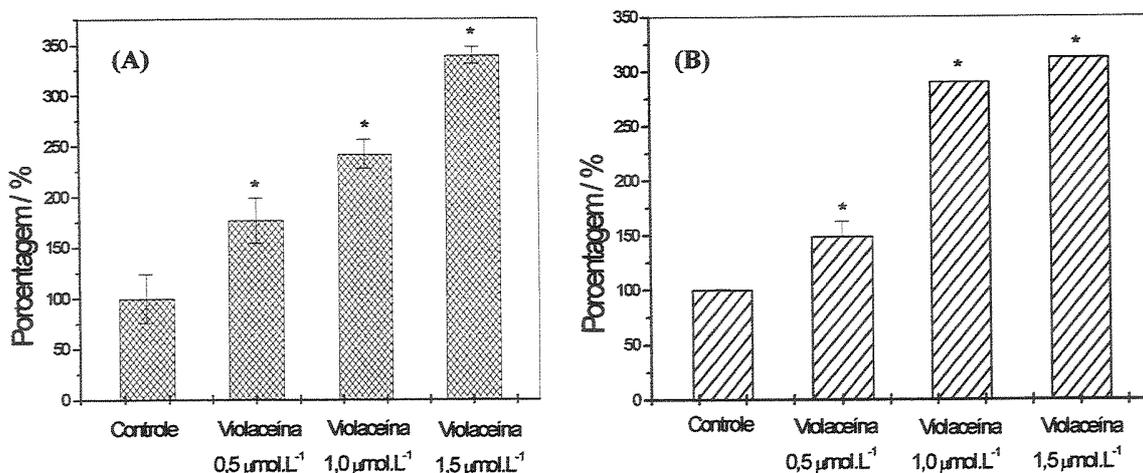


Figura 33: Variação nos níveis de GSH de células HL60 (300.000 células mL⁻¹) tratadas com diferentes concentrações de violaceína durante (A) 48 horas e (B) 72 horas. Os resultados expressam a média \pm DP de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,01$ em relação ao controle e entre os tratamentos com violaceína (ANOVA, teste de Tukey).

Na Figura 33 (B), o tratamento de células HL60 com violaceína por 72 h, aumentou os níveis de GSH total nas células de maneira similar às 48 h (Figura 33 A). Após a incubação de 72 h um aumento de 50, 180 e 220% foi observado para as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína respectivamente ($p < 0,01$). Parece razoável que a capacidade das células de contornarem o estresse oxidativo ocasionado pela violaceína após 24 h de incubação seja transitório, diminuindo com o aumento do tempo de exposição ao composto e causando, neste caso, um aumento nos níveis de GSH após este período. Apesar do efeito dose-dependente sobre os níveis de GSH ocorrer tanto nas 48 h como nas 72 h de incubação, não se observou uma correlação temporal.

Nas células, o termo glutathiona total inclui a GSH livre e todos os grupamentos de GSH ligados (a proteínas, por exemplo) (Sies, 1999; Pastore *et al.*, 2003). A glutathiona ligada representa uma quantidade considerável da GSH celular, incluindo a GSH ligada a proteínas, cujo papel parece estar relacionado com o estado redox e proliferação celular (Sies, 1999; Pompella *et al.*, 2003). Evidências experimentais documentaram que a ligação de GSH a proteínas -

processo denominado S-glutationilação protéica - ocorre em um número significativo de situações fisiológicas, onde podem modular discretamente as funções de proteínas (Pastore *et al.*, 2003; Pompella *et al.*, 2003). As proteínas podem ligar-se a GSH, cisteínas, hemocisteínas e γ -glutamil cisteína para formar dissulfetos mistos apesar da GSH ser o ligante dominante. A oxidação de uma forma tiol de uma enzima ou a redução de uma forma dissulfeto de uma enzima pode resultar na ativação ou inativação da função enzimática (Schafer e Buettner, 2003). Um número crescente de alvos tem sido identificado incluindo proteínas citosólicas e de membrana. A S-glutationilação pode afetar membros da cadeia de transdução de sinais envolvidos na proliferação celular como, por exemplo, a c-jun, NFkB/p50, fosfatase PTP1B e também proteínas cruciais da maquinaria do processo apoptótico (Pastore *et al.*, 2003; Pompella *et al.*, 2003). A partir dessas considerações, acredita-se que a violaceína tenha proporcionado um aumento no índice da glutathiona também como medida para aumentar o processo de S-glutationilação. Os resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2004) corroboram com tal sugestão uma vez que a apoptose de células HL60 após tratamento com violaceína mostrou ser precedida da ativação de alguns genes de transcrição e proteínas envolvidas na sinalização via receptor TNF. O tratamento das células HL60 com violaceína ainda levou à produção de TNF α , evento que é geralmente associado com a ativação de NFkB.

Desta maneira, o aumento de GSH observado após tratamento das células HL60 com violaceína por 48 e 72 h foi decorrente do estresse oxidativo induzido pelo composto às células. A GSH seria responsável pela diminuição da toxicidade do composto, conforme demonstrado pelos gráficos da Figura 32, ou poderia sofrer processo de S-glutationilação protéica para modular proteínas que contribuíssem para a reação celular contra o estresse oxidativo. A GSH exerce uma função muito importante na quimioterapia devido ao seu envolvimento na destoxificação de xenobióticos e por isso até vem sendo utilizada como modulador durante a terapêutica. No entanto, para algumas drogas utilizadas em quimioterapia, o aumento nos níveis de GSH celular confere resistência à droga. Esse é um tema que terá que ser explorado em experimentos futuros.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSÕES

- Os ensaios de avaliação da citotoxicidade da violaceína em células TE determinaram um valor de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a IC_{50} .
- Uma diminuição de até 60% nos níveis de GSH foi observada para as células TE tratadas com violaceína, provavelmente em decorrência do estresse oxidativo gerado pela adição do composto às células.
- A violaceína foi capaz de induzir apoptose em células TE. Foram observadas alterações morfológicas das células, indução de fragmentação de DNA de maneira dose-dependente e também aumento na atividade de caspase-2 e caspase-9. Estes resultados indicam que a via mitocondrial do processo apoptótico foi ativada.
- Os ensaios preliminares utilizando-se o TAE como modelo experimental sugeriram atividade antitumoral *in vivo* para a violaceína nas doses de 0,1 e $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.
- Os dados de citotoxicidade da violaceína em células RENCA sugeriram que o composto exerce um efeito irreversível sobre essas células. Além disso, uma menor citotoxicidade foi observada quando as células foram incubadas com GSH, previamente ou simultaneamente à adição de violaceína.
- Uma diminuição no potencial transmembrana mitocondrial e a ativação de caspase-3 foram observadas após o tratamento das células RENCA com violaceína, sugerindo a indução de apoptose como um dos mecanismos de morte celular envolvido na citotoxicidade da violaceína nessas células.
- Atividade antitumoral para o composto P-MAPA foi demonstrada quando os animais foram inoculados i.r. com células RENCA e submetidos à nefrectomia e ao tratamento i.p. com o composto. Um aumento estatisticamente significativo na sobrevivência dos animais tratados com $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de P-MAPA foi obtido em relação ao grupo controle negativo. Além disso, esses animais apresentaram um menor número de metástases pulmonares e um aumento nos níveis séricos de IL-18. Não foram observadas alterações na resposta de células NK do baço de

camundongos em experimentos utilizando-se os protocolos de inoculação de células RENCA e tratamento com P-MAPA s.c. e i.p..

- No modelo do carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), sessenta por cento de regressão tumoral foi observada no grupo de animais tratados com 5,0 mg kg⁻¹ de P-MAPA, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle negativo.
- Resultados de citotoxicidade obtidos com as linhagens endoteliais EOMA e HUVEC sugeriram um potencial efeito antiangiogênico para a violaceína.
- Um efeito citoprotetor foi observado em células HL60 quando GSH foi adicionada ao meio de cultura previa e concomitantemente à adição de violaceína, sugerindo a indução de estresse oxidativo pelo composto. As alterações nos níveis de GSH em células HL60 tratadas com violaceína sugeriram a indução de um desequilíbrio oxidativo nas células, podendo contribuir ao desencadeamento do processo apoptótico.
- Os resultados obtidos nos ensaios de fragmentação e quantificação de DNA, marcação com anexina V / PI e análise por citometria de fluxo demonstraram a indução de apoptose em células HL60 pela violaceína, sendo a via mitocondrial um dos mecanismos de morte celular conforme demonstrado pela redução na expressão da proteína Bcl-2.

5.2. PERSPECTIVAS

Dentro das perspectivas para trabalhos futuros, a continuidade da investigação dos mecanismos envolvidos no processo apoptótico induzido pela violaceína em diferentes linhagens de células tumorais é fundamental, em especial o esclarecimento da via de ativação mitocondrial e a participação de espécies reativas de oxigênio.

Considerando os resultados descritos na literatura e os obtidos nesta tese, a realização de experimentos utilizando a violaceína em modelos *in vivo* para o tratamento da leucemia é de grande importância.

Experimentos com outros protocolos de tratamento com a violaceína utilizando o modelo renal e nefrectomia devem ser estudados assim como o emprego de terapia combinada com quimioterápicos ou imunomoduladores.

A utilização do P-MAPA no tratamento de doença residual do carcinoma renal é promissora, inclusive como composto a ser empregado em terapias combinadas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que estudos sobre a atividade antitumoral do P-MAPA utilizando-se o modelo do carcinoma pulmonar de Lewis merecem maior atenção. Além disso, a investigação dos mecanismos envolvidos na ação do composto deve ser aprofundada.

O potencial antiangiogênico da violaceína deve ser explorado considerando-se a terapia metronômica. Os resultados obtidos *in vitro* nas diferentes linhagens celulares reforçam a necessidade de realização de ensaios em modelos *in vivo*, como por exemplo, no carcinoma pulmonar de Lewis, que é considerado um excelente modelo para estudos sobre o desenvolvimento de metástases e de angiogênese bem como de quimioterapia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, A., Choudhary, D., Upreti, M., Rath, P.C. e Kale, R.K.; "Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice", *Molec. Cell. Biochem.* 223: 71-80, **2001**.
- Allen, R.T., Hunter III, W.J. e Agrawal, D.K.; "Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 34: 215-228, **1997**.
- Andrighetti-Fröhner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. e Simões, C.M.O.; "Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 843-848, **2003**.
- Antonsson, B. e Martinou, J.C.; "The Bcl-2 protein family", *Exp. Cell Res.* 256: 50-57, **2000**.
- Aoyama, H., Melo, P.S., Granjeiro, P.A., Haun, M. e Ferreira, C.V.; "Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts", *Pharm. Pharmacol. Commun.* 6: 331-334, **2000**.
- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. e Sato, M.; "Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells", *Toxicology* 184: 1-9, **2003**.
- Ashe, P.C. e Berry, M.D.; "Apoptotic signaling cascades", *Prog. Neuro-psychoph.* 27: 199-214, **2003**.
- Balachandran, P. e Govindarajan, R.; "Cancer - an ayurvedic perspective", *Pharmacol. Res.* 51: 19-30, **2005**.
- Ballantine, J.A., Beer, R.J.S., Crutchey, D.J. Dodd, G.M. e Palmer, D.R.; "The chemistry of bacteria. Part VIII. The synthesis of violacein and related compounds", *J. Chem. Soc.* 459: 2292-2299, **1960**.
- Ballows, A.; *The prokariotes*, V 3, 2ª Edição, Springer-Verlag, New York Inc., New York, **1992**.
- Barile, F.A.; "Introduction to *in vitro* cytotoxicology mechanisms and methods", CRC Press, Boca Raton, Fla., **1994**.
- Bartrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G.; "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1: 611-614, **1991**.

