

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

ROBERTA APARECIDA DUARTE

**Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de
adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR
7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens***

ARARAQUARA - SP

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

ROBERTA APARECIDA DUARTE

**Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de
adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR
7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CHRISTIANE PIENNA SOARES

ARARAQUARA - SP

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Duarte, Roberta Aparecida

D812s

Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens* / Roberta Aparecida Duarte. – Araraquara, 2010.

125 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Christiane Pienna Soares

1. Câncer de mama. 2. Alcalóides. 3. Apoptose. I. Soares, Christiane Pienna, orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Christiane Pienna Soares (Orientadora)

Prof.Dr. Haroldo Wilson Moreira (Membro titular)

Profª Drª. Ana Marisa Fusco Almeida (Membro titular)

Profª. Drª. Raquel Alves dos Santos (Membro titular)

Profª Drª. Maria Regina Torqueti Toloí (Membro titular)

Araraquara, 31 de maio de 2010.

DEDICO ESTE ESTUDO,

***Aos meus pais, Cidinha e Duarte,
a minha irmã Fernanda e a minha tia Angela,
fonte inesgotável de estímulo e carinho em todas as etapas desta busca pelo
conhecimento.***

MEUS AGRADECIMENTOS,

À **Profa. Dra. Christiane Pienna Soares**, mestre, por quem tenho profunda admiração, obrigada por me aceitar em seu laboratório, acreditar em mim e possibilitar o desenvolvimento desse projeto. Trabalhar sob sua orientação foi um privilégio, aprendi muito durante todo esse tempo.

Às professoras **Dra. Vanderlan da Silva Bolzani** e **Dra. Dulce Helena Siqueira e Silva** ao pós-doutorando **Luis Otávio Regasini**, do laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, pelo apoio fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Haroldo Wilson Moreira**, por sua disponibilidade irrestrita, paciência, incentivo, sua forma crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, facilitando o alcance dos objetivos deste trabalho.

À **Profa. Dra. Ana Marisa Fusco**, pelo acompanhamento de meu trilhar desde o início deste projeto, compartilhando seus saberes sempre pautados no rigor científico.

À **Fabiana**, pelo grande auxílio dispensado no citômetro de fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

À **Camila Araki** uma pessoa maravilhosa e competente, que esteve sempre presente e auxiliou-me em todos os momentos.

Aos **membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e competência na avaliação deste trabalho.

À **Regina**, pela amizade, carinho e atenção, sempre me apoiando.

Às queridas amigas **Ana Paula, Débora, Rita Karina**, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, muito obrigadas pela amizade, carinho, incentivo, apoio e por toda ajuda.

À todos do laboratório de **Citologia e Biologia Celular**, estagiários e pós-graduandos, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho Aline, Angélica, Camila Olivato, Claudete, Daniele, Felipe, Heloísa, Isabel, Jamile, Juliana, Mauro, Maura, Rochane.

À **Elaine** e a **Tarsia** pela imprescindível colaboração durante a realização deste trabalho, pelo apoio e estímulo, meus afetivos agradecimentos.

Ao **Ederlan** e **Delfina** pelo auxílio nas etapas finais deste trabalho.

À **Maria Isabel** pelo apoio técnico e competência com que trabalha pelo nosso laboratório, e principalmente, pela amizade, carinho, preocupação, incentivo e pela certeza de sempre poder contar com sua sinceridade.

Ao **Max**, com quem compartilhei momentos de angústias, por sempre me ajudar a ver o lado positivo de todos acontecimentos e com isso ter proporcionado importantes momentos de descontração.

Às meninas da pós-graduação **Angela, Cláudia, Laura e Sônia** pela dedicação e competência com que trabalham pelo nosso curso, pelo acolhimento que nos proporciona e, principalmente, pela amizade e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pelo apoio financeiro.

*“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.*

*Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.*

Por isso, meu desejo é que você seja feliz.

Augusto Cury

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é a maior causa de morbidade e mortalidade entre as mulheres no mundo. Pesquisas revelam vários fatores prognósticos e preditivos para a identificação de pacientes com alto risco de agressividade, metastases e doença recorrente na condição de combater estas estatísticas. Por esta razão, é evidente a necessidade do desenvolvimento de estratégias de tratamento mais eficazes. Estudos prévios com *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae), uma planta nativa do Brasil resultou o isolamento de dois alcalóides guanidínicos. Exibiram atividade seletiva direcionada a DNA deficiente de reparo, sugerindo potencial atividade anticâncer. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e apoptose induzidas pelos alcalóides pteroginina (PGN) and pteroginidina (PGD) em linhagem de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo (ZR-7531). **Materiais e Métodos:** As duas linhagens celulares foram tratadas pelos alcalóides em várias concentrações (0.25 – 10 mM) em dois tempos, t0 (24h) e t24 (24h seguido por 24h pós-tratamento). O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo teste de MTT; a morte celular (apoptose e necrose) foi analisada usando os métodos Hoechst 33342/iodeto propídio, Kit de Anexina V-FITC e atividade de Caspases 3/7. **Resultados:** Os tratamentos com os alcalóides demonstraram citotoxicidade concentração-resposta nas linhagens de câncer de mama. Para avaliação da apoptose foi observado um intenso efeito concentração-resposta em apoptose tardia/necrose e discreto sinal para apoptose precoce em todas concentrações ($p < 0,01$). No ensaio Hoechst/iodeto, observou diferença significativa entre os estágios de apoptose precoce e tardia de ambas linhagens. A pteroginina no período t0 e t24, e pteroginidina no período t0 demonstraram possuir intenso efeito concentração resposta para apoptose tardia e discreto efeito para apoptose precoce em todas as concentrações ($p < 0,01$). Entretanto a linhagem MCF-7 tratada com pteroginidina (t24) demonstrou intenso efeito concentração-resposta para necrose ($p < 0,01$). Atividade de caspase 3/7 foi significativamente maior na concentração de 1,125 mM com pteroginina por t0 ($p < 0,05$). **Conclusão:** Podemos concluir que PGN e PGD possuem efeito anticarcinogênico contra células de câncer de mama *in vitro*, induzindo a morte celular programada.

Palavras-chave: linhagem cancer de mama, atividade citotóxica, alcalóides, apoptose, necrose, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a major cause of morbidity and mortality among women worldwide. Research has elucidated several specific prognostic and predictive factors to identify patients at high risk of the aggressive disease, metastasis and recurrence of the disease in order to combat these statistics. For this reason, there is an obvious need to develop more efficacious treatment strategies. Previous studies on *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae), a native plant of Brazil, resulted in the isolation of two guanidine alkaloids, exhibited selective activity towards a DNA repair-deficient, suggesting potential anti-cancer activity.

Objective: The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity and apoptosis induced by alkaloids pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) in human adenocarcinoma cell line (MCF-7) and human invasive ductal carcinoma cell line (ZR-7531). **Material and Methods:** The two cell lines were treated by both alkaloids at several concentrations (0.25 – 10 mM) and two time points, 24h (t0) and 24h followed by 24h pos-treatment (t24). The cytotoxicity assay was determined by MTT assay; the cell death (apoptosis and necrosis) were analyzed using the dye Hoechst 33342/propidium iodide, Annexin V-FITC and Caspase 3/7 activity. **Results:** The treatments with the alkaloids demonstrated cytotoxicity effect concentration-response in breast cell lines. Apoptosis evaluation, pterogynine and pterogynidine has an intense effect concentration-response of late apoptosis/necrosis and a discrete signal of early apoptosis in all of the concentrations ($p < 0.01$). Hoechst/iodide assay, it was observe significant difference among the stages of early and late apoptosis in the both cells lines. Pterogynine for the period of t0 and t24, and pterogynidine for the period of t0 demonstrated to possess an intense concentration-response effect for late apoptosis and discrete effect for early apoptosis in all concentrations ($p < 0.01$). Moreover, the cell line MCF-7 treated with pterogynidine (t24) showed intense effect-dose response for necrosis ($p < 0.01$). Caspase 3/7 activity was significantly higher at concentration 1.125 mM ($p < 0.05$). **Conclusion:** We can conclude that PGN and PGD have effective anti-carcinogenic effect against human breast cancer cells *in vitro*, inducing programmed cell death.

Keywords: Breast cancer cell line, cytotoxic activity, alkaloids, apoptosis, necrosis, flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos alcalóides Pteroginidina e Pteroginina isolados de <i>Pterogyne nitens</i>	25
Figura 2.	Características morfológicas de apoptose e necrose.....	27
Figura 3.	Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca.....	30
Figura 4.	Sinalização e modulação das caspases	33
Figura 5.	Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas na membrana mitocondrial	35
Figura 6.	Translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana plasmática	37
Figura 7.	Reação da Caspase-GLO™ 3/7.....	51
Figura 8.	Ensaio de citotoxicidade MTT.....	55
Figura 9.	Ensaio de citotoxicidade MTT	56
Figura 10.	Ensaio de citotoxicidade MTT.....	59
Figura 11.	Imagem em microscópio invertido da linhagem MCF-7	61
Figura 12.	Imagem em microscópio invertido da linhagem ZR 7531	62
Figura 13.	Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V	

	conjugada com FITC e iodeto de propídio	65
Figura 14.	Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio.....	67
Figura 15.	Ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst Iodeto.....	69
Figura 16.	Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio	71
Figura 17.	Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio	72
Figura 18.	Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio	74
Figura 19.	Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio	75
Figura 20.	Ensaio de apoptose por luminescência por ativação da caspase 3/7.....	77
Figura 21.	Ensaio de apoptose por luminescência por ativação da caspase 3/7	78

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
µg	micrograma
ATP	adenosina trifosfato
dATP	adenosina difosfato
DAF	Diacetato de Fluoresceína
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
PS	Fosfatidilserina
PSox	Fosfatidilserina oxidada
HO	Hoechst
IP	Iodeto de Propídeo
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	mili Molar
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
PBS	Tampão Salina Fosfato
REA	Relação Estrutura Atividade
SFB	Soro Fetal Bovino
VAC-α	Proteína vascular anticoagulante-α

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. CÂNCER DE MAMA	18
1.2. TERAPIA ANTICARCINOGÊNICA	18
1.3. ALCALÓIDES PTEROGNIDINA E PTEROGININA	23
1.4. MORTE CELULAR - APOPTOSE E NECROSE	23
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVO GERAL	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DA PTEROGININA E PTEROGINIDINA	44
3.2. CULTURA DE CÉLULAS	45
3.3. TRATAMENTO DAS LINHAGENS	46
3.4. CITOTOXICIDADE (MTT)	47
3.5. ENSAIOS DE APOPTOSE	48
3.5.1. CITOMETRIA DE FLUXO (ANEXINA V)	48
3.5.2. MÉTODO DO HOECHST E IODETO	49
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS	53
4.1. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PARA PTEROGININA E PTEROGINIDINA	54
4.2 ENSAIO DE ANEXINA V - CITOMETRIA DE FLUXO	63
4.3 ENSAIO DE HOESCHT/ IODETO	68
4.4 ENSAIO DA CASPASE 3/7	76
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

CAPÍTULO 2 **126**

ARTIGO CIENTÍFICO **127**

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é considerado o segundo tipo de neoplasia mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres em incidência, prevalência e mortalidade (BERNSTEIN *et al.*, 1999; BRASIL, 2009; BRAY *et al.*, 2004; FERRINI *et al.*, 2001; MALORNI *et al.*, 2006; KOIFMAN *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002). Entretanto, ocorrendo variações entre os países, sendo mais freqüente em alguns países Europeus, na América do Norte e alguns países Sul-Americanos (BRAY *et al.*, 2004).

No Brasil é a primeira causa de morte entre as mulheres, exceto na região norte, onde prevalece o câncer de colo uterino, e os estados mais desenvolvidos e mais industrializados como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, apresentam maior incidência desta doença (BRASIL, 2009; PAIVA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). De acordo com o Instituto Nacional do câncer dos 235 mil novos casos de câncer estimados para o sexo feminino em 2009, 49.400 são de câncer de mama, sendo que este tipo de tumor foi o que mais aumentou entre as mulheres nos últimos anos (Brasil, 2009). A alta incidência está relacionada a diferença sócio econômica, fatores reprodutivos, hormonais e nutricionais. Em países com maiores recursos o rastreamento mamográfico afeta consideravelmente o diagnóstico, incidência e mortalidade por câncer de mama, e o diagnóstico tardio entre as mulheres pertencentes às classes de menor poder aquisitivo (ABREU & KOIFMAN, 2002; BRAY *et al.*, 2004; PARKIN *et al.*, 2005).