- Bergonzini, C.; "Sopra un nuovo bacterio colorato", *Ann. Soc. Nat. Mod.* 14: 149-158, **1881**.
- Bernas, T. e Dobrucki, J.; "The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT and CTC", *Arch. Biochem. Biophys.* 380: 108-116, **2000**.
- Bernas, T. e Dobrucki, J.; "Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes", *Cytometry* 47: 236-242, **2002**.
- Berridge, M.V. e Tan, A. S.; "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction", *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474-482, **1993**.
- Bertolini, F., Mancuso, P., Gobbi, A. e Pruneri, G.; "The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis", *Exp. Hematol.* 28: 993-1000, **2000**.
- Bincoletto, C., Saad, S.T.O., Soares da Silva, E. e Queiroz, M.L.S.; "Haematopoietic response and Bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukaemia", *Eur. J. Haematol.* 62: 38-42, **1999**.
- Bocci, G., Francia, G., Man, S., Lawler, S. e Kerbel, R.S.; "Thrombospondin 1, a mediator of antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 28: 12917-12922, **2003**.
- Bradstock, K.F., Matthews, J.P., Lowenthal, R.M., Baxter, H., Catalano, J., Brighton, T., Gill, D., Eliadis, P., Joshua, D., Cannell, P., Schwarzer, A.P., Durrant, S., Gillett, A., Koutts, J., Taylor, K., Bashford, J., Arthur, C., Enno, A., Dunlop, L., Szer, J., Leahy, M., Juneja, S., e Young, G.A.R.; "A randomized trial of high-versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine", *Blood* 105: 481-488, **2005**.
- Bromberg, N.; "Biotransformação da violaceína", Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2000**.
- Bromberg, N. e Durán, N.; "Violacein transformation by peroxidase and oxidases: implications on its biological properties", *J. Molec. Cat. B Enzym.* 11: 463-467, **2001**.
- Browder, T., Butterfield, C.E., Kraling, B.M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M.S. e Folkman, J.; "Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy

- against experimental drug-resistant cancer”, *Cancer Res.* 60: 1878-1886, **2000**.
- Brown, P.D. e Whittaker, M.; “Matrix metalloproteinase inhibitors”. In Teicher, B.A. (ed.), *Antiangiogenic agents in cancer therapy*, Human Press, NJ, 205-223, **1999**.
- Butler, M.S.; “The role of natural product chemistry in drug discovery”, *J. Nat. Prod.* 67: 2141-2153, **2004**.
- Caldas, L.R.; “Photochemistry and photobiology in a virgin land”, *Photochem. Photobiol.* 26: 1-2, **1977**.
- Caldas, L.R., Leitão, A.A.C., Santos, S.M. e Tyrrell, R.M.; “Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein”, *Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol.*, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, novembro, 121, **1978**.
- Campos, V., Erazo, S. e Durán, N.; “Novos fotoprodutos com atividade antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*”, *Arq. Biol. Tecnol.* 25: 147-151, **1982**.
- Carmeliet, P.; “Angiogenesis in health and disease”, *Nature Med.* 9: 653-660, **2003**.
- Carretero, J., Obrador, E., Pellicer, J.A., Pascual, A. e Estrela, J.M.; “Mitochondrial glutathione depletion by glutamine in growing tumor cells”, *Free Rad. Biol. Med.* 29: 913-923, **2000**.
- Catteau, A., Roué, G., Yuste, V.J., Susin, S.A. e Desprès, P.; “Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation”, *Biochimie* 85: 789-793, **2003**.
- Chattopadhyay, S., Das, T., Sa, G. e Ray, P.K.; “Protein A-activated macrophages induce apoptosis in Ehrlich’s ascites carcinoma through a nitric oxide-dependent pathway”, *Apoptosis* 7: 49-57, **2002**.
- Chung, H.S., Park, S.R., Choi, E.K., Park, H.J., Griffin, R.J., Song, C.W. e Park, H.J.; “Role of sphingomyelin-MAPKs pathway in heat-induced apoptosis”, *Exp. Mol. Med.* 35: 161-188, **2003**.
- Clardy, J. e Walsh, C.; “Lessons from natural molecules”, *Nature* 432: 829-837, **2004**.
- Colwell, R.R.; “Fulfilling the promise of biotechnology”, *Biotechnol. Adv.* 20: 215-228, **2002**.

- Culo, F., Allegretti, N. e Marusic, M.; "Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors", *Oncol.* 35: 15-21, **1978**.
- Dartsch, D.C., Schaefer, A., Kolch, W. e Marquardt, H.; "Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis", *Apoptosis* 7: 537-548, **2002**.
- Darnell, J.E.; "Transcription factors as targets for cancer therapy", *Nat. Rev. Cancer* 2: 740-749, **2002**.
- Das, T., Sa, G., Sinha, P. e Ray, P.K.; "Induction of cell proliferation and apoptosis: Dependence on the dose of the inducer", *Biochem. Bioph. Res. Co.* 260: 105-110, **1999**.
- De Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L. e Lopes, M.T.P.; "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução", *Quim. Nova* 28: 118-129, **2005**.
- De Azevedo, M.B.M., Alderete, J., Rodriguez, J.A, Souza, A.O., Rettori, D., Torsoni, M.A., Faljoni-Alario, A., Haun, M. e Durán, N.; "Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin", *J. Incl. Phen. Macr. Chem.* 37: 93-101, **2000**.
- De Souza, A., Aily, D.C.G., Sato, D.N. e Durán, N.; "Atividade da Violaceína *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RA", *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 58: 59-62, **1999**.
- De Souza, M.V.N.; "Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer", *Quim. Nova* 27: 308-312, **2004**.
- Denizot, F. e Lang, R.; "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *J. Immunol. Methods* 89: 271-277, **1986**.
- Diaz, G.J. e Squires, E.J.; "Phase II *in vitro* metabolism of 3-methylindole metabolites in porcine liver", *Xenobiotica* 33: 485-498, **2003**.
- Doki, Y., Murakami, K., Yamamura, T., Sugiyama, S., Misaki, T. e Saiki, I.; "Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice", *Br. J. Cancer* 79: 1121-1126, **1999**.

- Doyle, B.T., O'Neill, A.J., Fitzpatrick, J.M. e Watson, R.W.G.; "Differentiation-induced HL60 cell apoptosis: A mechanism independent of mitochondrial disruption?", *Apoptosis* 9: 345-352, **2004**.
- Drakos, E., Rassidakis, G.Z., Lai, R., Herling, M., O'Connor, S.L., Schmitt-Gaeff, A., McDonnell, T.J. e Medeiros, L.J.; "Caspase-3 activation in systemic anaplastic large-cell lymphoma", *Modern Pathol.* 16: 1-8, **2003**.
- Drexler, H.G., Quentmeier, H., MacLeod, R.A.F., Uphoff, C.C. e Hu, Z.B.; "Leukemia cell lines: *in vitro* models for the study of acute promyelocytic leukemia", *Leukemia Res.* 19: 681-691, **1995**.
- Durán, N., Antônio, R.V., Haun, M. e Pilli, R.A.; "Biosynthesis of a Trypanocide of *Chromobacterium violaceum*", *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 686-689, **1994**.
- Durán, N., Campos, V., Riveros, R., Joyas, A., Pereira, M.F. e Haun, M.; "Bacterial Chemistry-III: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of *Chromobacterium violaceum* products", *An. Acad. Bras. Ciências* 61: 31-36, **1989**.
- Durán, N., Erazo, S. e Campos, V.; "Bacterial Chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*", *An. Acad. Bras. Ciências* 55: 231-234, **1983**.
- Durán, N. e Faljoni-Alario, A.; "Bacterial Chemistry-I: Studies of a potential phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*", *An. Acad. Bras. Ciências* 52: 297-302, **1980**.
- Durán, N. e Haun, M.; "Trypanocide. State of art"; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Suppl. 186: 29-30, **1991**.
- Durán, N. e Haun, M.; "Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-dihidro - 5- (5-hidroxi-1H-indol-3-il) - 2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno] - 1,3-dihidro -2H -indol-2-ona", Patente Brasileira PI9702918, **1997**.
- Durán, N., Haun, M., Pereira da Silva, L., Pisani, R., Pisani, F.J.C., Souza-Brito, A.R.M., Mazetto, M.N. e Nunes, O.D.S.; "Comparison of the antiviral activity and toxicity of the protein magnesium ammonium phospholipoleate anhydride polymer with other antiviral drugs", *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 1303-1313, **1990**.
- Durán, N., Justo, G.Z., Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., Souza-Brito, A.R.M., Almeida, A.B.A. e Haun, M.; "Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81: 387-396, **2003**.

- Durán, N., Justo, G.Z., Souza-Brito, A.R.M., Rettori, O. e Vieira-Matos, A.N.; "SB-73/MAPA: protein magnesium ammonium phospholinoleate-palmitoleate anhydride", *Drugs Fut.* 22: 454-457, 1997.
- Durán, N., Justo, G.Z., Queiroz, M.L.S., Viera-Matos, A.N. e Rettori, O.; "New perspective in immunomodulatory therapy of tumor induced by an extracellular aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*", *Int. J. Mol. Med.* 4 (Suppl. 1): S49, 1999.
- Durán, N., Melo, P.S. e Haun, M.; "In vitro evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines", In XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, pp150, Caxambu - MG, Brazil, 1996_a.
- Durán, N., Melo, P.S. e Haun, M.; "Violacein in an investigational AIDS-related lymphoma screen in vitro", In Proc. VIII National Meeting of Virology, H54, pp179, São Lourenço - MG, Brazil, 1996_b.
- Durán, N. e Menck, C.F.M.; "Chromobacterium violaceum: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives", *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 201-222, 2001.
- Durán, N. e Nunes, O.D.S.; "Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium sp.* (PB-73 strain)", *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 1289-1302, 1990.
- Durán, N., Souza-Brito, A.R.M., Haun, M., De Oliveira, J.A., Hetem, S., Vargas, L., Saavedra, I. e Justo, G.Z.; "SB-73-immunostimulant", *Drugs Fut.* 18: 327-334, 1993.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R. e Kleiner, J.; "Methods of in vitro toxicology", *Food Chem. Toxicol.* 40: 193-236, 2002.
- Estimativa - 2005, Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- Estrela, J.M., Hernandez, R., Terradez, P., Asensi, M., Puertes, I.R. e Viña, J.; "Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumor cells", *Biochem. J.* 286: 257-262, 1992.
- Evan, G.I. e Vousden, K.H.; "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer", *Nature* 411: 342-348, 2001.
- Faderl, S., Gandhi, V., O'Brien, S., Bonate, P., Cortes, J., Estey, E., Beran, M., Wierda, W., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Estrov, Z., Giles, F.J., Du, M., Kwari, M., Keating, M., Plunkett, W. e Kantarjian, H.; "Results of a phase 1-2

study of clofarabine in combination with cytarabine (ara-C) in relapsed and refractory acute leukemias", *Blood* 105: 940-947, **2005**.

Farinelle, S., Malonne, H., Chaboteaux, C., Decaestecker, C., Dedecker, R., Gras, T., Darro, F., Fontaine, J., Atassi, G. e Kiss, R.; "Characterization of TNP-470-induced modifications to cell functions in HUVEC and cancer cells", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 43: 15-24, **2000**.

Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R.A.R., Ploegh, H.L., Olsen, B.R. e Mothes, W. "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII", *EMBO J.* 19: 1187-1194, **2000**.

Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Durán, N. e Peppelenbosch, M.P.; "Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death", *Blood* 104: 1459-1464, **2004**.

Festjens, N., Van Gorp, M., Van Loo, G., Saelens, X. e Vandenamee, P.; "Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death", *Acta Haematol.* 111: 7-27, **2004**.

Fishman, M. e Seigne, J.; "Immunotherapy of metastatic renal cell cancer", *Cancer Control* 9: 293-304, **2002**.

Folkes, L.K., Rossiter, S. e Wardman, P.; "Reactivity toward thiols and cytotoxicity of 3-methylene-2-oxindoles, cytotoxins from indole-3-acetic acids, on activation by peroxidases", *Chem. Res. Toxicol.* 15: 877-882, **2002**.

Folkman, J.; "Angiogenesis and apoptosis", *Sem. Cancer Biol.* 13: 159-167, **2003**.

Freire, A.C.G., De Assis, C.F., Frick, A.O., Melo, P.S., Haun, M., Aoyama, H., Durán, N., Sauer, M.M., Kallas, E.G. e Ferreira, C.V.; "Influence of protein phosphatase inhibitors on HL60 cells death induction by dehydrocrotonin", *Leukemia Res.* 27: 823-829, **2003**.

Frisch, S.M. e Screaton, R.A.; "Anoikis mechanisms", *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 239-262, **2001**.

Fulda, S. e Debatin, K.M.; "Apoptosis pathways: turned on their heads?", *Drug Resist. Updates* 6: 1-3, **2003**.

Gabai, V.L., Zamulaeva, I.V., Mosin, A.F., Makarova, Y.M., Mosina, V.A., Budagova, K.R., Malutina, Y.V. e Kabakov, A.E.; "Resistance of Ehrlich tumor cells to apoptosis can be due to accumulation of heat shock proteins", *FEBS Lett.* 375: 21-26, **1995**.

- Ganesan, A.; "Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry", *Curr. Opin. Biotech.* 15: 584-590, **2004**.
- Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P. e Ciriolo, M.R.; "Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion", *FASEB J.* 12: 479-486, **1998**.
- Gibbs, J.B.; "Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research", *Science* 287: 1969-1973, **2000**.
- Giovanella, B.C.; "Metronomic Chemotherapy", Hope - The Stehlin Foundation for Cancer Research, Hounston, Texas, EUA, **2003**.
- Gollapudi, S., McCormick, M.J. e Gupta, S.; "Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass occur independent of the activation of caspase-8 and caspase-3 during CD95-mediated apoptosis in peripheral blood T cells", *Int. J. Oncol.* 22: 597-600, **2003**.
- Graaf, A.O., Witte, T. e Jansen, J.H.; "Inhibitor of apoptotic proteins: new therapeutic targets in hematological cancer?", *Leukemia* 18: 1751-1759, **2004**.
- Green, D.R.; "Apoptosis and sphingomyelin hydrolysis: the flip side", *J. Cell Biol.* 150: F5-F7, **2000**.
- Green, D.R. e Evan, G.; "Mitochondria and apoptosis", *Science* 281: 1309-1312, **2002**.
- Green, M.R.; "Targeting targeted therapy", *N. Engl. J. Med.* 350: 2191-2193, **2004**.
- Guimarães, C.A. e Linden, R.; "Programmed cell death - Apoptosis and alternative deathstyles", *Eur. J. Biochem.* 271: 1638-1650, **2004**.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druílhe, A., Fernandes-Alnemri, T. e Alnemri, E.S.; "Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria", *J. Biol. Chem.* 277: 13430-13437, **2002**.
- Gupta, M., Mazumder, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T. e Vamsi, M.L.M.; "Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice", *J. Pharmacol. Sci.* 94: 177-184, **2004**.
- Gupta, M., Mazumder, U.K., Rath, N. e Mukhopadhyay, D.K.; "Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma", *J. Ethnopharmacol.* 72: 151-156, **2000**.

- Hanahan, D. e Weinberg, R.A.; "The hallmarks of cancer", *Cell* 100: 57-70, **2000**.
- Hara, S., Nagai, H., Yamanaka, K., Arakawa, S., Ichihashi, M., Kamidono, S. e Hara, I.; "Secreted type of modified interleukin-18 gene transduced into mouse renal cell carcinoma cells induces systemic tumor immunity", *J. Urol.* 165: 2039-2043, **2001**.
- Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P.D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze M.T. e Tahara, H.; "Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively", *J. Immunol.* 163: 583-589, **1999**.
- Haun, M., Pereira, M.F., Hoffman, M.E., Joyas, A., Campos, V., Filardi, L.D.S., De Castro, S.L. e Durán, N.; "Bacterial chemistry VI. Biological activities and cytotoxicity of 1, 3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives", *Biol. Res.* 25: 21-25, **1992**.
- Hay, R.J., Caputo, J.L. e Mancy, M.L. (Ed.); *ATCC Quality Control Methods for Cell Lines*. 2ª Edição, publicado pela ATCC, Manassas, VA, EUA, **1992**.
- Hoak, J.C., Warner, E.D., Cheng, H.F., Fry, G.L. e Hankenson, R.R.; "Hemangioma with thrombocytopenia and microangiopathic anemia (Kasabach-Merritt syndrome): an animal model", *J. Lab. Clin. Med.* 77: 941-950, **1971**.
- Hoshino, T., Wiltrout, R.H. e Young, H.A.; "IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: A new potential role for IL-18 in modulating the immune response", *J. Immunol.* 162: 5070-5077, **1999**.
- <http://www.roche-applied-science.com> - Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods, Chapter 2: Cell Proliferation and Viability (Acesso em fevereiro/2005), **2000**.
- Hu, W. e Kavanagh, J.J.; "Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway", *Lancet Oncol.* 4: 721-729, **2003**.
- Igney, F.H. e Krammer, P.H.; "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis", *Nat. Rev. Cancer* 2: 277-288, **2002**.
- Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J.C. e Perucho, M.; "Mutational inactivation of the pro-apoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10872-10877, **2000**.
- Israels, L.G e Israels, E.D.; "Apoptosis", *Stem cells* 17: 306-313, **1999**.

- Jakubowicz-Gil, J., Rzymowska, J. e Gawron, A.; "Quercetin, apoptosis, heat shock", *Biochem. Pharmacol.* 64: 1591-1595, **2002**.
- Jang, J.H. e Surh, Y.J.; "Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function", *Biochem. Pharmacol.* 66: 1371-1379, **2003**.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. e Lowe, S.W.; "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy", *Cell* 108: 153-164, **2002**.
- Jones, P.A., Bracher, M., Marenus, K. e Kojima, H.; "Performance of the neutral red uptake assay in the COLIPA international validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test", *Toxicol. Vitro.* 13: 325-333, **1999**.
- Justo, G.Z., Durán, N. e Queiroz, M.L.S.; "Effect of splenic T lymphocytes in Ehrlich ascites tumor bearing mice (EAT) induced by MAPA - Role of cytokines", *Int. J. Mol. Med.* 4 (Suppl. 1): S49, **1999**.
- Justo, G.Z., Durán, N. e Queiroz, M.L.S.; "Myelopoietic response in tumor-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*", *Eur. J. Pharmacol.* 388: 219-226, **2000**.
- Justo, G.Z., Durán, N. e Queiroz, M.L.S.; "Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*", *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 25: 305-319, **2003**.
- Kaneno, R., Fontanari, L.M., Santos, S.A., Di Stasi, L.C., Rodrigues Filho, E. e Eira, A.F.; "Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice", *Food Chem. Toxicol.* 42: 909-916, **2004**.
- Kasibhatla, S. e Tseng, B.; "Why target apoptosis in cancer treatment?", *Mol. Cancer Ther.* 2: 573-580, **2003**.
- Kennedy, D.O., Matsumoto, M., Kojima, A. e Matsui-Yuasa, I.; "Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascites tumor cells", *Chem. Biol. Interac.* 122: 59-71, **1999**.
- Kerbel, R.S.; "Clinical trials of anti-angiogenic drugs: opportunities, problems and assessment of initial results", *J. Clin. Oncol.* 19 (Suppl 1): 45S51S, **2001**.
- Kerbel, R.S. e Kamen, B.A.; "The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy", *Nature Rev. Cancer* 4: 423-436, **2004**.

- Keyhani, A., Jendiroba, D.B. e Freireich, E.J.; "Angiogenesis and leukemia", *Leukemia Res.* 25: 639-645, **2001**.
- Khynriam, D. e Prasad, S.B.; "Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma", *Mutation Res.* 526: 9-18, **2003**.
- Kingston, D.G.I.; "Recent advances in the chemistry of taxol", *J. Nat. Prod.* 63: 726-734, **2000**.
- Kirkin, V., Joos, S. e Zornig, M.; "The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis", *Biochim. Biophys. Acta* 1644: 229-249, **2004**.
- Klaunig, J.E. e Kamendulis, L.M.; "The role of oxidative stress in carcinogenesis", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239-267, **2004**.
- Komissarova, E.V., Saha, S.K. e Rossman, T.G.; "Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202: 99-107, **2005**.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. e Vercesi, A.E.; "Mitochondrial permeability transition and oxidative stress", *FEBS Lett.* 24750: 1-4, **2001**.
- Kumar, M., Chaturvedi, V.K. e Singh, D.P.; "*Chromobacterium violaceum* - an unusual pathogen of swine", *Indian Veter. J.* 76: 869-871, **1999**.
- Kumar, S. e Vaux, D.; "A cinderella caspase takes center stage", *Science* 297: 1290-1291, **2002**.
- Lasso De La Vega, M.C., Terradez, P., Obrador, E., Navarro, J., Pellicer, J.A. e Estrela, J.M.; "Inhibition of cancer growth and selective glutathione depletion in Ehrlich tumour cells *in vivo* by extracellular ATP", *Biochem. J.* 298: 99-105, **1994**
- Lee, C. e Macgregor, P.F.; "Drug resistance and microarrays, how far are we from personalized cancer treatment?", *Mod. Drug Discovery* 7: 45-49, **2004**.
- Lee, J.K., Sayers, T.J., Back, T.C., Wigginton, J.M. e Wiltrout, R.H.; "Lack of Fas-L mediated killing leads to *in vivo* tumor promotion in mouse Lewis lung cancer", *Apoptosis* 8: 151-160, **2003**.
- Leon, L.L., Miranda, C.C., De Souza, A. O. e Durán, N.; "Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*", *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 449-50, **2001**.

- Leszczyniecka, M., Roberts, T., Dent, P., Grant, S. e Fisher, P.B.; "Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications", *Pharmacol. Ther.* 90: 105-156, **2001**.
- Li, L., Shin, D.M. e Fidler, I.J.; "Intrabronchial implantation of the Lewis lung carcinoma tumor does not favor tumorigenicity and metastasis", *Inv. Metastasis* 10: 129-141, **1990**.
- Lichstein, H.C. e Van de Sand, V.F.; "Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*", *J. Infec. Dis.* 76: 47-51, **1945**.
- Liekens, S., De Clercq, E. e Neyts, J.; "Angiogenesis: regulators and clinical applications", *Biochem. Pharmacol.* 61: 253-270, **2001**.
- Loewenthal, H. e John, G.; "Übertragungsversuche mit carcinomatöser mauses ascitesflüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen", *Z. Krebsforsch.* 37: 439-447, **1932**.
- Maini, A., Nishisaka, N., Kinoshita, Y., Jones, R.F., Wang, C.Y. e Haas, G.P.; "Combination of radiation and vaccination with autologous tumor cells expressing IL-2, IFN-gamma and GM-CSF for treatment of murine renal carcinoma", *In Vivo* 17: 119-123, **2003**.
- Makin, G. e Hickman, J.A.; "Apoptosis and cancer chemotherapy", *Cell Tissue Res.* 301: 143-152, **2000**.
- Mann, J.; "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future", *Nature Rev. Cancer* 2: 143-148, **2002**.
- Martins, L.M., Kottke, R.J., Mesner, P., Basi, G.S., Sinha, S., Frigon, N.J., Tatar, E., Tung, J.S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P.A., Madden, B.J., McCormick, D.J., Earnshaw, W.C. e Kaufmann, S.H.; "Activation of multiple interleukin-1 β converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL60 human leukemia cell lines during etoposide-induced apoptosis", *J. Biol. Chem.* 272: 7421-7439, **1997**.
- Masquelier, M., Zhou, Q.F., Gruber, A. e Vitols, S.; "Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells", *Biochem. Pharmacol.* 67: 1047-1056, **2004**.
- Masztalerz, A., Van Rooijen, N., Den Otter, W. e Everse, L.A.; "Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression", *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 235-242, **2003**.

- Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ohguchi, K., Ito, T., Tanaka, T., Linuma, M. e Nozawa, Y.; "Induction of apoptosis by xanthenes from mangosteen in human leukemia cell lines", *J. Nat. Prod.* 66: 1124-1127, **2003**.
- Matsuzaki, P., Akisue, G., Oloris, S.C.S., Gómiak, S.L. e Dagli, M.L.Z.; "Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form", *Life Sci.* 74: 573-579, **2003**.
- Maung, Z.T., MacLean, F.R., Reid, M.M., Pearson, A.D.J., Proctor, S.J., Hamilton, P.J. e Hall, A.G.; "The relationship between *Bcl-2* expression and response to chemotherapy in acute leukaemia", *Br. J. Haematol.* 88: 105-109, **1994**.
- May, G., Brümmer, B. e Ott, H; "Verfahren zur Isolierung von Violacein und seine Verwendung zur Prophylaxe und Therapie von Viruserkrankungen", Deutsches Patentamt Offenlegungsschrift DE 3,935,066 (CL.C12P17/16), 25 April 1991, Application. 20 October, 5pp., **1989**.
- McDermott, D.F. e Atkins, M.B.; "Application of IL-2 and other cytokines in renal cancer", *Expert Opin. Biol. Ther.* 4: 455-468, **2004**.
- Medina, M.A.; "Glutamine and cancer", *J. Nutr.* 131: 2539S-2542S, **2001**.
- Mello, M.L.S.; "Image analysis of Feulgen-stained spontaneously transformed 3T3 cells", *Chromatin* 1: 89-98, **1992**.
- Melo, A., Justo, G.Z., Durán, N. e Queiroz, M.L.S.; "Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes* - infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*", *Human Exp. Toxicol.* 20: 38-45, **2001_b**.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. e Haun, M.; "Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells", *Toxicology* 186: 217-225, **2003**.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., Durán, N. e Haun, M.; "Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives", *Eur. J. Pharmacol.* 487: 47-54, **2004**.
- Melo, P.S., Justo, G.Z., Xavier, A.L., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. e Haun, M.; "Apoptosis induction by free and co-formulated violacein in HL60 human promyelocytic leukemia cells", *FASEB J.* 15: A172, **2001_a**.
- Melo, P.S., Maria, S.S., Vidal, B.C., Haun, M. e Durán, N.; "Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells", *In vitro Cel & Devel. Biol. An.* 36: 539-543, **2000**.

- Mesa, C. e Fernández, L.E.; "Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy", *Immunol. Cell Biol.* 82: 644-650, **2004**.
- Mihich, E. e Ehrke, M.J.; "Anticancer drugs plus cytokines: immunomodulation based therapies of mouse tumors", *Int. J. Immunopharmacol.* 22: 1077-1081, **2000**.
- Mills, K.I., Woodgate, L.J., Gilkes, A.F., Walsh, V., Sweeney, M.C., Brown, G., e Burnett, A.K.; "Inhibition of mitochondrial function in HL60 cells is associated with an increased apoptosis and expression of CD14", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 294-300, **1999**.
- Mita, M. e Tolcher, A.W.; "Novel apoptosis inducing agents in cancer therapy", *Curr. Probl. Cancer* 29: 8-32, **2005**.
- Moffat, J., Kennedy, D.O., Kojima, A., Hasuma, T., Yano, Y., Otani, S., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. e Matsui-Yuasa, I.; "Involvement of protein tyrosine phosphorylation and reduction of cellular sulfhydryl groups in cell death induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells", *Chem. Biol. Interact.* 139: 215-230, **2002**.
- Moser, T.L., Stack, M.S., Asplin, I., Enghild, J.J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H.W. e Pizzo, S.V.; "Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2811-2816, **1999**.
- Mosmann, T.R.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods* 65: 55-59, **1983**.
- Muragaki, Y., Timmons, S., Griffith, C.M., Oh, S.P., Fadel, B., Quertermous, T. e Olsen, B.R.; "Mouse Col18a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8763-8767, **1995**.
- Murphy, G.P. e Hrushesky, W.J.; "Investigation of a new renal tumor model", *J. Sur. Res.* 15: 327-336, **1973**.
- Murphy, G.P. e Hrushesky, W.J.; "A murine renal cell carcinoma", *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 1013-1025, **1980**.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. e Snader, K.M.; "The influence of natural products upon drug discovery", *Nat. Prod. Rep.* 17: 215-234, **2000**.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. e Snader, K.M.; "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002", *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037, **2003**.