1.2. TERAPIA ANTICARCINOGÊNICA

A transformação maligna da célula mamária normal é um processo multi-passos que envolvem mudanças na atividade de diferentes genes e proteínas,

resultando na perda do controle do ciclo celular e de um programa de diferenciação. Estes eventos celulares são geralmente mútuos e exclusivos, e são regulados por programas genéticos específicos, controlados pela ação seqüencial e cooperativo de fatores de transcrição. O estrógeno é um regulador do crescimento e diferenciação das células epiteliais da glândula mamária normal e tem um papel crítico no desenvolvimento da transformação maligna (MESTER & REDEUILH, 2008). Oncogenes específicos tem sido identificados em tumores esporádicos, em outras palavras, numerosos genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular são amplificados, superexpressos ou ativados, como c-Myc, ciclina D1, MDM2, HER-2 (LACROIX *et al.*, 2006). A atividade desses genes/proteínas são freqüentemente controlados direta ou indiretamente por estrógenos. Pouco se sabe sobre a iniciação dos eventos genéticos, que dispara a transformação maligna das células epiteliais mamárias, com exceção da forma hereditária (perda heterozigidade BRCA1 ou BRCA2) (MESTER & REDEUILH, 2008).

Dentre as proteínas que rigorosamente controlam o ciclo celular, a proteína p53 exerce importante função na atividade supressora de tumor por dois mecanismos: interrupção da proliferação e indução da morte celular programada (BOLASÉLL *et al.*, 2000; THOMPSON, 1993; VOUSDEN, 2002). Assim, a p53 atua na proliferação celular, permitindo que sejam reparados danos espontâneos ou induzidos durante as fases G1-S do ciclo celular (BOLASÉLL *et al.*, 2000). Se houver falha dos mecanismos de reparo, os níveis de p53 aumentam e as células são encaminhadas para apoptose. Nos tumores, mutações no gene P53 resultam na tradução de proteínas mutantes incapazes de corrigir danos genômicos e/ou levar a célula a apoptose (ALMEIDA *et al.*, 2004; VAGUNDA *et al.*, 2006). No câncer de mama, o aumento da expressão de p53 mutante reflete a agressividade do tumor,

acumulando-se nas células neoplásicas, o que implica na perda da principal via de indução de apoptose (ALMEIDA *et al.*, 2004, FEKI E IRMINGER-FINGER, 2004).

As células tumorais adquiriram diversas maneiras de escaparem do processo de apoptose, quer por desregulação de mecanismos intracelulares ou por uma resposta imunológica ineficiente. O mais importante é a evidência de que mudando uma dessas condições, a morte celular por apoptose possa ser restabelecida (ZASLAU *et al.*, 2004; RIGGS *et al.*, 2005; BRAULT *et al.*, 2005).

As pesquisas com câncer de mama estão focadas na detecção e classificação do tipo de tumor, associados a biomarcadores que informe o comportamento biológico como uma implementação diagnóstica para prognóstico e prever estratégias terapêuticas. Vários marcadores descobertos nas últimas três décadas incluem fatores relacionados a diferentes funções celulares, como proliferação, apoptose, regulação hormonal, angiogênese, invasão e metástase (THOMADAKI *et al.*; 2007). Recentes pesquisas suportam a hipótese do papel central da apoptose na tumorigênese. Células malignas são caracterizadas pela redução da capacidade de sofrer apoptose na resposta a vários estímulos. A inativação do caminho pró-apoptótico ou ativação do caminho anti-apoptótico resulta na falha apoptótica, promovendo a sobrevivência das células transformadas (HANAHAN & WEINBERG, 2000; MORRISON *et al.*, 2008).

Portanto, o desenvolvimento do câncer está associado ao rompimento do equilíbrio entre o crescimento e morte celular. O balanço entre a taxa de proliferação e de morte celular programada determina a taxa de crescimento do tumor. E alguma alteração entre esses dois fatores pode ser o elemento chave para a expansão descontrolada de tumores malignos e posteriormente, sua capacidade de invasão (HAJRA & LIU, 2004; MESTER & REDEUILH, 2008).

O tratamento é um dos maiores desafios médicos da atualidade com avanços nas últimas décadas. As modalidades utilizadas clinicamente contra o câncer de mama como remoção cirúrgica do tumor, seguido por radioterapia e principalmente quimioterapia e/ou hormônio terapia, são agentes anti-proliferativos sistêmicos que destroem preferencialmente células em divisão (BRACKE, *et al.*, 2008; KOMEN *et al.*, 2008; MARSH & LIU, 2009; XU & MCLEOD 2001). Contudo, esses fármacos não são seletivos para células cancerosas e sua eficácia terapêutica fica limitada devido ao dano que podem causar às células e tecidos normais.

Alguns agentes quimioterápicos, além de interromper o metabolismo celular, são capazes de induzir alquilação do DNA, bem como reestabelecer o processo de apoptose (TAKEI *et al.*, 2005). Drogas anticarcinogênicas podem atuar por diferentes mecanismos, impedindo a capacidade proliferativa celular. Essas drogas podem atuar em elementos do citoesqueleto, prejudicando a divisão celular, promover citotoxicidade capaz de destruir a célula por necrose ou apoptose (MARSH & LIU, 2009; NOBILI *et al.*, 2009; ROSALES-HERNANDEZ *et al.*, 2009).

As quimioterapias convencionais causam intensos efeitos colaterais, com taxa de sucesso limitada devido à concentração insuficiente da droga, alta toxicidade sistêmica, ausência de seletividade, além de colaborarem para resistência desses tumores após tratamento prolongado. Para superar tais limitações desses agentes algumas estratégias têm sido utilizadas para que estes quimioterápicos possam ser ativados seletivamente no tecido tumoral (XU & MCLEOD 2001). Dessa forma, estudos com substâncias naturais podem colaborar para o maior entendimento da capacidade das mesmas em permitir a modulação de sinais de apoptose (NOBILI *et al.*, 2009).

Atualmente o mundo é direcionado ao uso de substâncias naturais presentes em frutas, vegetais, óleos essenciais herbáceos (FARR, 1997; WANG *et al.*, 1997; KITTS *et al.*, 2000). Acredita-se que diversas dessas substâncias apresentem potencial valor na prevenção ao câncer ou atuem como agentes terapêuticos, induzindo a morte programada diferentemente do que ocorre com a maioria das terapias utilizadas atualmente (SON *et al.*, 2003). Estas drogas são citotóxicas, pró-apoptóticas e não seletivas, sendo tóxicas para as células normais e levando ao paciente às inumeráveis reações adversas (ARKIN, 2005). Sendo assim, muitos estudos desenvolvem uma relação entre substâncias naturais e determinados cânceres, a fim de identificar um agente potencialmente anticancerígeno, porém mais seletivo (DUMONT *et al.*, 2007).

Em face da necessidade de se encontrar novas drogas, têm-se procurado identificar compostos isolados de plantas brasileiras capazes de conter a proliferação celular. Outro desafio é encontrar compostos que induzam morte de células malignas, sem, contudo, ocasionar elevada citotoxicidade em células não neoplásicas.

A investigação da atividade anticarcinogênica de flavonóides e alcalóides isolados de plantas do Cerrado e Mata Atlântica brasileira é de fundamental relevância, considerando que esses compostos parecem demonstrar potente atividade antiproliferativa e citotóxica (LIU *et al.*, 2004; KITAJIMA *et al.*, 2006). Substâncias purificadas de diversas plantas oriundas das florestas ciliares e do Cerrado brasileiro têm apresentado quantidades variáveis de alcalóides, terpenos e flavonóides (URREA-BULLA, *et al.*, 2004, NEHEME *et al.*, 2002). Estudos prévios com plantas dessa região do Brasil demonstram que alcalóides e terpenos possuem atividade biológica antifúngica, antiproliferativa e indutora de genotoxicidade

(MAISTRO, *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 1998). Em contrapartida, a presença de flavonóides nesses extratos vegetais pode funcionar como imunostimuladores (GUPTA, *et al.*, 2001). Entretanto poucos estudos têm sido dirigidos para avaliar se compostos extraídos de plantas do Cerrado brasileiro poderiam apresentar atividade anti-tumoral, especialmente avaliando a indução de apoptose.

1.3. ALCALÓIDES PTEROGINIDINA E PTEROGININA

Entre as plantas brasileiras, *Pterogyne nitens* pertence a família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae, é a única espécie do gênero e representa uma fonte de inúmeros alcalóides guanidínicos citotóxicos (BOLZANI & KINGSTON, 1995). É uma planta pouco estudada e que possui inúmeros tipos de flavonóides e alcalóides. Popularmente conhecida como amendoim, amendoim-bravo, amendoim-do-cerrado, viraró, madeira nova, pau-amendoim, óleo-branco, pau-de-fava (FERNANDES *et al.*, 2008, REGASINI *et al.*, 2008). Apresenta-se como uma espécie arbórea perene ereta de folhas glabras, de 10-15m de altura, sendo nativa da América do Sul. Propaga-se por sementes, contudo expande-se no local através de brotações de suas raízes, formando grandes reboleiras. Na América Latina essa espécie ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e Cerrado compreendida entre o Ceará até o Paraná (BUKART, 1952). É típica da floresta semidecídua da Bacia do Paraná, que se perpetua nas áreas após o desmatamento, vindo a germinar e rebrotar intensamente nas pastagens implantadas no local, tornando-se indesejável. Seu maior inconveniente é o caráter tóxico das folhas novas de suas brotações que podem ser ingeridas pelo gado bovino. Muito prolífica e persistente, pode ser encontrada em

grandes densidades mesmo após dezenas de anos de desmatamento (LORENZI, 2000).

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. O estudo sobre a composição micromolecular das flores foi bastante significativo para o registro do perfil metabólico da espécie. Desse estudo foram isolados e identificados onze constituintes: quatro flavonóides, quatro fenilpropanóides, dois alcalóides guanidínicos e o ácido gálico (REGASINI *et al.*, 2008 a e b).

A identificação de todas as substâncias foi realizada com base na comparação de dados espectroscópicos. A análise dos espectros permitiu caracterizar as substâncias em estudo. A análise dos dados dos alcalóides guanidínicos (pteroginina e pteroginidina) possuem de estruturas bastante similares. Entre outras características destacam-se a presença de sinais típicos de carbono guanidínico e um conjunto de cinco sinais relacionados às subunidades isoprenílicas ou terpências, indicando que pteroginina e pteroginidina apresentam um núcleo guanidínico substituído por unidades hemiterpenoídicas.

Da mesma forma, dados similares caracterizaram a estrutura da pteroginidina, como sendo um alcalóide guanidínico-prenilados, a única diferença entre os alcalóides pteroginina e pteroginidina deve-se, portanto, ao padrão de substituição do núcleo guanidínico. No alcalóide pteroginina o sinal atribuído aos hidrogênios H-1', apresenta-se como um dubleto devido ao acoplamento com H-2' e adicionalmente, a ausência do hidrogênio azometínico na estrutura alcaloídica indicou o padrão *N,N* dissustituído que foi caracterizado como sendo a pteroginina.

No alcalóide pteroginidina, a presença de um tripleto devido ao acoplamento do hidrogênio azometínico do núcleo guanidínico com H-1' da unidade

hemiterpênica indicou que a substituição terpênica ocorre nos nitrogênios vicinais da estrutura guanidínica. A análise de todos os dados indica que possui padrão *N,N'* de substituição isoprenílica. Fundamentado nestas observações, a substância foi caracterizada como a pteroginidina, um isômero constitucional do alcalóide pteroginina (REGASINI, *et al.*, 2008; BOLZANI *et al.*, 1995).

A estrutura química dos alcalóides de pteroginidina e pteroginina (Figura 1) possui grupamentos aminas primárias, secundárias e terciárias. A pteroginidina apresenta padrão de substituição isoprenílica do tipo *N,N*-diisoprenil o que confere menor polaridade e menor hidrossolubilidade em relação a pteroginina, cujo padrão de substituição é do tipo *N,N*-diisoprenil. Estes apresentam estruturas moleculares simples e expressiva bioatividade, sendo valiosos modelos para estudos de síntese total e de relação estrutura atividade (REGASINI, *et al.*, 2008; BOLZANI *et al.*, 1995).