- Nielsen, J.; "Combinatorial synthesis of natural products", *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 297-305, **2002**.
- Nocerini, M.R., Yost, G.S., Carlson, J.R., Liberato, D.J. e Breeze, R.G.; "Structure of the glutathione adduct of 3-methylindole indicates that an imine methide is the electrophilic intermediate", *Drug Metab. Dispos.* 13: 695-699, **1985**.
- Obeso, J., Weber, J. e Auerbach, R.; "A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology", *Lab. Invest.* 63: 259-269, **1990**.
- Obrador, E., Carretero, J., Esteve, J.M., Pellicer, J.A., Pascual, A., Petschen, I. e Estrela, J.M.; "Glutamine potentiates TNF- α induced tumor cytotoxicity", *Free Rad. Bio. Med.* 31: 642-650, **2001**.
- O'Hare, S. e Atterwill, C.K.; *Methods in Molecular Biology 43: In vitro Toxicity Testing Procedures*, Human Press, Totowa, N.J., EUA, **1995**.
- O'Reilly, M., Holmgren, L. e Shing, Y.; "Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma", *Cell* 79: 315-325, **1994**.
- Ortaldo, J.R. e Herberman, R.B.; "Heterogeneity of natural killer cells", *Ann. Rev. Immunol.* 2: 359-394, **1984**.
- Pal, S., Choudhuri, T., Chattopadhyay, S., Bhattacharya, A., Datta, G.K., Das, T. e As, G.; "Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 658-665, **2001**.
- Pantel, K. e Brakenhoff, R.H.; "Dissecting the metastatic cascade", *Nature Rev. Cancer* 4: 448-456, **2004**.
- Papageorgiou, M., Stiakaki, E., Dimitriou, H., Malliaraki, N., Notas, G., Castanas, E. e Kalmanti, M.; "Cancer chemotherapy reduces plasma total antioxidant capacity in children with malignancies", *Leukemia Res.* 29: 11-16, **2005**.
- Parhar, R.S. e Lala, P.K.; "Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 1. Kinetics and *in vivo* significance", *Cell. Immunol.* 93: 250-264, **1985**.
- Parhar, R.S. e Lala, P.K.; "Prostaglandin E2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages", *J. Leukocyte Biol.* 44: 185-190, **1988**.

- Park, J.E., Yang, J.H., Yoon, S.J., Lee, J.H., Yang, E.S. e Park, J.W.; "Lipid peroxidation-mediated cytotoxicity and DNA damage in U937 cells", *Biochimie* 84: 1198-1204, **2003**.
- Parmiani, G., Rivoltini, L., Andreola, G. e Carrabba, M.; "Cytokines in cancer therapy", *Immunol. Lett.* 74: 41-44, **2000**.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C. e Brancolini, C.; "Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but it is processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3", *J. Biol. Chem.* 276: 21907-21915, **2001**.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. e Piemonte, F.; "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification", *Clin. Chim. Acta* 333: 19-39, **2003**.
- Perry, D.K. e Hannun, Y.A.; "The role of ceramide in cell signaling", *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 233-243, **1998**.
- Peto, J.; "Cancer epidemiology in the last century and the next decade", *Nature* 411: 390-395, **2001**.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. e Casini, A.F.; "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist", *Biochem. Pharmacol.* 66: 1499-1503, **2003**.
- Portielje, J.E.A., Kruit, W.H.J., Schuler, M., Beck, J., Lamers, C.H.J., Stoter, G., Huber, C., Boer-Dennert, M., Rakhit, A., Bolhuis, R.L.H. e Aulitzky, W.E.; "Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer", *Clin. Cancer Res.* 5: 3983-3989, **1999**.
- Qureshi, S., Al-Shabanah, O.A., Al-Bekairi, A.M., Al-Harbi, M.M., Al-Gharably, N.M. e Raza, M.; "Studies on the cytotoxic, biochemical and anti-carcinogenic potentials of ninhydrin on Ehrlich sscites carcinoma cell-bearing swiss albino mice", *Invest. New Drugs* 18: 221-230, **2000**.
- Rashidi, B., Yang, M., Jiang, P., Baranov, E., An, Z., Wang, X., Moossa, A.R. e Hoffman, R.M.; "A highly metastatic Lewis lung carcinoma orthotopic green fluorescent protein model", *Clin. Exp. Metastasis* 18: 57-60, **2000**.
- Reed, J.; "Dysregulation of apoptosis in cancer", *J. Clin. Oncol.* 17: 2941-2953, **1999**.
- Reed, J.C.; "Apoptosis-targeted therapies for cancer", *Cancer Cell* 3: 17-22, **2003**.

- Reddy, L., Odhav, B. e Bhoola, K.D.; "Natural products for cancer prevention: a global perspective", *Pharmacol. Therapeut.* 99: 1-13, **2003**.
- Regal, K.A., Laws, G.M., Yuan, C., Yost, G.S. e Skiles, G.L.; "Detection and Characterization of DNA Adducts of 3-Methylindole", *Chem. Res. Toxicol.* 14: 1014-1024, **2001**.
- Rettori, D. e Durán, N.; "Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*", *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 685-688, **1998**.
- Rettori, D., Rodrigues, R.A. e Durán, N.; "*Chromobacterium violaceum* produces violacein oxidative stress", *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S.Paulo* 34: 169; **1998**.
- Rhim, J.S., Tsai, W., Chen, Zhang-qun, Chen, Z., Waes, C.V., Burger, A.M. e Lautenberger, J.A.; "A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis", *Carcinogenesis* 19: 673-681, **1998**.
- Riordan, F.A., Foroni, L., Hoffbrand, A.V., Mehta, A.B. e Wickremasinghe, R.G.; "Okadaic acid-induced apoptosis of HL60 leukemia cells is preceded by destabilization of Bcl-2 mRNA and downregulation of Bcl-2 protein", *FEBS Lett.* 435: 195-198, **1998**.
- Riveros, R., Haun, M., Campos, V. e Durán, N.; "Bacterial chemistry-IV. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*", *Arq. Biol. Tecnol.* 31: 475-487, **1988**.
- Rodriguez, J.A. e Haun, M.; "Cytotoxicity of transdehydro-crotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes", *Planta Medica* 65: 1-5, **1999**.
- Rothenberg, M.L., Carbone, D.P. e Johnson, D.H.; "Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities", *Nature Rev.* 3: 303-309, **2003**.
- Ruiz de Morales, J., Vélez, D. e Subiza, J.L.; "Ehrlich tumor stimulates extramedullar hematopoiesis in mice without secreting identifiable colony-stimulating factors and without engagement of host T cells", *Exp. Hematol.* 27: 1757-1767, **1999**.
- Salup, R.R., Back, T.C. e Wiltrout, R.H.; "Successful treatment of advanced murine renal cell cancer by bicompartamental adoptive chemoimmunotherapy", *J. Immunol.* 138: 641-647, **1987**.

- Salup, R.R., Herberman, R.B. e Wilttrout, R.H.; "Role of natural killer activity in development of spontaneous metastases in murine renal cancer", *J. Urol.* 134: 1236-1241, **1985**.
- Salup, R.R. e Wilttrout, R.H.; "Adjuvant immunotherapy of established murine renal cancer by interleukin 2-stimulated cytotoxic lymphocytes", *Cancer Res.* 46: 3358-3363, **1986**.
- Samuilov, V.D.; "Microbial therapy of cancer: induction of apoptosis, recombinant vaccines, and inhibition of angiogenesis", *Biochemistry* 68: 958-962, **2003**.
- Saraiva, V.S., Marshall, J.C., Cools-Lartigue, J. e Burnier Jr., M.N.; "Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines", *Melanoma Res.* 14: 421-424, **2004**.
- Saraste, A. e Pulkki, K.; "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis", *Cardiovasc. Res.* 45: 528-537, **2000**.
- Sartorius, U., Schmitz, I. e Krammer, P.H.; "Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis", *Chem. Biochem.* 2: 20-29, **2001**.
- Sayers, T.J., Brooks, A.D., Lee, J.K., Fenton, R.G., Komschlies, K.L., Wigginton, J.M., Winkler-Pickett, R. e Wilttrout, R.H.; "Molecular mechanisms of immune-mediated lysis of murine renal cancer: Differential contributions of perforin-dependent versus Fas-mediated pathways in lysis by NK and T cells", *J. Immunol.* 161: 3957-3965, **1998**.
- Schafer, F.Q. e Buettner, G.R.; "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple", *Free Rad. Biol. Med.* 30: 1191-1212, **2001**.
- Schimmer, A.D., Hedley, D.W., Penn, L.Z. e Minden, M.D.; "Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view", *Blood* 29: 3541-3553, **2001**.
- Segura, J.A., Barbero, L.G. e Márquez, J.; "Early tumour effect on splenic Th lymphocytes in mice", *FEBS Lett.* 414: 1-6, **1997**.
- Segura, J.A., Barbero, L.G. e Márquez, J.; "Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation", *Immunol. Lett.* 74: 111-115, **2000**.
- Seki, N., Hayakawa, Y., Brooks, A.D., Wine, J., Wilttrout, R.H., Yagita, H., Tanner, J.E., Smyth, M.J. e Sayers, T.J.; "Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-mediated Apoptosis Is an Important Endogenous

- Mechanism for Resistance to Liver Metastases in Murine Renal Cancer”, *Cancer Res.* 63: 207-213, **2003**.
- Sheikh, M.S. e Huang, Y.; “Death Receptors as targets for cancer therapy”, *Curr. Cancer Drug Targets* 4: 97-104, **2004**.
- Shevde, L.A. e Welch, D.R.; “Metastasis suppressor pathways - an evolving paradigm”, *Cancer Lett.* 198: 1-20, **2003**.
- Shin, H.J., Kim, Y.S., Kwak, Y.S., Song, Y.B., Kim, Y.S. e Park, J.D.; “Enhancement of antitumor effects of paclitaxel (taxol) in combination with red ginseng acidic polysaccharide (RGAP)”, *Planta Medica* 70: 1033-1038, **2004**.
- Sies, H.; “Glutathione and its role in cellular functions”, *Free Rad. Biol. Med.* 27: 916-921, **1999**.
- Sinha, R. e El-Bayoumy, K.; “Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds”, *Curr. Cancer Drug Targets* 4: 13-28, **2004**.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrot, R.H., Sedger, L.M., Kayagaki, N., Yagita, H. e Okumura, K.; “Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Contributes to Interferon g-dependent Natural Killer Cell Protection from Tumor Metastasis”, *J. Exp. Med.* 193: 661-670, **2001**.
- Sneath, P.H.; *Chromobacterium* Bergonzini 1881. In Bergey’s manual of determinative bacteriology; Gibbons, R.E. ed., 8ª Edição, Williams and Wilkins, Baltimore, pp 354-357, **1974**.
- Spinosa, H.S., Gorniak, S.L. e Bernardi, M.M.; “Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária”, 3ª Edição, Guanabara Koogan Editora, São Paulo - SP, Brasil, **2002**.
- Srinivasan, P., Sabitha, K.E. e Shyamaladevi, C.S.; “Therapeutic efficacy of green tea polyphenols on cellular thiols in 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis”, *Chem. Biol. Interact.* 149: 81-87, **2004**.
- Subiza, J.L., Coll, J., Alvarez, R., Valdivieso, M. e De la Concha, E.G.; “IgM response and resistance to ascites tumor growth”, *Cancer Immunol. Immunother.* 25: 87-92, **1987**.
- Subiza, J.L., Viñuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Figueredo, M.A., e De la Concha, E.G.; “Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice”, *Int. J. Cancer* 44: 307-314, **1989**.

- Sugiura, K e Stock, C.C.; "Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors", *Cancer Res.* 15: 38-51, **1955**.
- Sunila, E.S. e Kuttan, G.; "Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum linn.* and piperine", *J. Ethnopharmacol.* 90: 339-346, **2004**.
- Tanaka, T., Delong, P.A., Amin, K., Kruklitis, R., Kapoor, V., Kaiser, L.R. e Albelda, S.M.; "Treatment of lung cancer using clinically relevant oral doses of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib - Potential value as adjuvant therapy after surgery", *Ann. Surg.* 241: 168-178, **2005**.
- Tentori, L., Leonetti, C. e Aquino, A.; "Temozolomide Reduces the Metastatic Potential of Lewis Lung Carcinoma (3LL) in Mice: Role of α -6 Integrin Phosphorylation", *Eur. J. Cancer* 31: 746-754, **1995**.
- Tietze, F.; "Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: an application to mammalian blood and other tissues", *Anal. Biochem.* 27: 502-522, **1969**.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. e Tapiero, H.; "The importance of glutathione in human disease", *Biomed. Pharmacother.* 57: 145-155, **2003**.
- Ujihara, M., Nomura, K., Yamada, O. e Demura, H.; "Establishment of a stable HL60 subline having the potential for monocytic differentiation using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible use for the study of monocytic differentiation and oxidative stress", *Atherosclerosis* 139: 301-306, **1998**.
- Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, M., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F. e Omay, S.B.; "Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors", *Leukemia Res.* 23: 507-512, **1999**.
- Valadares, M.C., Klein, S.I., Guaraldo, A.M.A., Queiroz, M.L.S.; "Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumour", *Eur. J. Pharmacol.* 473: 191-196, **2003**.
- Vermes, I., Haanen, C. e Reutelingsperger, C.; "Flow cytometry of apoptotic cell death", *J. Immunol. Met.* 243: 167-190, **2000**.
- Via, L.D. e Magno, S.M.; "Photochemotherapy in the treatment of cancer", *Curr. Med. Chem.* 8: 1405-1418, **2001**.
- Viñuela, J.E., Rodríguez, R., Gil, J., Coll, J., De la Concha, E.G. e Subiza, J.L.; "Antigen shedding vs. development of natural suppressor cells as