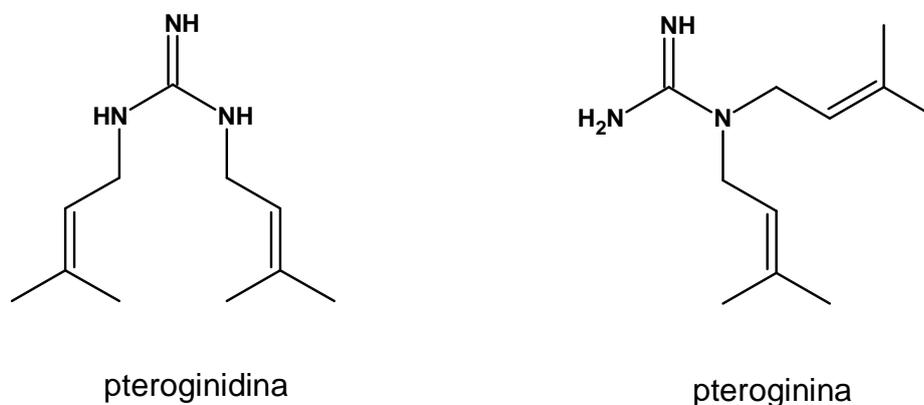


Figura 1. Estrutura química dos alcalóides pteroginidina e pteroginina isolados de *Pterogyne nitens*.

1.4. MORTE CELULAR – APOPTOSE E NECROSE

Múltiplos sinais modulam a proliferação celular, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência (FOSTER, 2008; MESTER & REDEUILH, 2008). Entretanto, as células

tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. De modo geral, estímulos tóxicos ou deletérios a célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (BAYLY *et al.*, 1997; COTRAN, *et al.*, 2000; FOSTER, 2008; KUWANA & NEWMAYER; 2003).

O termo apoptose foi originalmente usado referindo-se a um padrão de morte celular com características morfológicas distintas da necrose (DESAGHER & MARTINOU, 2000). A necrose é definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS *et al.*, 2005). Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina e a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos (UCHIYAMA, 1995). Há alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, que tem como conseqüência comprometimento da bomba de Na⁺/K⁺ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes (TRUMP *et al.*, 1997). Isso resulta no rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD *et al.*, 2007, KERR *et al.*, 1995). Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (Figura 2) (KERR *et al.*, 1994).

Não há evidência de remodelamento de cromatina durante a necrose, e a célula entra em citólise imediata, com digestão aleatória do DNA, cariólise e perda da integridade da membrana plasmática. A citólise é a estágio final da decadência celular evidente no processo de necrose (SARASTE & PULKKI, 2000; JEFFREY, 2000; MELLO *et al.*, 2001; HAIL *et al.*, 2006).

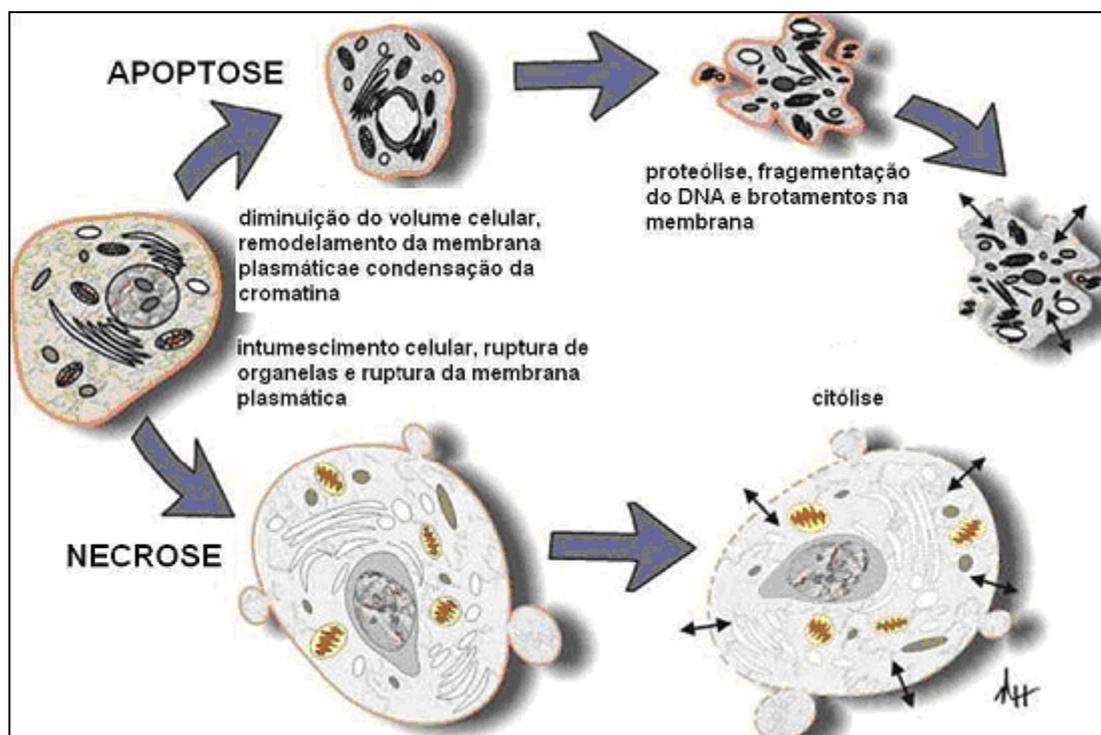


Figura 2. Características morfológicas de apoptose e necrose. (Figura extraída e modificada de HAIL *et al.*, 2006).

Em contrapartida, a apoptose é um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (BERGANTINI *et al.*, 2005; BRAS *et al.*, 2005). É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (Figura 2) (LAVIN, 1993; LIAO *et al.*, 2005; YASUHARA *et al.*, 2003).

A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte (por exemplo, estresse oxidativo, erros no DNA, desbalanço iônico e presença de citocinas). Esta primeira fase pode influenciar a eficácia das fases seguintes (efetora e de degradação). A fase efetora há ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam dessa fase. A fase de degradação, na qual a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas características desse processo (GREEN & KROEMER, 1998).

As características ultraestruturas típicas da apoptose são resultantes dos eventos ocorridos nas fases efetora e de degradação: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, cariorex, e eventuais brotamentos nas membranas, formando corpos apoptóticos (KROEMER *et al.*, 2007; HAIL *et al.*, 2006).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: 1) Apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) Apoptose mediada pela mitocôndria denominada via intrínseca (HAJRA & LIU, 2004; HAIL *et al.*, 2006). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (HAJRA & LIU, 2004; ZHANG *et al.*, 2004).

A via extrínseca é iniciada por associação de monômeros de diferentes receptores de morte na membrana plasmática e, ao se agruparem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (COHEN, 1997; HAIL *et al.*, 2006). Dentre

os receptores na membrana plasmática, o receptor fas/CD95 recruta procaspase 8 e/ou procaspase 10, e a conseqüente elevação nos níveis de procaspases próxima a membrana garantem interação dessas caspases inativas com proteínas adaptadoras associadas a fas/CD95. A interação desse complexo protéico promove a autocatálise das procaspases que se tornam nesse momento em caspases iniciadoras ativadas. A ativação proteolítica seqüencial de outras caspases culmina na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7 que estão no citoplasma (HAJRA & LIU, 2004). Ainda, a ativação de outros receptores de morte na membrana plasmática, especialmente do receptor de estresse celular, bem como a ação das caspases iniciadoras 8 e 10, integram sinais de apoptose de via extrínseca aqueles de via intrínseca (HAJRA & LIU, 2004; HAIL *et al.*, 2006). Assim, é preciso avaliar sinais na membrana plasmática capazes de agir sinérgicamente com sinais mitocondriais, na indução de apoptose (Figura 3).

Na via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocôndrial externa. O caminho mitocondrial pode ser ativado por vários estímulos incluindo hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, deprivação de fatores de crescimento e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas oligomerizam e induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial através da formação de canais que causa a liberação e redistribuição de pequenos íons, solutos, metabólitos, citocromo *c* e da proteína 14-kDa carreadora de elétrons da cadeia respiratória para o citosol. BELIZÁRIO *et al.*, 2007; ANTONSSON *et al.*, 2004). O citocromo *c* liberado no citosol é necessário como co-fator e rapidamente se associa com a região C-terminal a uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação ao dATP e pro-caspase 9 formando um complexo chamado de apoptossomo,

e através da clivagem proteolítica a caspase 9 se torna ativa e subseqüentemente ativando outras caspases (GREEN & KROMER, 1998; PARONE *et al.*, 2002; THORBERRY & LAZEBNIK, 1998; VANDER HEIDEN & THOMPSON, 1999; WATERHOUSE *et al.*, 2002) (Figura 3 e 4). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínseca são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7. (HAIL *et al.*, 2006).

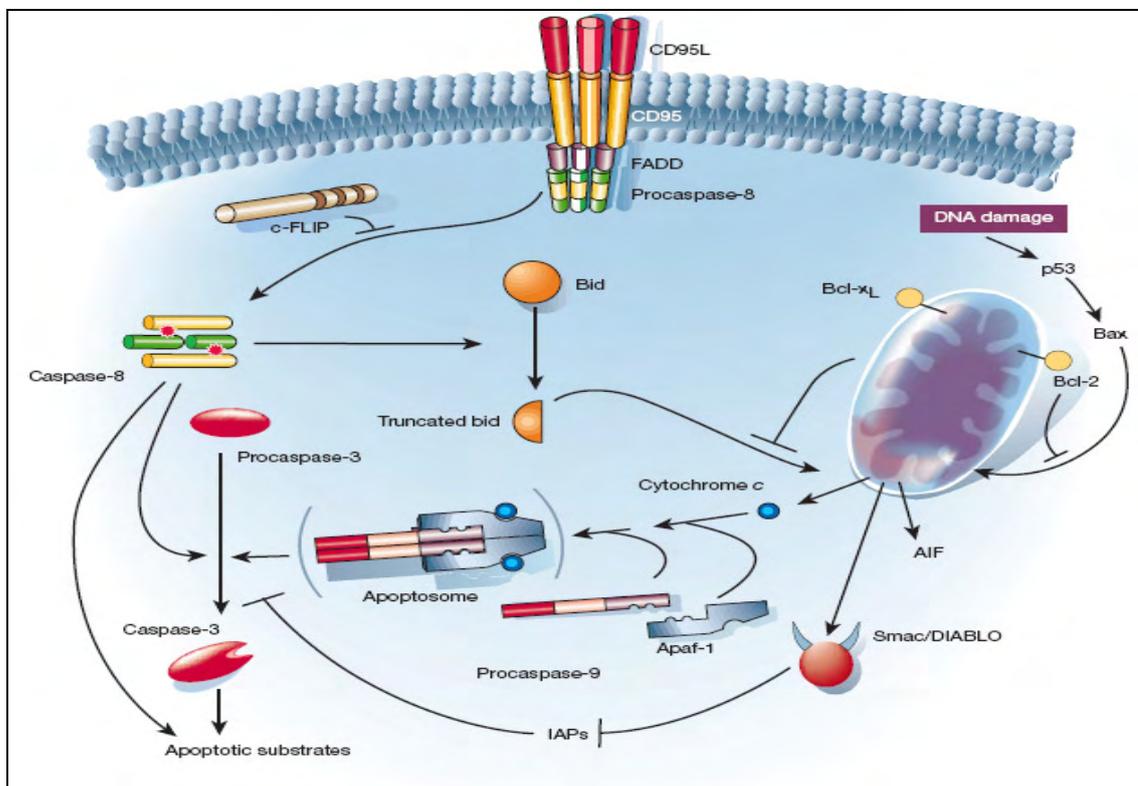


Figura 3. Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca. (Extraído e modificado de HENGARTNER, 200).

Já foram caracterizadas mais de doze isoformas de caspases e aproximadamente dois terços destas enzimas apresentam função no processo de apoptose. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose e

são denominadas de iniciadoras (caspases 8 - 9 e 10) e efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

As caspases (*Cystein-dependent aspartate-especific protease*) clivam seus alvos nos resíduos de ácido aspártico. Como mecanismo de proteção contra ativação inadvertida, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (HENGARTNER 2000). As pró-enzimas (30 – 60 kDa) contém 3 domínios: um domínio aminoterminal, uma subunidade menor de 10 kDa (cadeia β interna) e uma subunidade maior, com 20kDa (cadeia α externa). A forma ativa da enzima possui duas subunidades maiores e duas menores é um tetrâmero $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2$, entre as quais forma dois sítios ativos da enzima (EARNSHAW *et al.*, 1999). A ativação envolve processo proteolítico, com formação de heterodímeros entre as subunidades menor e maior (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

As caspases clivam proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, incluindo gelsolina, fodrina, Gas-2, proteína quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase p21, isoformas da proteína quinase C e Mekk-1. A destruição da rede de microtúbulos provoca o arredondamento e deslocamento da célula do tecido. Várias alterações do núcleo apoptótico são dependentes da ação da caspase-6, caspases que degradam as laminas A, e C do envólucro nuclear. O rompimento dessas estruturas parece facilitar o acesso e degradação das fitas de DNA na região internucleossomal pela nuclease CAD (caspase activated deoxyribonuclease). Em células não apoptóticas, CAD está presente como um complexo inativo com ICAD (inhibitor of casapase activated deoxyribonuclease). Após a indução da apoptose, ICAD é inativada pelas caspases 3 e 7, deixando CAD livre para funcionar como uma nuclease (Figura 4) (ENARI *et al.*, 1998).

Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO que atua inibindo as IAPs de bloquear a atividade das caspases. As IAPs pertencem uma família de proteínas com atividade anti-apoptótica que atuam inibindo as caspases. Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (GRIVICICH, 2007). A ação das caspases também é regulada através do bloqueio do complexo DISC por uma proteína inibidora dos receptores de morte c-FLIP_L, c-FLIP_S, and c-FLIP_R. Essas proteínas são alvos de estudo na modulação farmacológica na morte celular (Figura 4) (LAVRIK *et al.*, 2005).

A permeabilização de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c são fundamentais para os sinais de via intrínseca, as quais dependem da modulação de proteínas anti e pró-apopticas da família bcl-2 (TJALMA *et al.*, 1998).

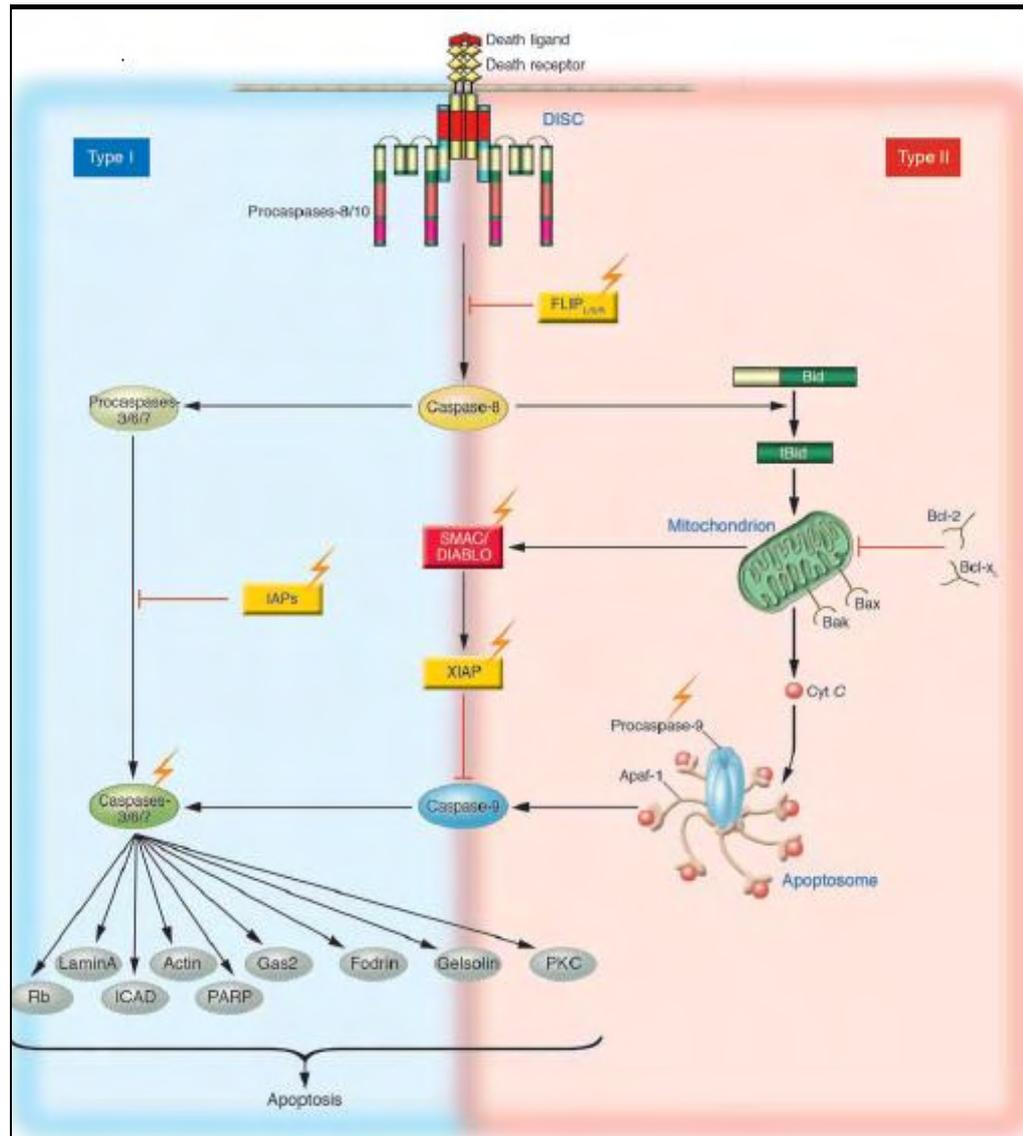


Figura 4. Sinalização e modulação das caspases. Complexo DISC inibido pelas proteínas c-FLIP proteins; inibição das caspases efetoras pelas IAPs (amarelo). Alvos para ação farmacológica (laranja). Extraído e modificado de LAVRIK *et al.*, 2005.

A família bcl-2 possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Dentre essas proteínas, bax, bak, bcl-Xs, bok, bad, bid exercem função pro-apoptóticas enquanto as proteínas bcl-2, bcl-XL, bl-w, mcl-1 têm função anti-apotótica. Na mitocôndria, durante a apoptose, algumas modificações dessas proteínas podem ocorrer (ZHANG *et al.*, 2004). É conhecido

que, durante a apoptose, membros da família Bcl-2 podem ser fosforilados (bcl-2 e bad), clivados (bid) e podem ter mudanças de conformação e oligomerização (bax e bak). Os sinais mitocondriais anti ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz, respectivamente, a sobrevida ou morte celular programada (CHAN & YU, 2004). A interação de proteínas anti e pró-apoptóticas, ocorre por domínio hidrofóbicos gerados por a hélices de BH1, BH2 e BH3 membros da família bcl-2 que interage com domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas (BRAS *et al.*, 2005). Proteínas BH3 (Bid e Bim), interagem com proteínas pró-apoptóticas da família bcl-2, como Bak e Bax e essa interação induz a ativação/oligomerização (KUTUK & BASAGA, 2006). Assim, no equilíbrio anti e pró-apoptótico são modulado por vias que se complementam, nas quais ocorre a associação das proteínas Bcl-2/Bax e Bcl-xL/Bak. Se o estímulo for anti-apoptótico, a ligação de Bcl-2/Bax e Bcl-xL/Bak é mantida, impedindo a formação do poro na membrana mitocondrial e liberação de citocromo-c e das IAPs. Entretanto, por estímulo pró-apoptótico, a ativação de Bax e Bak ocorre pela forma clivada de Bid (tBid), seguida da oligomerização Bax e Bak na membrana mitocondrial, com subsequente liberação das proteínas apoptogênicas (citocromo c) e consequente indução de morte celular (PETROS *et al.*, 2004; BRAS *et al.*, 2005; KUTUK & BASAGA, 2006) (Figura 5).

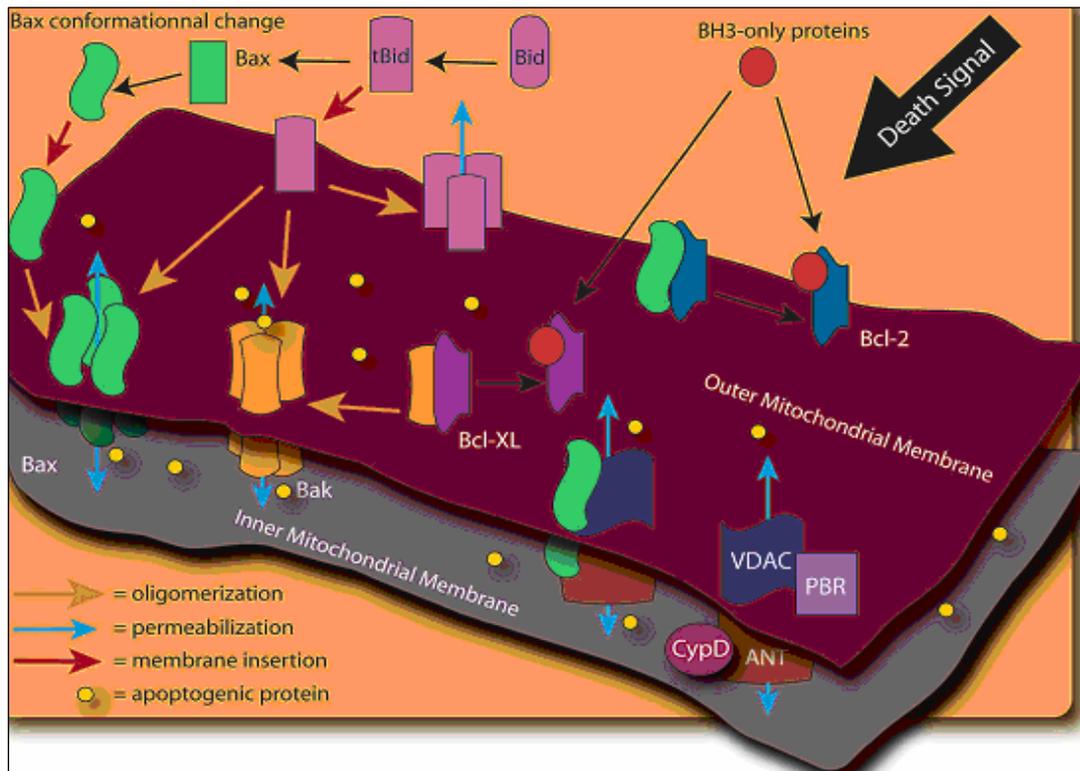


Figura 5. Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas na membrana mitocondrial.

Extraído e modificado de BRAS *et al.*, 2005.

Os eventos de apoptose podem ser avaliados inicialmente, por apresentar condensação descontínua da cromatina ao redor da periferia nuclear (WYLLIE *et al.*, 1997). Após eletroforese do DNA em gel, observa-se padrão característico “em escada”, opondo-se ao arrastado visto na necrose. Isso se deve ao fato de que as quebras no DNA ocorrem entre os nucleossomas, formando fragmentos múltiplos de 180-200 pares de bases (KERR *et al.*, 1994). A membrana plasmática não se rompe, prevenindo a liberação de componentes celulares para o meio extracelular (KERR *et al.*, 1994).

Adicionalmente, em sua porção externa passa a expor o fosfolípide fosfatidilserina, mantido normalmente em seu folheto interno que serve como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos e células adjacentes. Desse

modo a reação inflamatória é minimizada ou ausente, evitando o comprometimento de estruturas sadias dos tecidos (GREEN & KROEMER, 1998).

As células então, em apoptose expõem na sua superfície fosfatidilserina (PS), enquanto células viáveis mantêm esses fosfolípidios na face interna membrana plasmática (BOERSMA *et al.*, 2005; CHINKWO, 2005).