- mechanism of tumor escape in mice bearing Ehrlich tumor”, *Int. J. Cancer* 47: 86-91, **1991**.
- Voehringer, D.W.; “Bcl2 and glutathione: alterations in the cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity”, *Free Rad. Biol. Med.* 27: 945-950, **1999**.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggen, P. e McPhail, A.T.; “The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent”, *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325-2327, **1971**.
- Waterhouse, N.J., Goldstein, J.C., Kluck, R.M., Newmeyer, D.D. e Green, D.R. “The (Holey) study of mitochondria in apoptosis”. In Schwartz, L.M. e Ashwell, J.D. (ed), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, CA, 365-391, **2001**.
- Wen, W., Moses, M.A., Wiederschain, D., Arbiser, J.L. e Folkman, J.; “Generation of endostatin is mediated by elastase”, *Cancer Res.* 59: 6052-6056, **1999**.
- Westwell, A.D.; “Molecular targets and cancer therapeutics”, *Drug Discovery Today* 9: 1042-1044, **2004**.
- Westwell, A.D. e Stevens, M.F.G.; “Hitting the chemotherapy jackpot: strategy, productivity and chemistry”, *Drug Discovery Today* 9: 625-627, **2004**.
- Wigginton, J.M., Komschlies, K.L., Green, J.E., Cox, G.W., Jorcyk, C.L., Back, T.C., Franco, J.L., Brunda, M.J. e Wiltrout, R.H.; “Evaluation of the Antitumor Activity of Interleukin-12/Pulse Interleukin-2 Combination”, *Ann. NY Acad. Sci.* 795: 434-439, **1996**.
- Wigginton, J.M. e Wiltrout, R.H.; “IL-12/IL-2 combination cytokine therapy for solid tumours: translation from bench to bedside”, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2: 513-524, **2002**.
- Williams, P.D., Pontes, E.J. e Murphy, G.P.; “Studies on the growth of a murine renal-cell carcinoma and its metastatic patterns”, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 34: 345-350, **1981**.
- Wiltrout, R.H.; “The use of pre-clinical rodent models for cancer immunotherapy”. In *Tumour Immunobiology*, 1ª Edição, Oxford University Press, Nova Iorque, 369-382, **1993**.
- Wiltrout, R.H.; “Regulation and antimetastatic functions of liver associated natural killer cells”, *Immunol. Rev.* 174: 63-76, **2000**.
- Wiltrout, R.H., Boyd, M.R., Back, T.C., Salup, R.R., Arthur, J.A., e Hornung, R.L.; “Flavone-8 acetic acid augments systemic natural killer cell activity and

synergizes with IL-2 for treatment of murine renal cancer”, *J. Immunol.* 140: 3261-3265, **1988**.

Word Reference - <http://wordreference.com/de/translation.asp?ende=metronomic> (Acesso em fevereiro/2005), **2003**.

Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. e Turner, N.D.; “Glutathione metabolism and its implications for health”, *J. Nutr.* 134: 489-492, **2004**.

Xu, K. e Thornalley, P.J., “Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cell *in vitro*”, *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177, **2001**.

Yannelli, J.R. e Wroblewski, J.M.; “On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy”, *Vaccine* 23: 97-113, **2004**.

Yunes, R.A., Pedrosa, R.C. e Filho, V.C.; “Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil”, *Quim. Nova* 24: 147-152, **2001**.

Zbar, A.P.; “The immunology of colorectal cancer”, *Surg. Oncol.* 13: 45-53, **2004**.

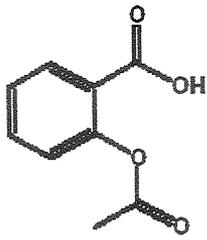
Zhang, Y. e Zhao, B.; “Green tea polyphenols enhance sodium nitroprusside-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells”, *J. Neurochem.* 86: 1189-1200, **2003**.

Zhao, Y., Cao, J. Ma, H. e Liu, J.; “Apoptosis induced by tea polyphenols in HL60 cells”, *Cancer Lett.* 121: 163-167, **1997**.

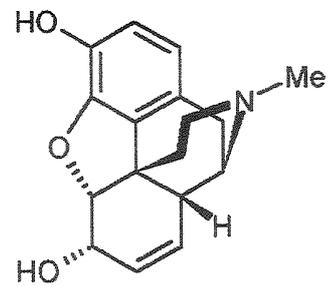
Zhu, W.H., Majluf-Cruz, A. e Omburo, G.A.; “Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and ro-20-1724 promoted apoptosis in HL60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism”, *Life Sci.* 63: 265-274, **1998**.

7. ANEXOS

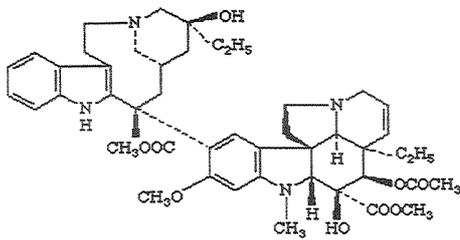
ANEXO 1



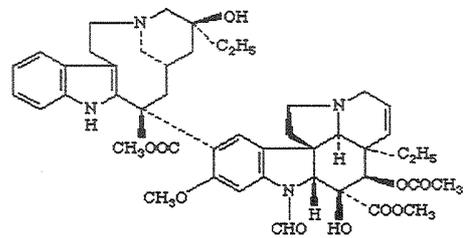
Aspirina



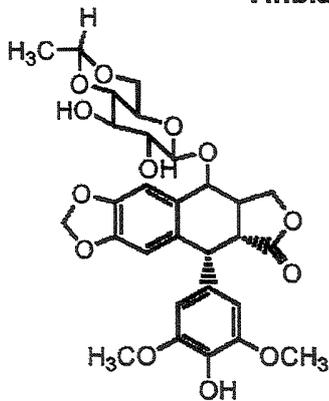
Morfina



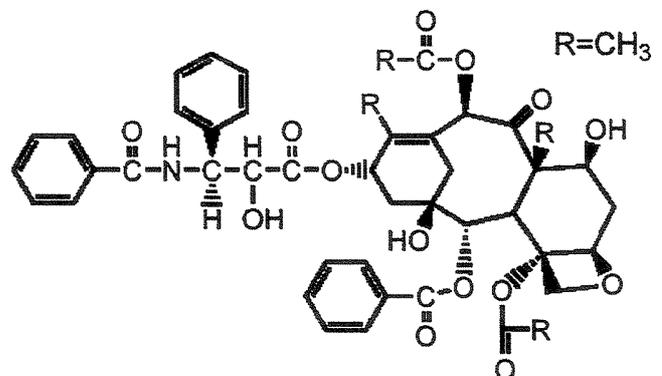
Vinblastina



Vincristina

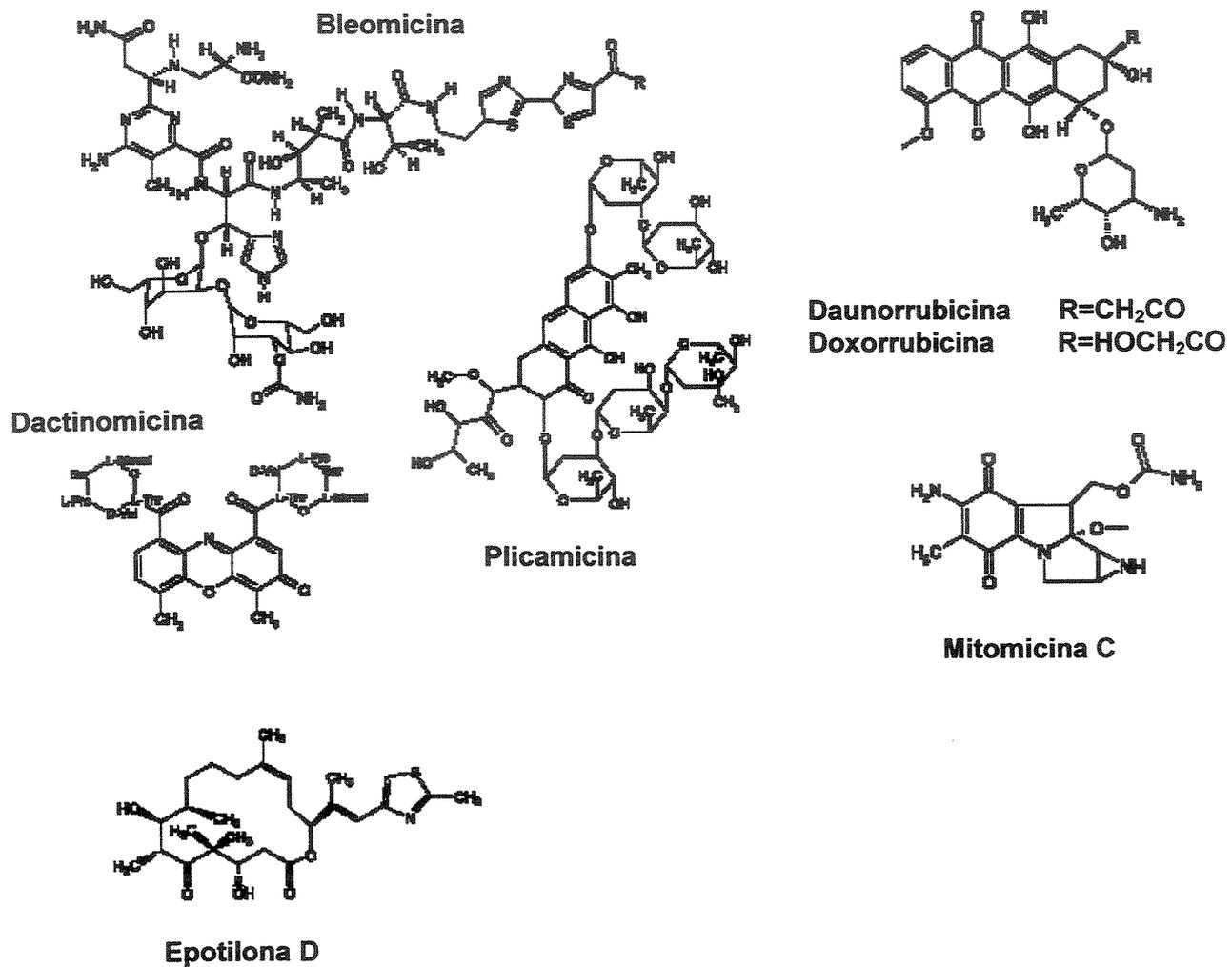


Etoposídeo

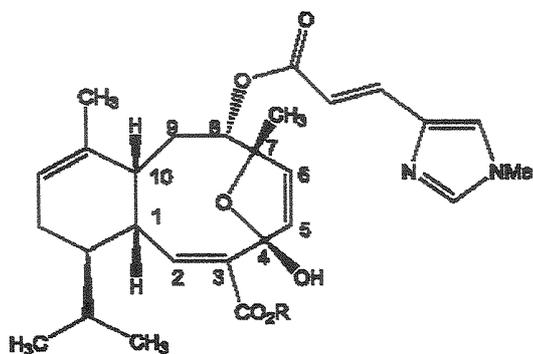


Paclitaxel

ANEXO 2

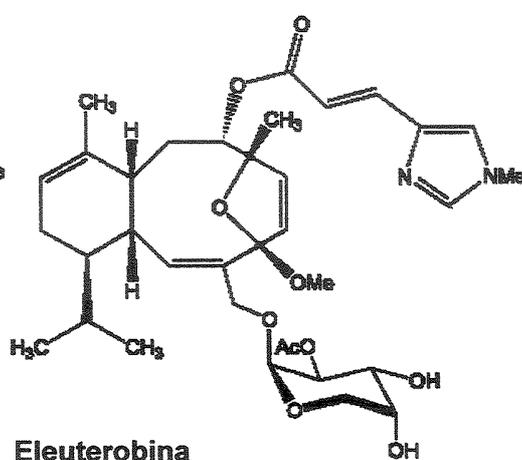


ANEXO 3

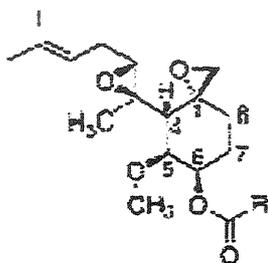


Sarcodictina

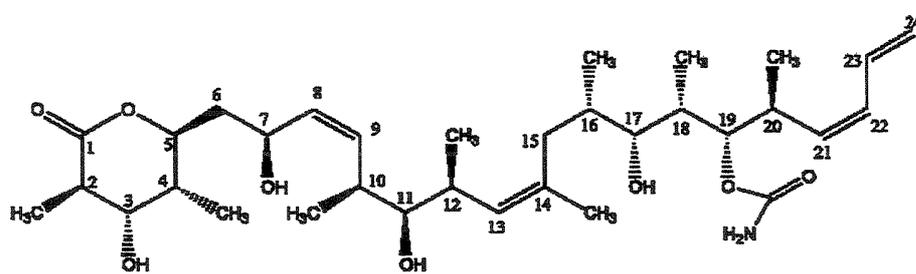
A R = CH₃
B R = C₂H₅



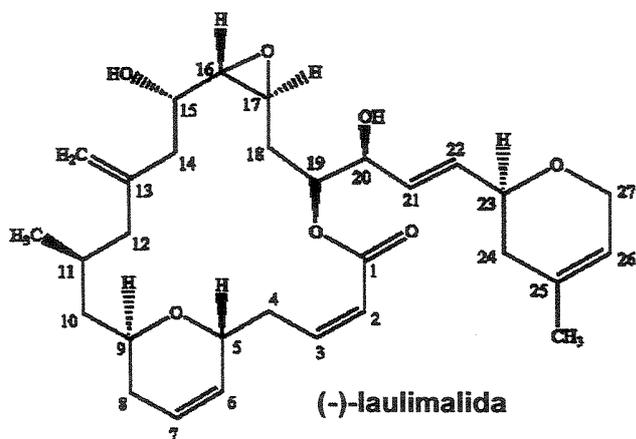
Eleuterobina



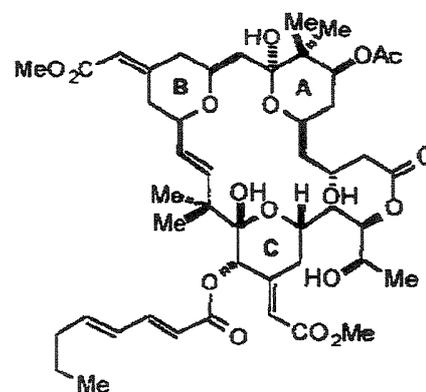
Fumagilina



(+)discodermolida



(-)-laurimalida



Briostatina

ANEXO 4

Procedimento resumido do ensaio com o kit Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA

1. Reconstituir os padrões do kit Mouse Th1/Th2 Cytokine (15 min) no diluente do ensaio.
2. Diluir os padrões por diluição em série usando o diluente do ensaio.