A exposição da fosfatidilserina (PS) é um dos primeiros eventos que se passa na superfície de uma célula em processo de apoptose. A membrana citoplasmática mantém uma distribuição assimétrica das moléculas de lipídios na bicamada. A localização intracelular da PS é mantida por uma translocase aminofosfolípideo ATP dependente que mantém PS na membrana interna nas células vivas. Os eventos celulares durante apoptose associados com morte celular (ativação de caspases, stress oxidativo e alterações citoplasmáticas na concentração de cálcio), atuam modulando a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, destabiliza a interação entre o complexo citocromo c e cardiolipina. Citocromo c é liberado do espaço mitocondrial interno com função de uma peroxidase para PS. Oxidação PS é requisito para sua externalização na camada externa, PS oxidada (PSox) pode ser translocada e externalizada para superfície da membrana (Figura 6) (FADOK *et al.*, 2001a, TIBREWAL & RAYMOND, 2006)

Este processo parece envolver modificações na atividade de duas enzimas: (1) a ativação da enzima fosfolípideo *scramblase*, que aumenta o movimento bidirecional de lipídeos através da dupla camada da membrana, um movimento conhecido como “*flip-flop*” e (2) inativação da enzima aminofosfolípideo translocase, que retornaria a PS para a camada interna da membrana citoplasmática. Estas alterações enzimáticas irreversíveis parecem estar relacionadas com a atividade da enzima caspase-3. Além disso, a expressão de PS parece ser um evento crítico para

o reconhecimento/ remoção destas células por macrófagos. Apesar de muitos outros receptores participarem deste processo, na ausência de PS a fagocitose de células apoptóticas é mínima (Figura 6) (FADOK *et al.*, 2001a, TIBREWAL & RAYMOND, 2006).

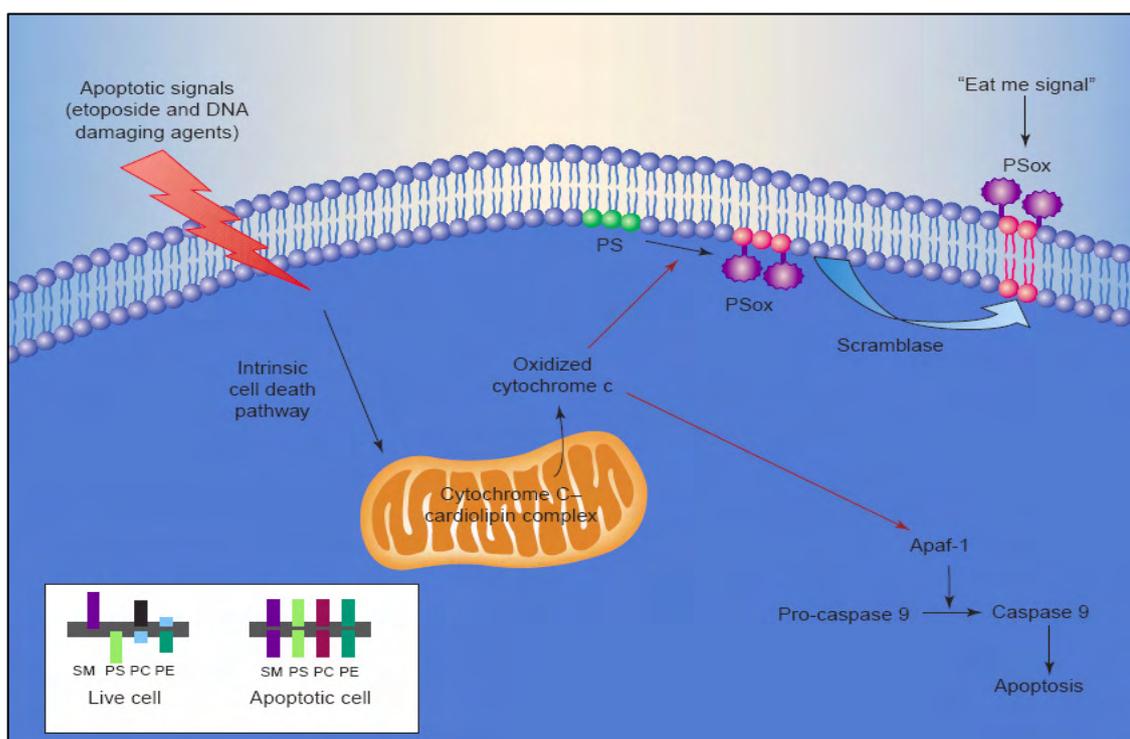


Figura 6. Translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana plasmática. Extraído de TIBREWAL & BIRGE, 2006.

A perda de assimetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos pela exposição de outros ligantes que estão obscurecidos nas células viáveis. Esta perda de assimetria do fosfolípido associado a apoptose é caracterizada por mudanças na fluidez relativa vista em células que mantêm uma distribuição de fosfolípido normal, alterações na fluidez contribui para mudanças na função, conformação, distribuição na membrana da proteína (FADOK *et al.*, 2001b).

No final de 1970, a anexina V foi isolada de placenta humana, poucos anos depois esta proteína foi descoberta independentemente em vasos sanguíneos e nomeadas como proteína vascular anticoagulante- α (VAC- α) com propriedade de inibir a coagulação sanguínea. O mecanismo anticoagulante é baseado na alta afinidade de ligação a fosfolípidos de membrana, especialmente de fosfatidilserina (BOERSMA *et al.*, 2005; BRUMATTI, 2008; VAN GENDEREN, *et al.*, 2008). Assim, a anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidos de membrana plasmática, através de suas cargas negativas na presença de íons cálcio. Todas anexinas apresentam uma domínio central com quatro repetições em α -hélice, que permite a ligação do cálcio (MOSS & MORGAN, 2004). Assim, na presença de íons cálcio, várias moléculas de anexina V se associam fortemente aos fosfolípidos de membrana, como por exemplo, fosfatidilcolina e esfingomiéline, ligando-se avidamente as cargas negativas presentes especialmente nas fosfatidilserinas externalizadas. A associação entre si das anexinas leva a formação de ligação proteína-proteína estável, porém reversível, quando os níveis de cálcio intracelular são depletados (VAN HEERDE *et al.*, 2000). A taxa de associação e dissociação sugere que anexina V não penetra na membrana e comporta-se como uma proteína extrínseca de membrana plasmática. Assim, a translocação da fosfatidilserina presente na face interna para a face externa da membrana celular e a ligação de anexina V é uma forte evidência da apoptose (MOCHIZUKI *et al.*, 2003).

Dessa forma, como mencionado, na fase precoce da apoptose, as células translocam moléculas de fosfatidilserina (PS), para membrana plasmática externa, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V (WATANABE *et al.*, 2002). Ao utilizar-se anexina-V marcada com FITC para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de fosfatidilserina expostas na membrana celular externa que se

associaram a anexina-V, indicando fase inicial de apoptose (apoptose precoce). Associando iodeto de propídio pode-se mensurar células com permeabilidade de membrana, o que poderia indicar fase tardia de apoptose ou necrose (PEC *et al.*, 2003). Assim, as células em necrose ou em apoptose tardia exibem os mesmos padrões característicos, especialmente quanto à permeabilidade de membrana. Tanto no processo de apoptose tardia, quanto na necrose, a anexina V pode atravessar a membrana permeabilizada ao mesmo tempo em que o iodeto de propídio entra no citosol. Dessa maneira pelo ensaio de anexina V fica difícil diferenciar os dois estágios de apoptose: precoce e tardia. Ainda, estudos prévios consideram a presença de dupla marcação referente a anexina V e ao iodeto de propídio possa ser interpretado como células em apoptose tardia (PEC *et al.*, 2003). Portanto, estudo complementar ao ensaio de anexina V é fundamental, utilizando o método de Hoescht-Iodeto, permitindo caracterizar com maior eficiência as diferenças entre apoptose precoce, tardia e necrose.

Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 são amplamente utilizados para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo que emite fluorescência azul quando se liga ao DNA. A bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizados para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose, juntamente com células vivas por minutos até horas (KIECHLER & ZHANG 2003). Este corante é rapidamente absorvido pelas células durante as fases iniciais da apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao IP. Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas

pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 e o IP têm sido intensamente utilizadas para a diferenciação dos estágios de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células com membrana celular intacta, mesmo as apoptóticas de verde, sendo um ensaio de 3 espectros coloridos diferentes. Assim as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia em citoplasma verde e núcleo azul intacto (células viáveis), núcleo azul condensado e fragmentado (apoptose precoce), núcleo vermelho condensado e fragmentado (apoptose tardia) e núcleo intacto vermelho (necrose) (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a capacidade dos alcalóides (pteroginina e pteroginidina) extraídos de *Pterogyne nitens*, planta oriunda do Cerrado brasileiro, em promover a apoptose em linhagem celular tumoral de carcinoma ductal invasivo (ZR 7531) e adenocarcinoma de mama (MCF-7).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade celular, utilizando o método de MTT, nas linhagens tumorais de mama ZR 7531 (derivada de carcinoma ductal invasivo) e MCF-7 (derivadas de adenocarcinoma) tratadas com os alcalóides Pteroginina e Pteroginidina
- Avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de Anexina V, por citometria de fluxo.
- Avaliar qualitativa e quantitativamente a diferenciação de apoptose total (precoce e tardia) e necrose, utilizando o método do Hoechst e Iodeto.
- Avaliar quantitativamente sinais intracelulares de ativação da apoptose, verificando os níveis de caspases efetoras de apoptose (Caspase 3/7), utilizando o método quimiluminescente de placas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração e isolamento da pteroginina e pteroginidina

As folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae) foram coletadas no Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil, entre os meses de abril e maio de 2003, pela Dra. Maria Cláudia Marx Young e identificado como sendo *Pterogyne nitens* Tulasne (Fabaceae – Caesalpinioideae) pela Dra. Inês Cordeiro do mesmo instituto. Uma exsicata (SP204319) encontra-se depositada no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do Instituto Botânico, São Paulo – SP, Brasil.

O processo de obtenção dos alcalóides guanidínicos, foi realizado nas dependências do NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) sob supervisão do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini. A espécie avaliada nesse trabalho faz parte da relação de plantas do projeto Biota - Fapesp (processo nº 03/02176-7).

As folhas foram secas à temperatura ambiente, aproximadamente 2,5 Kg, e então submetida à moagem empregando moinho de facas. O pó obtido foi levado à maceração empregando hexanos e com posterior maceração em etanol. O extrato etanólico foi dissolvido em mistura metanol:água (7:3) e seguido de partição líquido-líquido empregando-se acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, obtendo-se três frações: fração hidroalcoólica, acetato de etila e a fração *n*-butanólica rica em alcalóides.

A purificação da fração *n*-butanólica com estimativa de rendimento de 4,0g (38%) empregando Cromatografia de Permeação em Gel rendeu 25 subfrações, as quais foram reunidas com base nos seus comportamentos em Cromatografia em Camada Delgada Analítica [CHCl_3 : e MeOH (85:15)] e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos [Coluna hexil-fenila; MeOH:H₂O (5 à

100% de MeOH); $230 < \lambda < 400$ nm; 1 mL/min). As subfrações alcalóidicas foram caracterizadas como sendo derivados guanidínicos, devido ao teste positivo com o Reagente de Sakaguchi, culminando no isolamento dos alcalóides pteroginina e pteroginidina.

A estrutura molecular destes alcalóides foi confirmada por técnicas espectroscópicas, tais como: RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectrometria de massas de baixa resolução.

3.2. Cultura de células

Para os ensaios biológicos com os extratos foram utilizadas linhagens celulares ATCC (American Type Culture Collection, USA) de carcinoma ductal invasivo (ZR 7531) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens foram cultivadas e congeladas em -276°C em nitrogênio líquido para estocagem. Posteriormente foram cultivadas em uma mistura 1:1 DMEM e Ham's F10 (Sigma), acrescido de HEPES, penicilina, estreptomicina, bicarbonato de sódio e soro fetal bovino (SFB, Cultilab). As células foram cultivadas em garrafas e mantidas a 5% de CO_2 e a temperatura de 37°C até a formação de monocamada celular, depois as garrafas de células foram submetidas a tripsinização, para isso, as células foram lavadas com 5 mL Hanks que foi em seguida descartado, e as linhagens foram submetidas à 3 mL de tripsina 0,05% EDTA produzidas a partir de uma solução 10 vezes concentrada (Invitrogen, EUA) até o desprendimento das células do fundo das garrafas. A seguir, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino para a neutralização da tripsina. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter

quantidade celular adequada para os experimentos. As células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias puras dissolvidas em água deionizada. Foram realizados três experimentos independentes com concentrações em triplicatas. Como controle positivo, a linhagem celular foi tratada com doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina 50mg, Eurofarma, SP) em concentração 15 µg/mL por 24 horas. Como controle negativo, a linhagem não foi submetida ao tratamento (células não tratadas) e como as substâncias (Pteroginina e Pteroginidina) são hidrossolúveis não houve necessidade de controle de veículo (solvente).

3.3. Tratamento das Linhagens

Para os ensaios de citotoxicidade (MTT), apoptose/necrose por AnexinaV/Iodeto de propídio (citometria de fluxo), apoptose precoce e tardia/necrose pelo ensaio de Hoescht/Iodeto de propídio e atividade da caspase 3/7 foi utilizada uma suspensão respectivamente de $1,0 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $1,0 \times 10^5$ células/poço das linhagens celulares. As células foram cultivadas em placas de 96, 12, 12 e 96-poço, e após 24 horas de cultivo, foram tratadas com os alcalóides (pteroginina e pteroginidina). Para todos os experimentos as células foram tratadas por diferentes concentrações dos alcalóides, procurando avaliar o potencial efeito dose-resposta para citotoxicidade e apoptose. Para a Pteroginina e Pteroginidina as concentrações iniciais testadas foram 0,031, 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0mM. Inicialmente as células foram tratadas por 24 horas e avaliadas imediatamente após o tratamento (tempo zero, t₀) para verificação dos parâmetros de citotoxicidade e apoptose. As células foram também tratadas por 24 horas, seguido de recuperação pós-tratamento de mais 24h (tempo recuperação, t_{24h}), no qual foi removido os

alcalóides e colocado meio fresco, e foram também realizados os ensaios de citotoxicidade e apoptose.

A concentração que induz morte celular em 50% das células (IC_{50}) foi determinada no tratamento de 24h (t_0) e no tratamento seguido de recuperação (t_{24h}) em diferentes concentrações para avaliação de citotoxicidade dose-resposta. Após a determinação do IC_{50} as células foram tratadas em duas concentrações abaixo e acima do IC 50 da respectiva substância. Cada ensaio foi acompanhado de um controle positivo (doxorrubicina 15 μ g/mL) e controle negativo (células não-tratadas). Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

3.4. Citotoxicidade (MTT)

O método de MTT, utilizado para a avaliação da citotoxicidade, tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem o sal de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Após o tratamento para a determinação do IC_{50} descrito no item 3.3, o meio de cultura livre de soro fetal bovino foi removido e as células foram incubadas com 10 μ L de MTT a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 a 5 horas). Posteriormente, para permitir a solubilização dos cristais de formazana, 100 μ L de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 540 nm, foi realizada em leitor de placas (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc., USA). A citotoxicidade de cada tratamento foi expresso pela porcentagem de morte celular,

calculada em relação ao controle negativo, segundo proposto por ZHANG *et al.* 2004, CRAWFORD & BOWEN 2002:

$$\text{células mortas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Controle Negativo} - \text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100$$

A partir do teste de MTT foi obtido o IC₅₀ (concentração citotóxica para 50 % das células) e a partir deste estabelecidas as concentrações a serem utilizadas para os ensaios de apoptose. Sendo escolhidas duas concentrações acima e duas abaixo do IC₅₀.

3.5. Ensaios de Apoptose

3.5.1. Citometria de Fluxo (Anexina V)

As células ($2,5 \times 10^5$ cell/poço) foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas e tratadas com concentrações pré-estabelecidas com o teste de citotoxicidade dos alcalóides (pteroginina e pteroginidina). Após o tratamento e período de recuperação as células foram tripsinizadas, transferidas para eppendorfes estéreis e centrifugadas por 10 minutos. As células foram lavadas com meio DMEM F10 com soro e centrifugadas novamente. Para o ensaio da anexina V foi utilizado o kit de detecção de apoptose por Anexina-V marcada com FITC (Alexis, Lausen, Switzerland). A seguir, as células foram ressuspensas com 500 μ L de tampão de ligação, 5 μ L de anexina V conjugada com FITC, e 5 μ L de iodeto de propídio. A reação foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propídio) foi avaliada

utilizando o equipamento FACSCanto (Bencton Dickinson, USA), nas dependências do laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Para cada ensaio, foram incluídos controle positivo (15 µg/mL de doxorubicina), controle negativo (células não tratadas).

3.5.2. Método do Hoechst e Iodeto

O ensaio citomorfológico para detecção de células apoptóticas utilizando os corantes Hoechst 33342 e Iodeto de propídio foi realizado nas linhagens celulares tratadas com alcalóides (pteroginina e pteroginidina), nas concentrações próximas ao IC₅₀ anteriormente determinado pelo ensaio de citotoxicidade (como descrito no item 3.4). Os tratamentos das células foram acompanhados de controle negativo (células não tratadas) e controle positivo (doxorubicina 15 µg/mL) (DIVE *et al.*, 1992).

A avaliação de células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão de fluorocromos, utilizando-se uma solução fluorescente, contendo diacetato de fluoresceína (DAF), iodeto de propídeo (IP), e Hoescht 33342 (HO) (Sigma). Após o tratamento com a substância testada, o meio de cultura foi recolhido (células mortas em suspensão), as células aderentes foram tripsinizadas, e ambas foram centrifugadas. Na suspensão celular de 100µl foi acrescentada uma solução de fluorocromos, contendo 25% da solução aquosa de IP (1mg/mL), 50% da solução de DAF em DMSO (1,5 mg/mL), 10 % da solução aquosa de HO (1 mg/mL) e 15 % de PBS. A reação foi incubada por 5 minutos a 37 °C e as células foram observadas em microscopia de fluorescência, em espectro de absorção 360 nm e 538nm.

Foi procedida avaliação qualitativa e quantitativa, estabelecendo-se a porcentagem de células em apoptose precoce, tardia e em necrose, levando-se em

consideração a morfologia e coloração das células. As células foram classificadas com normais (núcleo azul esférico corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360nm), apoptóticas (núcleo azul com corpos apoptóticos corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360nm), e necróticas (núcleo vermelho esférico ou em vesículas corado pelo IP, citoplasma vermelho, em espectro de absorção 538nm.). Ainda, a apoptose foi classificada em precoce (núcleo em azul e morfologia nuclear com corpos apoptóticos) e tardia (núcleo corado em vermelho e com presença de corpos apoptóticos) e necrótica (núcleo intacto e vermelho) segundo proposto por KOROSTOFF *et. al.*, 1998; HASHIMOTO *et al.*, 2003.

3.5.3. Ensaio da atividade da caspase 3/7

As linhagens celulares ($1,0 \times 10^5$) foram aderidas em placa de 96 poços para luminômetro. A placa foi preparada conforme as instruções do Kit, contendo branco (sem células), controle negativo, controle positivo e os tratamentos com as substâncias no período t_0 e t_{24} . Adicionando-se em seguida 25 μ l (1:1) do Reagente Caspase-Glo™ 3/7 (Promega USA) em cada poço das amostras testadas em meio de cultura, submetendo-as sob agitação em shaker de placas durante 30 segundos. As placas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente. A leitura luminescente de cada amostra foi realizada em luminômetro de placas (Berthold, USA) nas dependências do laboratório de química da Faculdade de Ciências de Bauru-UNESP..

Este ensaio contém um substrato luminescente com a sequência tetrapeptídica que é reconhecida pela caspase-3 e 7 e a luciferase termoestável (Z-DEVD-AMC). Ao adicionar o Mix reagente Caspase-Glo™ 3/7 (Promega, USA) nas

linhagens MCF-7 e ZR-7531 tratadas e não tratadas, promove a lise celular, seguido pela clivagem do substrato pela caspase 3/7 nas células que foram induzidas a sua ativação e liberando a aminoluciferina que posteriormente passa a ser consumida pela luciferase. O sinal luminescente produzido é proporcional a atividade da caspase 3/7 presente na amostra (Figura 7)

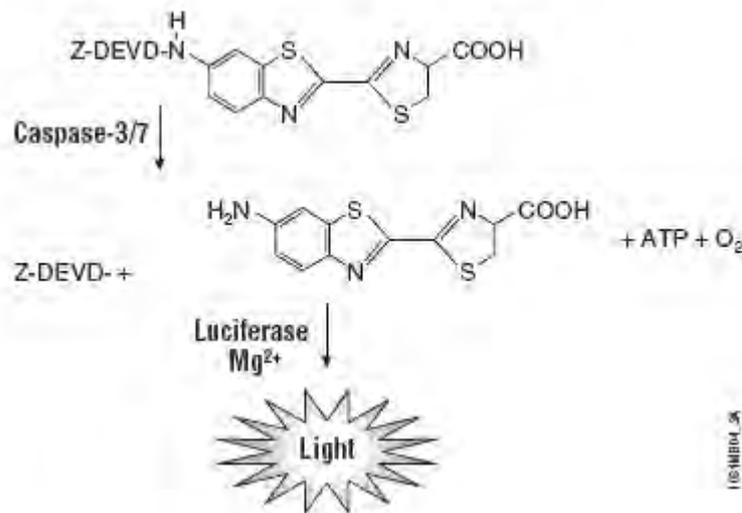


Figura 7. Reação da Caspase-GLO™ 3/7 (Promega USA)

3.6. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade, pela técnica de MTT, e para os dos resultados da avaliação de apoptose pelo método de anexina V, foi primeiramente aplicado o teste de normalidade e constatando-se que os dados apresentavam distribuição normal, foi aplicado e o teste paramétrico *one way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Para o ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst e Iodeto foi aplicado o teste de normalidade que também demonstrou distribuição normal e, em seguida o teste

paramétrico *one way* ANOVA com pós-teste de Tukey foi aplicado. Essa análise foi realizada através do software Biostat 4.0.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de Citotoxicidade para Pteroginina e Pteroginidina

Inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela técnica de MTT com o alcalóide pteroginina na linhagem celular de carcinoma ductal invasivo de mama (ZR7531) e, por não existirem estudos prévios com esta substância, foi necessária a determinação do IC₅₀ (concentração que permite a morte de 50% das células tratadas).

Embora se tenha utilizado nove diferentes concentrações, o IC₅₀ não pode ser completamente determinado. Em 24 horas de tratamento sem recuperação (t₀), foi observado um valor de morte celular médio de 31,62% nas concentrações entre 0.5mM a 8mM para pteroginina na linhagem ZR 7531 (Figura 8A).

Determinado o IC₅₀ (4,31mM), os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes e os valores expressos pela Média ± Erro Padrão, nas concentrações abaixo e acima do IC₅₀ (0,375, 1,125, 3,375, 10,125 mM) por 24 horas (Figura 8A) pteroginina na linhagem ZR 7531.

Depois de determinada a citotoxicidade após 24 horas (t₀), seguida de mais 24 horas de recuperação (t₂₄), verificou-se um discreto aumento da citotoxicidade dose-resposta observada no período t₂₄ em relação às porcentagens de citotoxicidade sem período de recuperação na maior concentração (10.125mM) para pteroginina apresentando morte celular entre 73 % e 70 % das células tratadas (Figura 9A e 9B).