3. Misturar 10 μL / teste de cada suspensão de "beads" de captura de citocinas de camundongo.
4. Transferir 50 μL da mistura de "beads" para cada tubo do ensaio.

5. Adicionar as diluições dos padrões e amostras testes aos tubos de FACS (50 μL / tubo).
6. Adicionar o reagente de detecção marcado com PE (50 μL / tubo).

2h de incubação a T ambiente

Proteger da luz

7. Lavar as amostras com 1 mL de tampão de lavagem e centrifugar.

8. Adicionar 300 μL do tampão de lavagem a cada tubo de ensaio e analisar as amostras.

ANEXO 5

Procedimento de Ajuste do citômetro para calibração das “beads”

<ol style="list-style-type: none"> 1. Adicionar as “beads” de setup do citômetro para ajustar os tubos A, B e C (50 µL/tubo). 2. Adicionar 50 µL do controle positivo marcado com FITC ao tubo B e 50 µL do controle positivo marcado com PE ao tubo C. 	30 minutos de incubação (25°C)	<ol style="list-style-type: none"> 3. Adicionar 400µL do tampão de lavagem aos tubos B e C. 4. Adicionar 450 µL do tampão de lavagem ao tubo A. 5. Usar os tubos A, B e C para o ajuste do citômetro.
Proteger da luz		

Procedimento resumido de ELISA sanduíche (R & D Systems)

Neste ensaio as citocinas presentes no soro são determinadas quantitativamente pelo método imunoenzimático ELISA sanduíche, utilizando-se anticorpos específicos para cada citocina. Os padrões, controles e amostras são pipetados nos poços de uma microplaca revestida com o anticorpo específico para a citocina em análise. Após lavagem dos poços, o anticorpo de detecção anti-citocina conjugado à enzima peroxidase (HRP) é adicionado aos poços. Após lavagem, para retirada do reagente de detecção anticorpo-enzima que não se ligou, o substrato é adicionado aos poços. A reação enzimática fornece um produto colorido quando a reação é interrompida pela adição de ácido (solução “stop”). A intensidade da coloração medida é proporcional à quantidade da citocina em análise ligada na etapa inicial. Os valores das amostras são interpolados numa curva de calibração.

1. Preparar os reagentes, padrões e amostras.
2. Adicionar 50 µL do diluente do ensaio a cada poço da placa.
3. Adicionar 50 µL do padrão, controle ou amostra por poço. Incubar por 2h a temperatura ambiente.
4. Descartar o sobrenadante de cada poço e lavar 5 vezes com 400 µL de tampão.
5. Adicionar 100 µL do anticorpo conjugado à enzima. Incubar por 2h a temperatura ambiente.
6. Repetir as etapas do passo 4.
7. Adicionar 100 µL da solução de substrato (peróxido de hidrogênio:tetrametilbenzidina, 1:1) em cada poço. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, protegendo da luz.

8. Adicionar 100 μL da solução “stop” (ácido clorídrico diluído) em cada poço.
9. Determinar a densidade óptica de cada poço após 30 minutos de incubação, usando um leitor de placas ajustado em 450 nm.

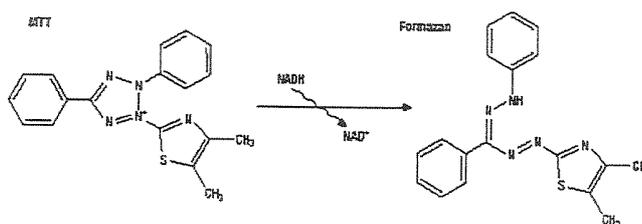
ANEXO 6

Metodologias de avaliação de citotoxicidade

Citotoxicidade é um termo que inclui os efeitos que um composto tóxico pode exercer sobre o crescimento, metabolismo e viabilidade celular. A determinação da viabilidade celular é crucial para a avaliação de mutagênese, transformação maligna, apoptose, patologias celulares e toxicidade farmacológica. É também muito importante para elucidação de mecanismos de carcinogênese devido à origem de tumores a partir de células viáveis (Eisenbrand *et al.*, 2002; Komissarova *et al.*, 2005). A relevância dos testes de citotoxicidade deve-se às indicações fornecidas sobre a sensibilidade das células a um agente tóxico, tornando-os apropriados para propósitos de seleção. Embora os indicadores dos mecanismos associados aos efeitos induzidos pelo agente tóxico sejam inespecíficos, resultados positivos em testes de citotoxicidade indicam que mudanças fisiológicas ou morfológicas ocorreram nas células expostas. Dessa maneira, esses ensaios podem sugerir outros alvos (endpoints) a serem investigados para fornecer informações mecanísticas mais específicas sobre as interações entre o composto tóxico e as células. Efeitos sobre o crescimento ou metabolismo celulares devido à exposição a concentrações crescentes do composto tóxico podem resultar em dano irreversível, diminuindo a viabilidade celular (Barile, 1994; Eisenbrand *et al.*, 2002).

A avaliação do conteúdo protéico fornece um índice do número total de células baseado na determinação do conteúdo macromolecular das células (Aoyama *et al.*, 2000). O ensaio de redução do MTT ou MTS, sais de tetrazólio, é extensivamente usado como ensaio quantitativo de proliferação celular e citotoxicidade, baseado nos experimentos de Mosmann (1983) para a redução do sal de tetrazólio MTT. Devido ao fato dos sais de tetrazólio serem reduzidos a produtos formazan coloridos somente por células metabolicamente ativas, esses ensaios consistem em uma estimativa de células viáveis (Bartrop *et al.*, 1991; Berridge e Tan, 1993; Komissarova *et al.*, 2005). No ensaio que emprega o MTT, por exemplo, o sal amarelo MTT é reduzido por células viáveis ao sal de formazan insolúvel em água e de coloração púrpura. A reação de redução do MTT/MTS em células isoladas e em tecidos é considerada um indicador da “atividade redox celular” e atribuída principalmente a enzimas mitocondriais e carreadores eletrônicos. Entretanto, existem evidências de que a redução do MTT/MTS em células de mamíferos é também catalisada por enzimas não-mitocondriais. Alguns trabalhos demonstraram que o retículo endoplasmático, o citosol e as membranas plasmáticas podem participar na bio-redução

do MTT/MTS (Bernas e Dobrucki, 2000) e que o transporte eletrônico mitocondrial parece exercer um papel secundário na redução celular do MTT/MTS (Bernas e Dobrucki, 2002). Uma vez que a maior parte da redução celular ocorre no citoplasma e provavelmente utiliza nucleotídeos piridínicos NADH e NADPH como cofatores, o ensaio do MTT não é mais considerado estritamente um ensaio mitocondrial (<http://www.roche-applied-science.com> - Acesso em Fevereiro/2005).



Estrutura do composto tetrazólico MTT e seu produto formazan.

As proteínas fosfatases por sua vez, são moléculas sinalizadoras que, em conjunto com a proteína quinase, regulam uma variedade de processos celulares fundamentais como o crescimento celular, mitose, metabolismo, transcrição gênica, controle do ciclo celular e respostas imune e ao estresse. Tais aspectos em conjunto sugerem a aplicação da determinação da atividade fosfatásica como ferramenta para avaliação da viabilidade celular em estudos de citotoxicidade (Aoyama *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2003).

ANEXO 7

Metodologia de determinação de glutathiona (GSH)

A glutathiona (L- γ -glutamil-L-cisteinaglicina) - um tripeptídeo constituído de glicina, cisteína e ácido glutâmico - é a principal fonte de grupos tióis intracelulares e participa em aspectos essenciais da homeostase celular, atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes como a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Pompella *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Devido a sua alta concentração intracelular (0,5 -10,0 mmol L⁻¹), a GSH é o principal peptídeo redutor intracelular, contribuindo com seu grupo sulfidril para tamponamento e remoção de radicais livres gerados durante os processos metabólicos normais, como respiração celular e durante o estresse oxidativo (Voehringer *et al.*, 1999; Pastore *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2004; Klaunig e Kamendulis, 2004). De fato, a GSH é tanto um nucleófilo como um redutor e, portanto, pode reagir com espécies eletrofílicas ou oxidantes antes da interação dessas espécies com outros constituintes celulares críticos como ácidos nucleicos e proteínas (Pompella *et al.*, 2003). A glutathiona livre é principalmente encontrada na sua forma reduzida (GSH), que pode ser convertida em sua forma oxidada (GSSG) durante estresse oxidativo e, ser novamente revertida a sua forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (Pastore *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Concentrações micromolares de glutathiona são encontradas no plasma. A GSH, que não é sintetizada dentro da mitocôndria, mas necessária para seu funcionamento normal, existe em pequena proporção (10 - 15% da GSH celular total) na mitocôndria. Com a ausência de enzimas para a síntese de GSH na mitocôndria, a concentração de GSH mitocondrial é mantida constante via captação do citosol, que por sua vez é frequentemente depletado mais rapidamente do que a matriz mitocondrial e o núcleo (Carretero *et al.*, 2000; Pastore *et al.*, 2003). Esse tripeptídeo é conhecido por atuar no processo de biotransformação de vários metabólitos tóxicos, sendo capaz de reduzir a toxicidade de várias drogas e compostos químicos. Nesse sentido, a GSH vem sendo utilizada em pacientes com câncer para reduzir a toxicidade de alguns quimioterápicos como a cisplatina (Medina, 2001; Moffat *et al.*, 2002; Khyriam e Prasad, 2003; Townsend *et al.*, 2003; Klaunig e Kamendulis, 2004).

ANEXO 8

Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (FACS) após marcação celular com o corante JC-1

A mitocôndria contém duas membranas, a interna e a externa, separadas por um espaço intermembranas. A membrana interna cerca a matriz mitocondrial e é o sítio de transporte de elétrons e síntese de ATP. Sob condições normais, a transferência ativa de elétrons na cadeia de transporte de elétrons resulta na transferência de prótons para fora da matriz, através da membrana interna mitocondrial, gerando o potencial transmembrana mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ (Schimmer *et al.*, 2001). Esse potencial é usado pela ATP sintase para gerar ATP a partir de ADP e é necessário para importar algumas proteínas para a mitocôndria. Um alto $\Delta\Psi_m$ é portanto uma medida de viabilidade mitocondrial. Durante o processo apoptótico, o $\Delta\Psi_m$ pode tanto sofrer um aumento (a mitocôndria torna-se hiperpolarizada) como diminuir inteiramente (a mitocôndria torna-se despolarizada ou o $\Delta\Psi_m$ é perdido). A quebra do potencial ocorre antes que as células exibam fragmentação de DNA ou que a fosfatidilserina seja exposta na membrana celular. Essas observações tornaram-se diretrizes para algumas teorias sobre a liberação do citocromo *c* mitocondrial durante a apoptose (Vermees *et al.*, 2000; Waterhouse *et al.*, 2001). A mitocôndria é uma organela importante na bioquímica da apoptose e sob condições normais, sua membrana interna é quase impermeável para pequenas moléculas, o que permite a criação de um gradiente eletroquímico indispensável para a função mitocondrial. A abertura dos poros de transição de permeabilidade resulta num aumento repentino da permeabilidade da membrana mitocondrial interna para solutos menores que 1500 Da e algumas proteínas. Assim, o potencial transmembrana mitocondrial é perdido bem como as funções associadas à mitocôndria (Gollapudi *et al.*, 2003; Fulda e Debatin, 2003).

A transição de potencial transmembrana mitocondrial que ocorre durante a apoptose pode ser determinada por citometria de fluxo empregando-se diferentes marcadores (fluorocromos). Quando células viáveis são incubadas na presença desses marcadores, eles se acumulam na mitocôndria e o efluxo do fluorocromo, medido pela intensidade de fluorescência celular, reflete a transição do potencial de membrana (Vermees *et al.*, 2000). O processo de despolarização mitocondrial nas células pode ser investigada utilizando-se o corante JC-1, que é um lipídeo catiônico cujo acúmulo na mitocôndria depende do potencial de membrana. O lado de dentro da membrana

mitocondrial interna é carregado negativamente, conseqüentemente fluorocromos lipofílicos catiônicos distribuem-se na matriz mitocondrial e se acumulam na mitocôndria. O JC-1 é um monômero verde-fluorescente e sua ligação à mitocôndria é detectada pelo deslocamento na fluorescência do verde para o vermelho, refletindo sua agregação na mitocôndria, a qual é dirigida pelo potencial de membrana. Assim, a forma agregada do JC-1 predomina quando o potencial de membrana está alto, sendo detectada pela emissão em 590 nm. Alteração na ligação do JC-1 à membrana é refletida pela redução na intensidade de fluorescência no vermelho e em menor extensão no verde. Conseqüentemente, a despolarização da membrana mitocondrial é indicada pela diminuição na razão de intensidade de fluorescência vermelho/verde ($R2/R4$), que depende somente do potencial de membrana (Vermes *et al.*, 2000). A avaliação da razão de fluorescência permite a comparação do potencial de membrana dentro de uma dada população celular que responde ao estímulo aplicado, como por exemplo, o tratamento com um determinado composto.