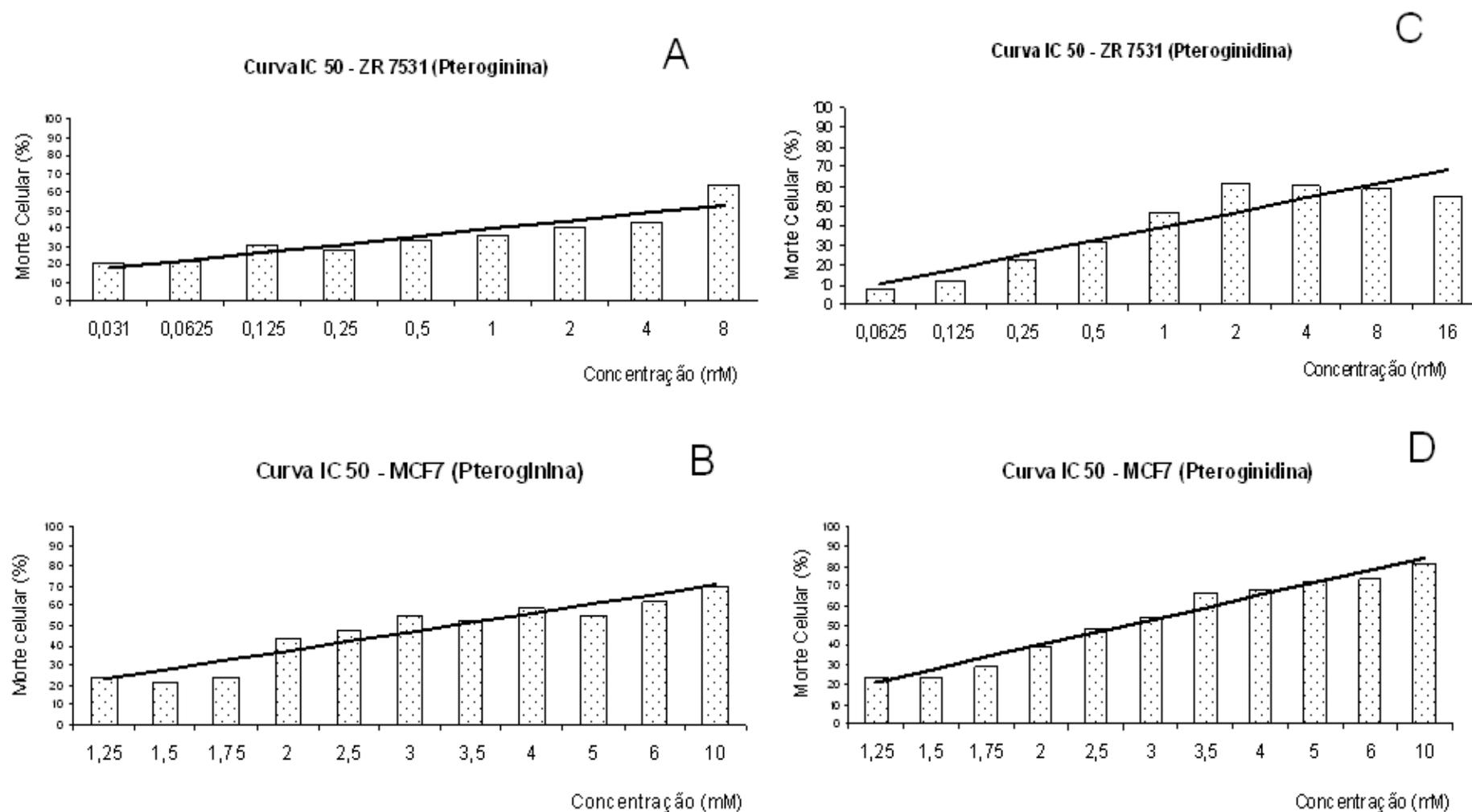


Figura 8. Ensaio de citotoxicidade (MTT). Curva dose-resposta para estimacão do IC₅₀ em linhagem celular ZR-7531 e MCF-7 após tratamento de 24 horas (t₀) com pteroginina e pteroginidina. **(A)** IC₅₀ = 4.31mM. **(B)** IC₅₀ = 4.9mM. **(C)** IC₅₀ = 8.19mM. **(D)** IC₅₀ = 1.2mM. O valor do IC₅₀ foi calculado a partir da equaco da regressão linear mensurado pelo programa GraphPad Prism 5.

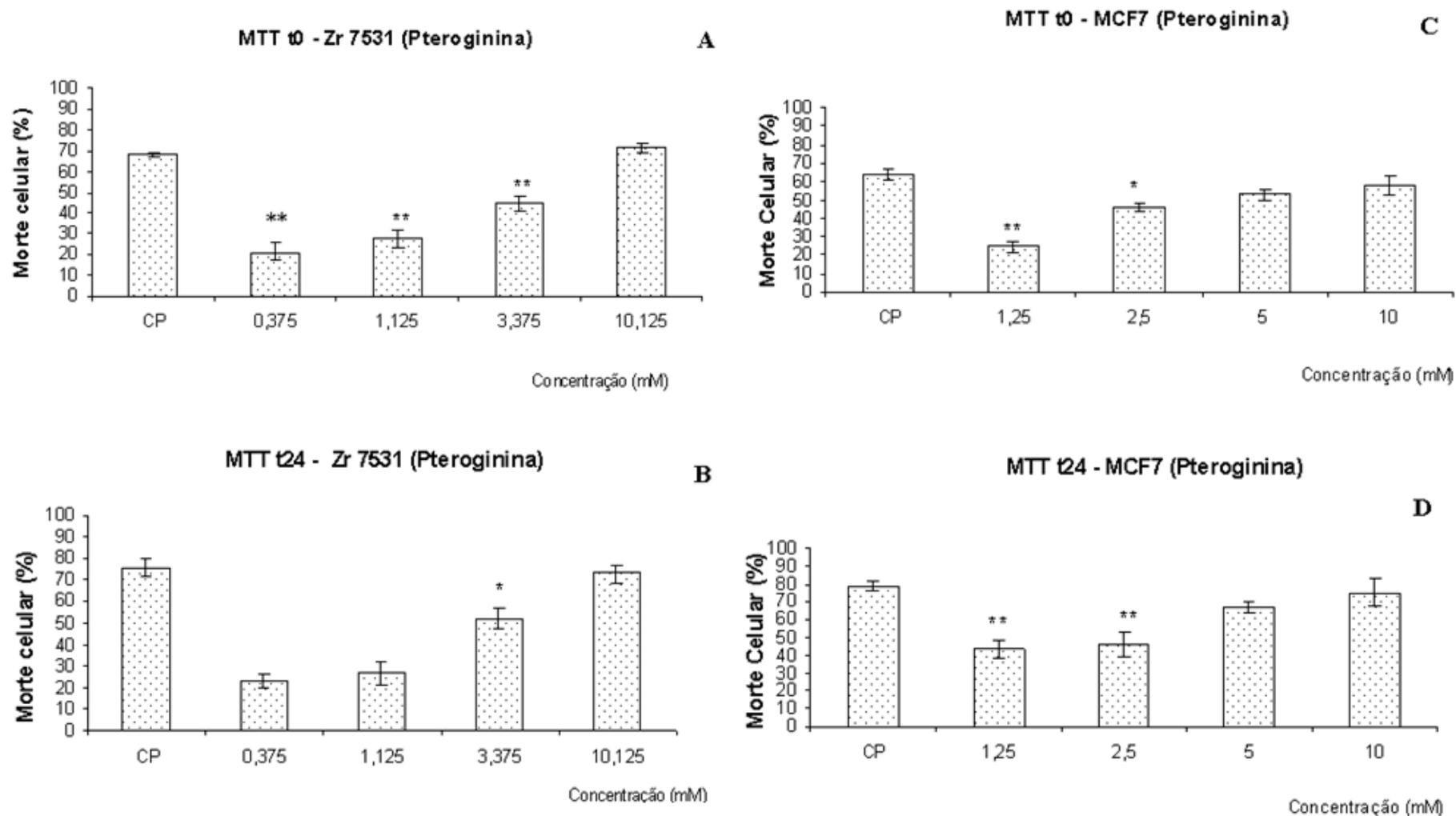


Figura 9 – Ensaio de citotoxicidade (MTT). **(A)** (**) $p < 0,01$ = CP versus concentrações. **(B)** (*) $p < 0,05$ = CP (15 $\mu\text{g/ml}$) versus o tratamento na concentração de 3,375 mM. **(C)** (**) $p < 0,01$ = CP (15 $\mu\text{g/ml}$) versus o tratamento na concentração de 1,25 mM. (**) $p < 0,05$ = CP (15 $\mu\text{g/ml}$) versus o tratamento na concentração de 1.25mM. **(D)** (**) $p < 0,01$.

Assim como na linhagem de carcinoma ductal invasivo (ZR 7531), a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) não existiam estudos prévios dessa substância, logo, foi determinado o IC₅₀ da pteroginina observado em 2,5 mM e 4,0 mM por 24 horas de tratamento (Figura 8B). A seguir, foram realizados três experimentos independentes de citotoxicidade de pteroginina na linhagem (Média ± Erro Padrão), nas concentrações abaixo e acima do IC₅₀ (1,25, 2,5, 5 e 10mM) por 24 horas (Figura 8B).

Na figura 9C e 9D estão demonstrados os resultados de citotoxicidade (MTT) da linhagem celular de adenocarcinoma. O aumento da citotoxicidade dose-resposta foi observado na linhagem tratada com pteroginina, em relação a maior concentração (10mM) no período t0 observada morte celular de 58% com o período de recuperação em 75% de morte das células tratadas. Demonstra-se também uma semelhança na porcentagem de morte celular da maior concentração (75%) e o controle positivo (78%) no período de recuperação (Figura 9D).

Da mesma forma, o alcalóide pteroginidina foi avaliado quanto a sua citotoxicidade através do ensaio de MTT na linhagem celular ZR-7531. O IC₅₀ foi determinado a partir da curva dose-resposta obtida por equação da reta (Figura 8C). Em 24 horas de tratamento sem recuperação (t0), nas concentrações entre 0.06mM a 16mM foi observado um valor de morte celular em média de 43.12% (Figura 8C). Determinado o IC₅₀ (1,2mM) os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes e os valores foram expressos pela Média ± Erro.

A citotoxicidade da pteroginidina (Figura 10A e 10B) foi observada nas concentrações abaixo e acima do IC₅₀ (0.25, 0.5, 1.0 e 2.0mM) avaliados na linhagem de carcinoma ductal invasivo. Foi observado aumento da citotoxicidade dose-resposta nas maiores concentrações (1.0mM e 2.0mM), as quais apresentaram

morte celular de 43 e 57% das células tratadas por 24 horas (figura 10A). Quando analisada a citotoxicidade em 24 horas de tratamento, seguido de mais 24 horas de recuperação (t24), foi possível verificar uma elevada citotoxicidade no tratamento com 2.0mM e o máximo de morte celular (72%) (figura 10B).

Da mesma forma, um segundo alcalóide (pteroginidina) foi avaliado quanto sua citotoxicidade (MTT) na linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e o IC_{50} para essa substância foi observado nos tratamentos 2.5 e 3mM por 24 horas (Figura 8D). Em seguida, a citotoxicidade de pteroginidina foi avaliada nas concentrações de 1.25, 2.5, 5 e 10mM, por 24 horas, em três experimentos independentes. Os resultados de citotoxicidade foram demonstrados pela Média \pm Erro Padrão ($M \pm EP$).

A citotoxicidade em 24 horas de tratamento, seguido de mais 24 horas de recuperação (t24) em relação à linhagem de adenocarcinoma (MCF-7) também se observou uma curva dose-resposta e elevada citotoxicidade com máxima morte celular de 74% no tratamento com 10 mM, bem como o máximo de morte celular (73%) no tratamento de 5mM seguido de recuperação para o alcalóide pteroginidina (Figura 10C e 10D).