ANEXO 9

Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect in phosphatases

Bromberg¹, N., Justo², G.Z., Haun², M., Durán^{1,3}, N. and Ferreira², C.V.

¹Biological Chemistry Laboratory, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P.6154, CEP 13083-970, Campinas - S.P., Brazil. ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P.6109, CEP 13083-970, Campinas - S.P., Brazil. ³Núcleo de Ciências Ambientais - NCA, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes - S.P., Brazil.

ABSTRACT

Given the importance of protein phosphorylation in the context of cellular functions, abnormal protein phosphatase activity has been implicated in several diseases, including cancer. These critical roles of protein phosphatases qualify them as potential targets for the development of medicinal compounds that possess distinct modes of action such as violacein. In this work, studies with this natural indolic pigment at a concentration of 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ demonstrated a 20% activation of total protein phosphatase extracted from human lymphocytes. Although no alteration was observed on protein tyrosine phosphatase (CD45), 30% of inhibition was achieved in cytoplasmatic protein phosphatase activity after incubation with 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ violacein. Additionally, 5.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of violacein inhibited 50% the serum tartrate resistant acid phosphatase activity. Violacein presented toxic effect on lymphocytes with the following IC50 values: 3 and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for protein content and protein phosphatase activity, respectively. The findings suggest an important role of protein phosphatases in the mechanisms controlling proliferation and cell death.

Key words: Protein phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase, violacein, lymphocytes, cytotoxicity.

INTRODUCTION

Violacein (figure 1), the major pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, is an indole derivative characterized as 3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one¹. It was extensively studied the biosynthesis and biotransformation of violacein and further optimized its production, extraction and purification^{1,2}.

This pigment has been reported to possess several activities, including bactericidal^{3,4}, trypanocidal^{5,6}, mycobactericidal⁷, as well as antiviral⁸, antiulcerogenic⁹ and antitumoral properties¹⁰⁻¹⁴.

Protein phosphorylation-dephosphorylation is probably the most crucial chemical reaction taking place in living organisms¹⁵. In an average eukaryotic cell, every third protein undergoes reversible phosphorylation^{15,16}. This dynamic equilibrium is a ubiquitous element of intracellular signal transduction pathways that are essential for regulating cell growth, differentiation and metabolism, and survival. Abnormal changes in the activities of these enzymes can lead to severe consequences, including cancer and diseases resulting from immunological disorders¹⁷.

Protein tyrosine phosphatases constitute a large family of enzymes that can be divided into three major subfamilies: tyrosine-specific, dual-specific, and low molecular weight phosphatases. Unlike the tyrosine-specific and low molecular weight phosphatases, which strictly target pTyr-containing proteins, dual-specificity phosphatases utilize protein substrates that contain pTyr as well as pSer and pThr. Protein tyrosine-specific phosphatases (PTPs) can be further divided into two groups: receptor-like (e.g. CD45) and intracellular PTPs. Genetic and biochemical studies have implicated various PTPs as potential targets for drug development in diverse areas such as cancer, hematopoiesis and immune function¹⁸⁻²⁰.

The significant effect of violacein on different tumor cell lines prompted us to evaluate its effect on normal human lymphocytes viability as well as its action in two important phosphatases from these cells, CD45 and low-molecular-weight PTP. T cell express approximately 50-60 different PTPs. CD45, SH2 (Src homology 2 SH2-domain-containing PTP2) and low-molecular-weight PTP have positive roles in signaling through the T cell receptor²¹. The preferential cytotoxic activity of violacein in myeloid leukemia cells alludes to the potential of

violacein to be developed as an anti-leukemic agent¹⁴. Therefore, the establishment of its cytotoxic effects on untransformed cells is of major importance. Given that the active site pockets of phosphatases are very similar among various enzymes in each family, it would be challenging to develop specific inhibitors to probe specific physiological roles played by individual phosphatases in this process. It was therefore of our interest, in the course of the search for new therapeutic agents from natural origin, to study the effects of violacein on protein phosphatases extracted from different sources and also investigate their involvement in violacein cytotoxicity to human blood lymphocytes. The observation of violacein action on these molecular targets, would not only contribute to the elucidation of its mechanism of action, but also to promote a rational and safe use of this natural product for new therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Violacein. *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496) was cultivated on cotton, in modified 1 litre Roux bottles on a surface tray bioreactor according to Rettori and Durán¹. Violacein (3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one) was isolated from *C. violaceum*, purified by

Soxhlet extraction and characterized by proton and carbon-13 NMR spectroscopies, mass spectrometry, UV-VIS spectroscopy and infrared spectroscopy as previously described^{1,4}.

Cells. Peripheral blood was obtained by venipuncture from healthy adult donors and mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque gradient separation. Lymphocytes were washed and resuspended in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum.

Cytotoxicity Assays. Lymphocytes were washed, resuspended in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and plated (1×10^6 cells mL⁻¹) in the presence of 5 µg mL⁻¹ phytohemagglutinin. After incubation for 48 hours at 37°C and 5% CO₂, the cells were treated with different concentrations of violacein (0.1-20 µmol L⁻¹) for 24 hours. Cytotoxicity of violacein was determined by the MTT assay, phosphatase activity and total protein content evaluation as previously described²²⁻²⁶.

Protein Phosphatases extraction from human lymphocytes. Briefly, 1.0×10^6 cells mL⁻¹ were centrifuged at 2000 rpm for 2 minutes and washed with saline solution. The cells were lysed with 1 mmol L⁻¹ acetate buffer, pH 5.5 for 20 minutes with periodic agitation. The

supernatant containing soluble phosphatases, was obtained after centrifugation at 20000 rpm for 30 minutes. The precipitated was resuspended in 1 mmol L⁻¹ acetate buffer, pH 5.5 in Triton X-100 and agitated for 20 minutes for the extraction of CD45.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) partial purification from human blood serum. TRAP was partly purified from fresh human serum of healthy adult volunteers through ammonium sulphate precipitation.

Effect of violacein on protein phosphatases. The assay conditions were utilized as previously described by Freire *et al.* (2003)²⁷, using *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) as the substrate for the enzyme cell extract. Violacein was added to the assay medium and the enzyme activity determined after different periods of incubation. In the absence of violacein the activity was considered to be 100%.

Statistical Analysis. All experiments were performed in triplicate and the results shown in the graphs represent the means \pm standard deviation (SD). To verify significant differences among groups, analysis of variance (ANOVA) was used. When significant difference was obtained, the Tukey test was used to

evaluate the minimal differences among the groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytotoxicity of violacein against human lymphocytes

Based on the important events that protein phosphatases mediate in the control of cell growth and differentiation, Aoyama *et al.* (2000)²⁵ and Freire *et al.*, (2003)²⁷ have proposed the use of phosphatase activity as a tool to evaluate cellular viability in cytotoxicity studies. This complementary parameter also showed to be useful for studying cellular adaptation to apoptosis and oxidative stress among other conditions. Recently, the use of protein phosphatase activity as a cytotoxic parameter has been successfully applied in natural products^{27,29}. Lymphocytes were treated with gradually increasing concentrations of violacein. According to figure 2, it was observed a cytotoxic effect on cells ($IC_{50} > 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) when protein phosphatase activities were evaluated. Kinetic studies with enzymatic extract from HL60 cells and lymphocytes revealed that the predominant phosphatase is a protein tyrosine phosphatase (PTP)¹⁸. Since all PTPs have SH residues in the active site^{27,30}, it is possible that violacein inhibitory effect was due to a modification on sulphhydryl groups. It is also possible

that hydrophobic interactions between violacein and specific domains of the enzyme may contribute to the observed effect.

The cytotoxicity of violacein in human lymphocytes stimulated *in vitro* was also examined by assessing its effect on MTT reduction and protein content (Figure 2). These assays give information about the integrity and susceptibility of different cellular organelles^{31,32}. The cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT to purple formazan by metabolic cells reveals the mitochondrial function through the action of succinate dehydrogenase, involving the pyridine nucleotide cofactors NADH and NADPH³³. The decreased lymphocyte proliferation resulted in a decrease in the total metabolic activity of the cells, as shown in figure 2. The IC₅₀ value obtained (> 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) is in agreement with that determined by the phosphatase assay.

Figure 2 shows the total protein contents measured after the treatment of lymphocytes with different concentrations of violacein and in this case, an IC₅₀ of 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was found. The protein content provides an index of the total cell number based on the determination of the macromolecule content. Thus, it is clear that the decrease in lymphocyte proliferation was due to an inhibitory

effect of violacein. It is important to note that a reduced cytotoxic effect of violacein on normal lymphocytes relative to leukemia cells (IC₅₀ < 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$)¹¹ was observed, suggesting violacein as a promising agent in leukemia therapy.

Effects of violacein on protein phosphatases extracted from human lymphocytes and blood serum

In order to compare violacein action in different sources of phosphatases, total protein phosphatase as well as tartrate-resistant acid phosphatase were extracted from human lymphocytes and blood serum, respectively, and tested in the presence of violacein.

Protein phosphatases (PPs) are important control elements in cell signaling with particular relevance in human diseases, including cancer. Thus, PPs represent promising new target for drug discovery. In this work, 20% activation on total protein phosphatase activity from human lymphocytes was observed after 20 minutes of pre-incubation with 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ violacein (figure 3A). Since the active site (the pTyr-binding site) is highly conserved among the PTPs, next it was evaluated the effects of violacein on isolated receptor-like transmembrane tyrosine phosphatase (CD45) and intracellular

tyrosine phosphatases. At these same conditions, 30% inhibition was achieved for intracellular protein tyrosine phosphatases activity (figure 3B), whereas no alteration was observed on isolated CD45 (data not shown). Alteration on CD45 conformation provoked by its isolation from membrane lipids (lipid rafts), thus affecting the sensibility of this protein to violacein, may explain why activation of total protein phosphatase from human lymphocytes was observed, despite the inhibition of intracellular protein tyrosine phosphatases and the absence of violacein effect on CD45. Recently, Zhang and collaborators have demonstrated that CD45 function can be affected when its interaction with lipid rafts is disrupted³⁴. All PTPs share a common catalytic mechanism to effect catalysis, utilizing the active-site cysteine as a nucleophile in the formation of a thiophosphoryl covalent enzyme intermediate. Despite this fact and unlike receptor-like transmembrane tyrosine phosphatases, which usually contain a tandem repeat of PTP catalytic domains and one of them commonly inactive, intracellular tyrosine phosphatases contain a single catalytic domain and various amino- or carboxy-terminal extensions, including SH2 domains that may have targeting or regulatory

functions. This suggests that violacein exerts diverse *in vitro* effects on these proteins and that the control of intracellular protein tyrosine phosphatases *in vivo* could affect signal transduction pathways on lymphocytes. Considering the higher cytotoxic effect of violacein on human myeloid leukemia cells (HL60) and its ability to induce differentiation and apoptosis in this cell line¹¹, it would be interesting to evaluate the roles of PPs in violacein-induced cell death of leukemic cells.

Osteoclasts, the multinucleated cells that resorb bone during bone remodeling and participate in Ca^{2+} homeostasis, are terminally differentiated cells derived from hematopoietic progenitors. The importance of PTK activity in osteoclast function was underscored by gene-deletion experiments. Other results found that the PTP inhibitors suppress *in vitro* osteoclast differentiation and bone resorption by freshly isolated osteoclasts³⁵. Osteoclasts express high amounts of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), which role in osteoclastogenesis has also been well documented, and secrete it into circulation³⁵. Thus, the effect of violacein on TRAP extracted from human blood serum was studied using different concentrations of violacein. A dose-

dependent effect on TRAP activity was observed, with 50% inhibition after incubation with $5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of violacein for 20 minutes at 37°C (figure 4A). In addition, violacein effect was also time-dependent as shown in figure 4B, when an IC_{50} of $5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ was obtained after 20 minutes of incubation.

Since PTP activity is essential for osteoclast function and that measurement of the level of bone-specific alkaline phosphatase can be used as an index of bone formation and overall bone turnover, we can suggest that TRAP could be a molecular target for violacein to be explored in future experiments.

The findings of this work showed the importance of evaluating the activity of phosphatases from different sources in toxicological studies of new compounds. Further studies are necessary to clarify the mechanisms underlying the effects of violacein on specific PPs involved in cell cycle progression and cell death and their roles in the differential cytotoxicity exerted by violacein in myeloid leukemia cells and lymphocytes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- [1] Rettori, D. and Durán, N. (1998). Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microb. Biot.* **14**, 685-688.
- [2] Bromberg, N. and Durán, N. (2001). Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **11**, 463-467.
- [3] Lichstein, H.C. and Van de Sand, V.F. (1945). Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Infec. Dis.* **76**, 47-51.
- [4] Durán, N., Erazo, S. and Campos, V. (1983). Bacterial Chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Cien.* **55**, 231-234.
- [5] Haun, M., Pereira, M.F., Hoffman, M.E., Joyas, A., Campos, V., Filardi, L.D.S., De Castro, S.L. and Durán, N. (1992). Bacterial chemistry VI. Biological activities and cytotoxicity of 1, 3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Biol. Res.* **25**, 21-25.
- [6] Durán, N., Antônio, R.V., Haun, M. and Pilli, R.A. (1994). Biosynthesis of a Trypanocide of *Chromobacterium*

- violaceum*. *World J. Microb. Biot.* **10**, 686-689.
- [7] De Souza, A., Aily, D.C.G., Sato, D.N. and Durán, N. (1999). Atividade da Violaceína *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **58**, 59-62.
- [8] Andrighetti-Frohner, C.R., Antonio, R.V., Creczynski-Pasa, T.B., Barardi, C.R.M. and Simões, C.M.O. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 843-848.
- [9] Durán, N., Justo, G.Z., Melo, P.S., De Azevedo, M.B.M., Souza-Brito, A.R.M., Almeida, A.B.A. and Haun, M. (2002). Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with β -cyclodextrin. *Can. J. Physiol. Pharm.* **81**, 387-396.
- [10] Melo, P.S., Justo, G.Z., Xavier, A.L., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. and Haun, M. (2001). Apoptosis induction by free co-formulated violacein in HL60 human promyelocytic leukemia cells. *FASEB J.* **15**, A172.
- [11] Melo, P.S., Justo, G.Z., De Azevedo, M.B.M., Durán, N. and Haun, M. (2003). Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* **186**, 217-225.
- [12] Melo, P.S., Maria, S.S., Vidal, B.C., Haun, M. and Durán, N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cell. Dev. B.* **36**, 539-543.
- [13] Durán, N. and Menck, C.F.M. (2001). *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **27**, 201-222.
- [14] Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Duran, N. and Peppelenbosch, M.P. (2004). Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*. **104**, 1459-1464.
- [15] Zolnierowicz, S. (2000). Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1225-1235.
- [16] Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M.P., Fleischer, A. and Rebollo, A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* **85**, 721-726.
- [17] Zhang, Z.Y. (2001). Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 416-423.
- [18] Davidson, D. and Veillette, A. (2001). PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine

- phosphatase, negatively regulates lymphocytes activation by targeting a unique set of substrates. *EMBO J.* **20**, 3414-3426.
- [19] Harrod, T.P. and Justement, L.B. (2002). Evaluating Function of Transmembrane Protein Tyrosine Phosphatase CD148 in Lymphocyte Biology. *Immunol. Res.* **26**, 153-166.
- [20] Ma, X.Z., Jin, T., Sakac, D., Fahim, S., Zhang, X., Katsman, Y., Bali, M. and Branch, R. (2003). Abnormal splicing of SHP-1 protein tyrosine phosphatase in human T cells: Implications for lymphomagenesis. *Exp. Hematol.* **31**, 131-142.
- [21] Mustelin, T., Vang, T. and Bottini, N. (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nature Rev. Immunol.* **5**, 43-57.
- [22] Sodeoka, M. and Baba, Y. (2001). Development of Protein Phosphatases Inhibitors: A Focused Library Approach. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.* **59**, 1095-1102.
- [23] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- [24] Denizot, F. and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 272-277.
- [25] Aoyama, H., Melo, P.S., Granjeiro, P.A., Haun, M. and Ferreira, C.V. (2000). Cytotoxicity of okadaic acid and kinetic characterization of protein tyrosine phosphatase activity in V79 fibroblasts. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 331-334.
- [26] Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- [27] Freire, A.C.G., Aoyama, H., Haun, M. and Ferreira, C.V. (2003). Relationship Between Phosphatase Activity and Cytotoxic Effect of Two Protein Phosphatase Inhibitors, Okadaic Acid and Pervanadate, on Human Myeloid Leukemia Cell Line. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **18**, 425-429.
- [28] Schmidt, A., Rutledge, S.J., Endo, N., Opas, E.E., Tanaka, H., Wesolowski, G., Leu, C.T., Ramachandaran, C., Rodan, S.B. and Rodan, G.A. (1996). Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: Inhibition by alendronate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3068-3073.
- [29] Freire, A.C.G., Melo, P.S., Aoyama, H., Haun, M., Durán, N. and Ferreira, C.V. (2003). Cytotoxic Effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from

- Croton cajucara* on human promyelocytic leukemia cells. *Planta Med.* **69**, 67-69.
- [30] Zhang, Z.Y. and Dixon, J.E. (1993). Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: The determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* **32**, 9340-9345.
- [31] Jones, P.A., Bracher, M., Marenus, K. and Kojima, H. (1999). Performance of the neutral red uptake assay in the COLIPA international validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* **13**, 325-333.
- [32] Rodriguez, J.A. and Haun, M. (1999). Cytotoxicity of transdehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. *Planta Med.* **65**, 522-526.
- [33] Berridge, M.V. and Tan, A.S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482.
- [34] Zhang, M., Moran, M., Round, J., Low, T.A., Patel, V.P., Tomassian, T., Hernandez, J.D. and Miceli, M.C. (2005). CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J. Immunol.* **174**, 1479-1490.
- [35] McAllister, T.N., Du, T. and Frangos, J.A. (2000). Fluid Shear Stress Stimulates Prostaglandin and Nitric Oxide Release in Bone Marrow-Derived Preosteoclast-like Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 643-6448.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Chemical structure of violacein.

Figure 2: Cytotoxicity of violacein in human lymphocytes after 24 hours of incubation. The curves show the effects of violacein on MTT reduction, total protein content and protein phosphatase activity. The inhibition was expressed relative to normal cell viability (100%) and each point represents the mean \pm SD of at least three experiments run in quadruplicate.

Figure 3: Effect of violacein on total protein phosphatases extracted from human lymphocytes. * $p < 0,01$ compared to control (ANOVA, Tukey test).

Figura 4: Effect of violacein on intracellular protein phosphatases extracted from human lymphocytes. * $p < 0,01$ compared to control (ANOVA, Tukey test).

Figura 5: Effect of violacein on tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) extracted from human blood serum. * $p < 0,01$ compared to control (ANOVA, Tukey test).

Figure 6: Relative activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in the presence of $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ violacein. Each point represents the mean \pm SD of at least three experiments run in quadruplicate.

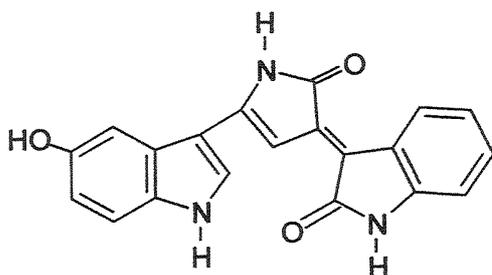


Figure 1

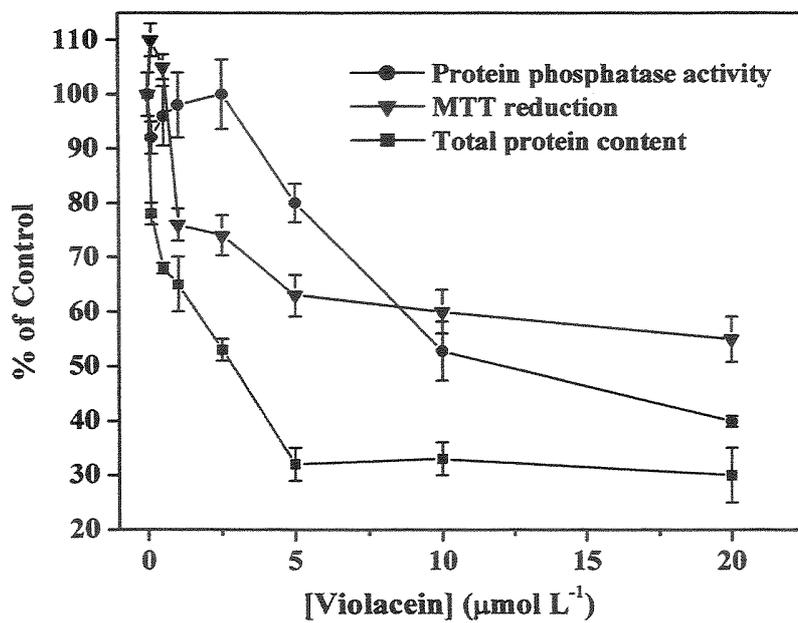


Figure 2

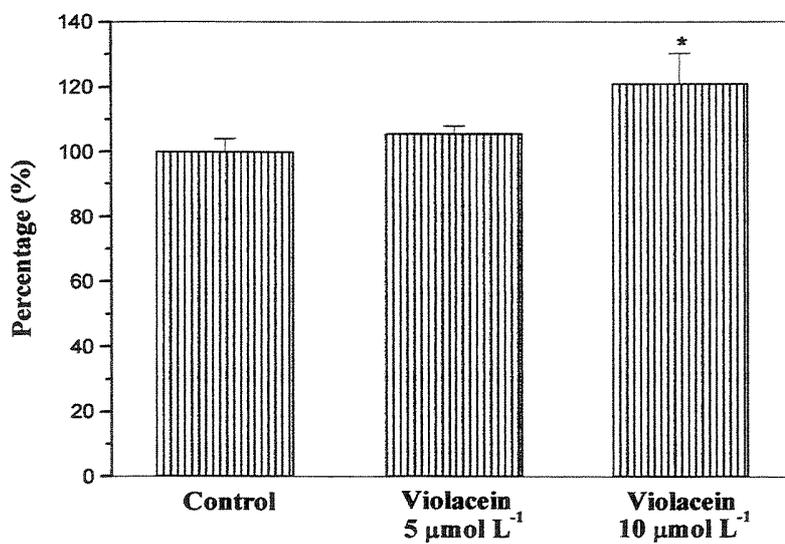


Figure 3

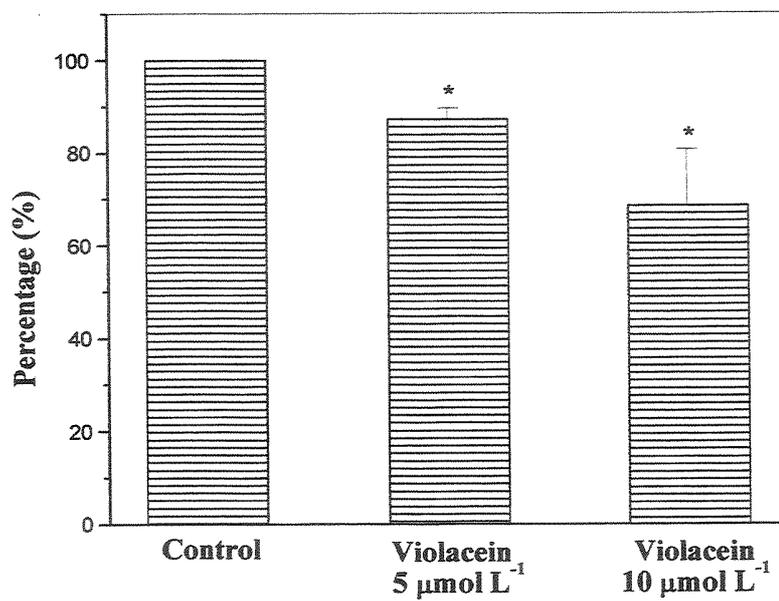


Figure 4

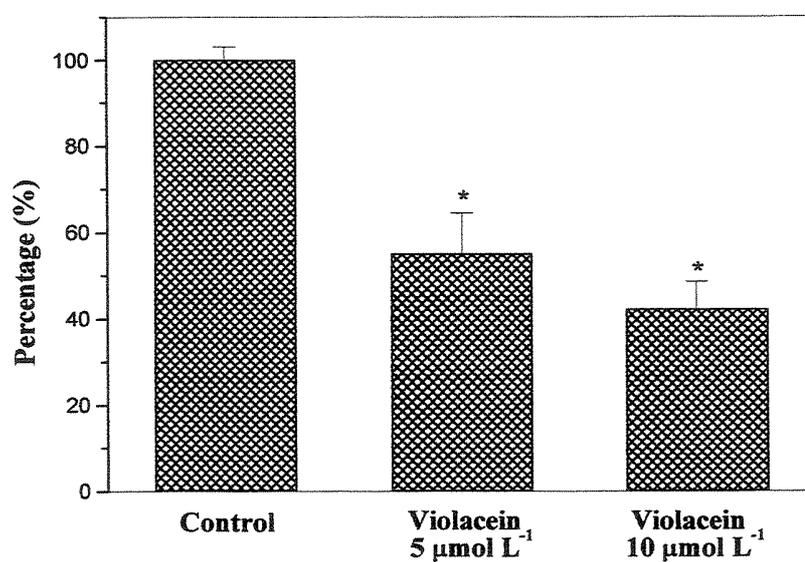


Figure 5

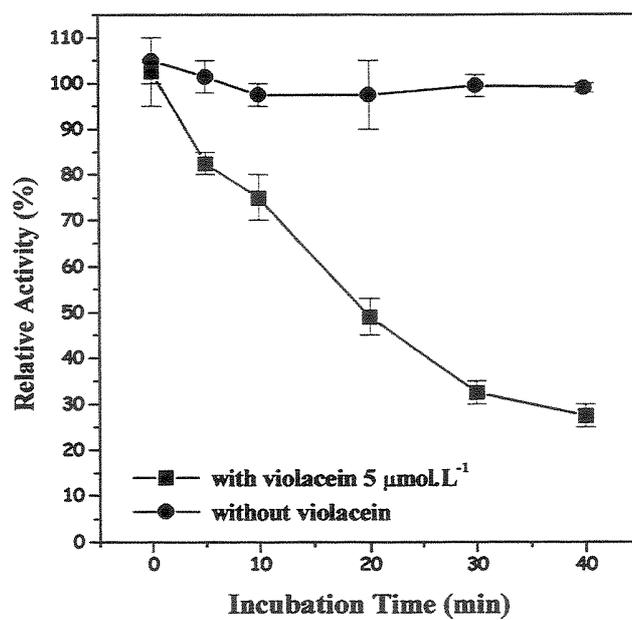


Figure 6