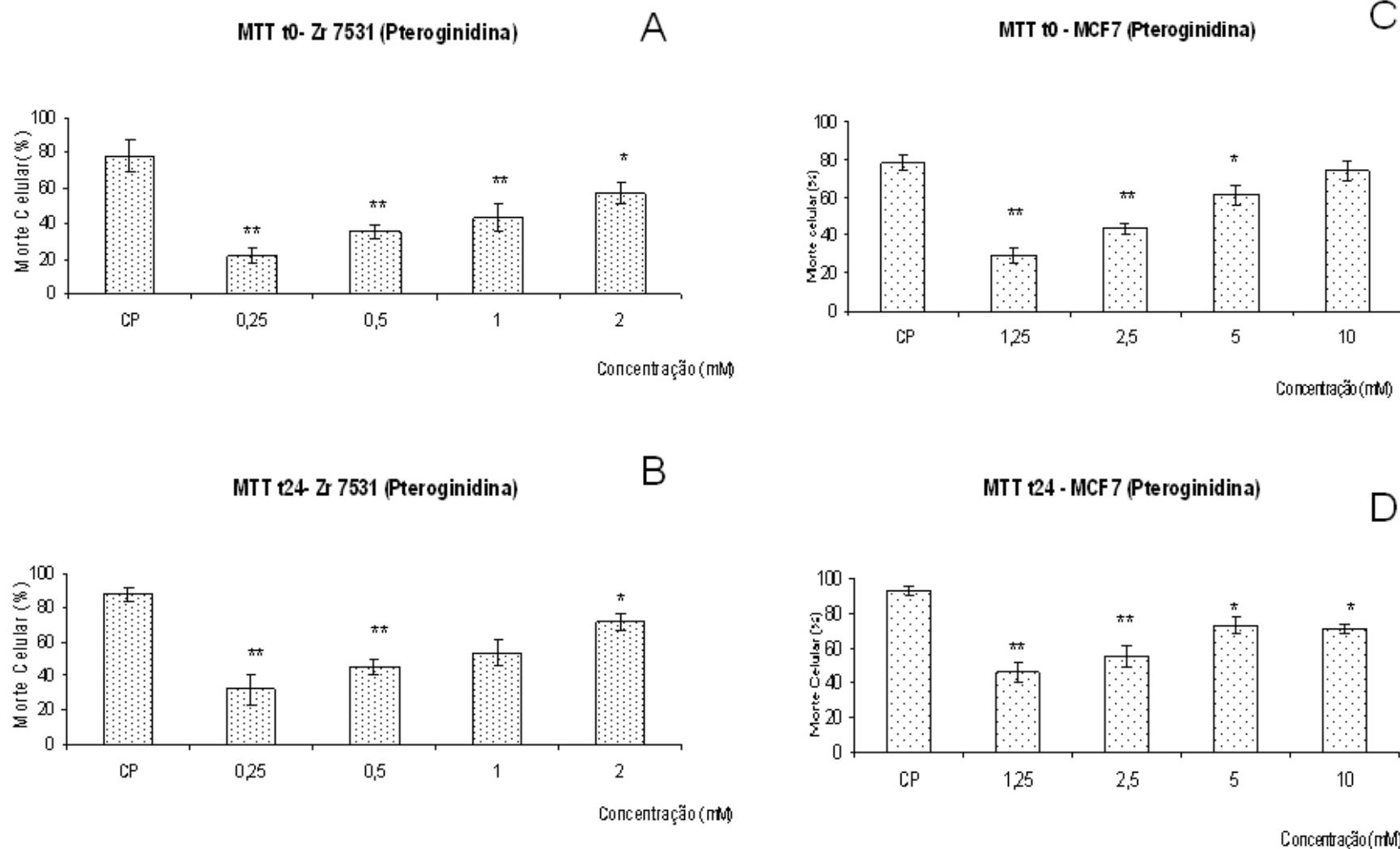


Figura 10 – Ensaio de citotoxicidade MTT. **(A)** (** $p < 0,01$. (*) $p < 0,05$ **(B)** (** $p < 0,01$ (*) $p < 0,05$ **(C)** (** $p < 0,01$. (** $p < 0,05$. **(D)** (** $p < 0,01$ (** $p < 0,05$. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). CP (controle positivo). One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Na avaliação comparativa de citotoxicidade do tratamento com os alcalóides pteroginina e pteroginidina, extraído de *Pterogyne nitens*, foi possível observar efeito citotóxico dose-resposta em linhagem celular de carcinoma ductal invasivo e adenocarcinoma. Aparentemente, a melhor resposta citotóxica foi observada no tratamento sem recuperação para ambas substâncias e maior intensidade do efeito foi observado para a pteroginidina.

Na figura 11 e 12 estão demonstradas as fotomicrografias das linhagens MCF-7 e ZR-7531 submetidas ao tratamento com a pteroginina e pteroginidina em meio de cultura DMEM no aumento de 10X. Podemos observar as alterações morfológicas das células em fase de morte celular. Nas maiores concentrações apresentam morfologia comprometida com menor número de células comparada com as menores concentrações e com o controle negativo.

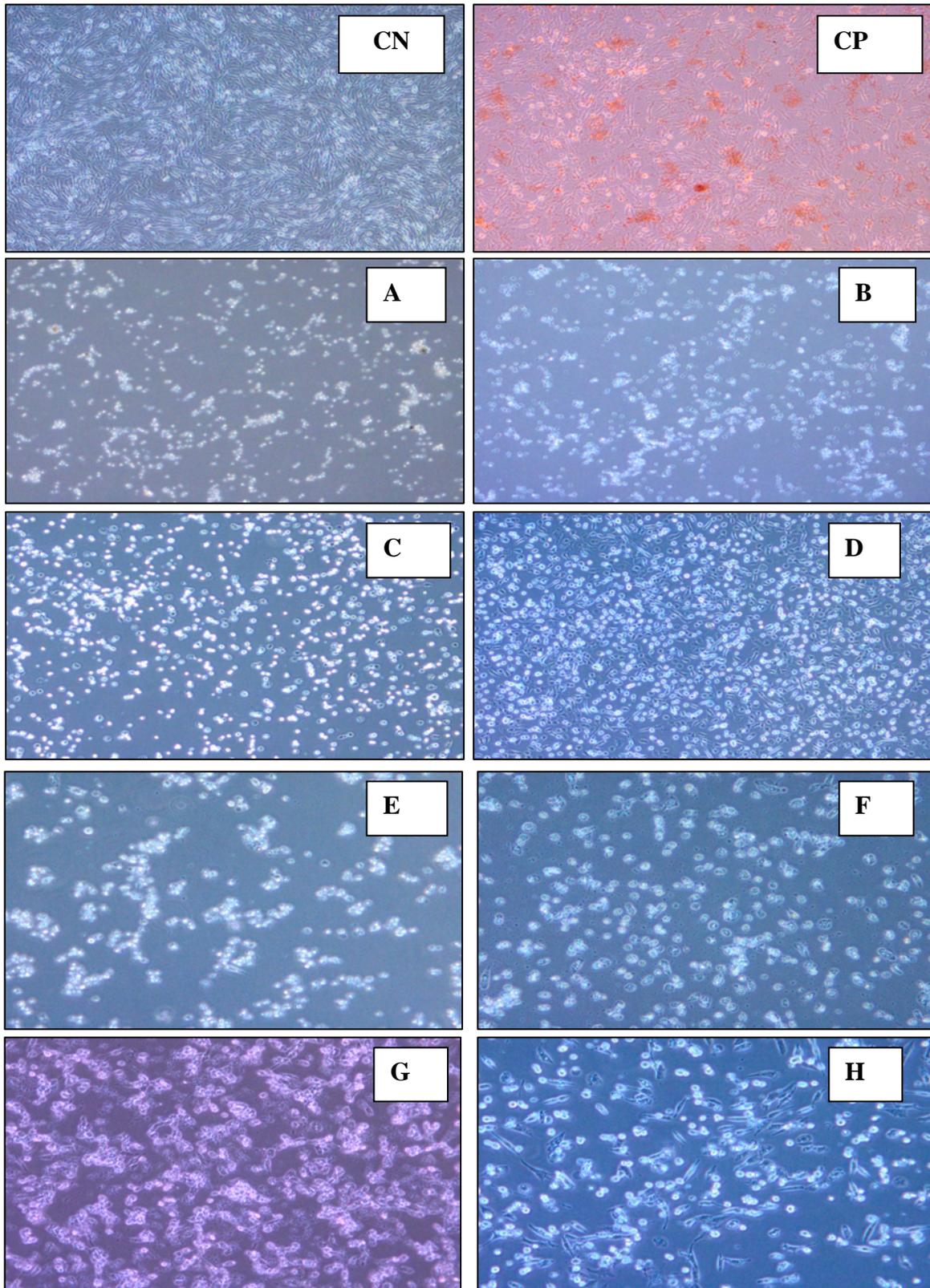


Figura 11. Imagem em microscópio invertido da linhagem MCF-7 tratadas com pteroginina A), 10 mM, B) 5,0 mM, C) 2,5mM, D) 1,125 mM. Linhagem MCF-7 tratadas com pteroginidina nas mesmas concentrações E), 10mM F), 5,0 mM G) 2,5mM , H) 1,125mM. Controle Negativo; Controle Positivo (Doxorrubicina 15 µg/mL). Aumento 10x.

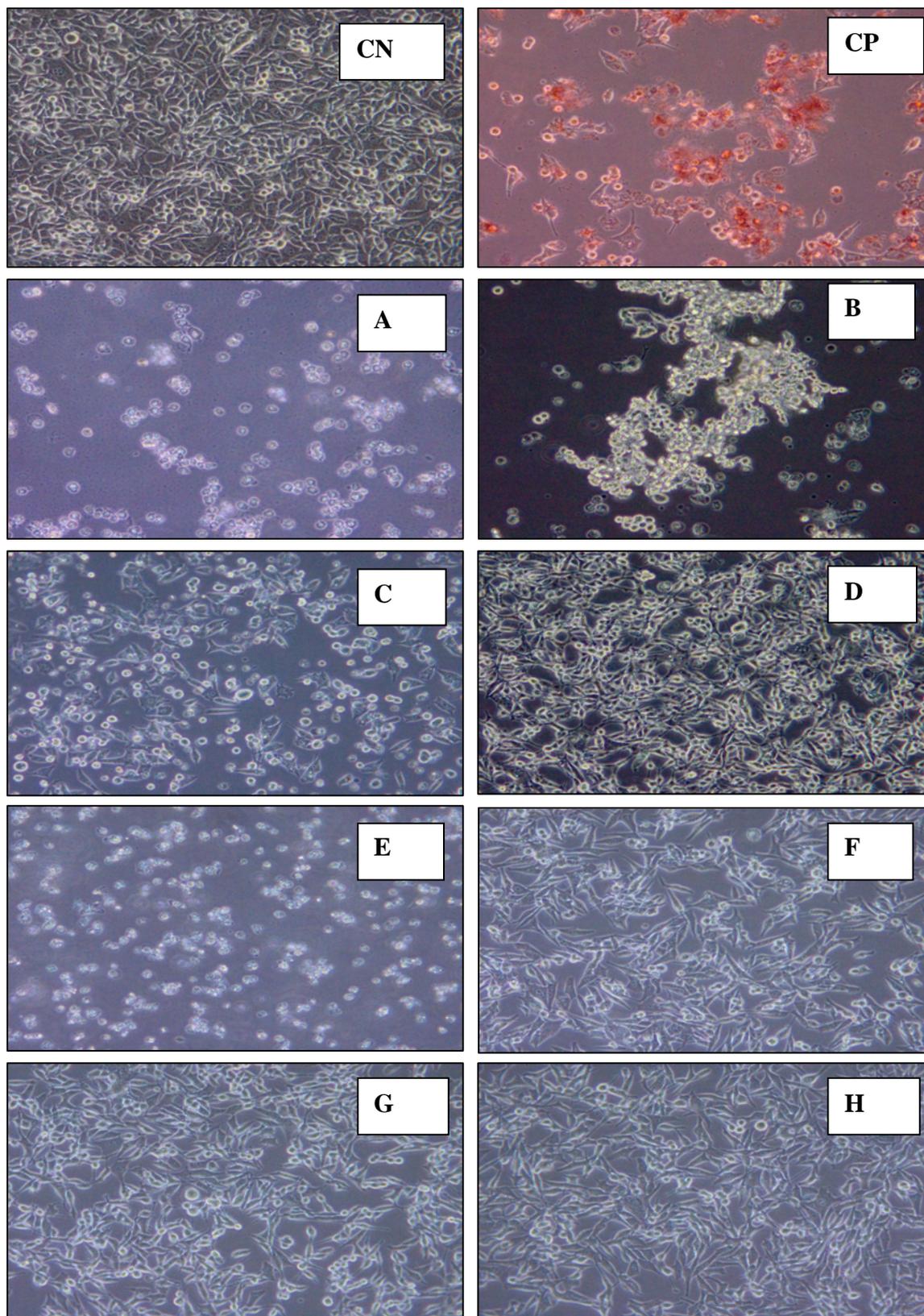


Figura 12 Imagem em microscópio invertido da linhagem ZR 7531. Linhagem tratada com pteroginina A), 10,125mM, B) 3,375 mM, C) 1,125 mM, D) 0,375mM. Linhagem tratada com pteroginidina nas concentrações E) 2,0mM F) 1,0mM G) 0,5 e H) 0,25. CN (Controle Negativo); CP (Controle Positivo-Doxorrubicina 15 µg/mL). Aumento 10x

4.2 Ensaio de Anexina V – Citometria de Fluxo

Para a avaliação do potencial efeito de apoptose das substâncias puras de *Pterogyne nitens* (Pteroginina e Pteroginidina), o ensaio de anexina V por citometria de fluxo foi realizado nas linhagens celulares ZR-7531 e MCF-7 tratadas com os alcalóides pteroginina e pteroginidina nas concentrações estabelecidas próximas ao IC₅₀ (Figuras 13 e 14). Os experimentos foram conduzidos para a avaliação de apoptose em células tratadas por 24 horas sem recuperação (t0) e células tratadas por 24 horas e recuperação de 24 horas pós-tratamento (t24).

No tratamento de ZR-7531 com pteroginina por 24 horas e sem período de recuperação t0 (Figura 13A), foi possível observar apoptose precoce em 20 a 41% e apoptose tardia/necrose em 18 a 62%. Aumento dose-resposta da apoptose precoce foi observada com o tratamento com pteroginina quando comparado com o controle negativo, principalmente nas concentrações de 1.125mM e 10.125mM ($p < 0.01$). Nas concentrações de 3.375mM e 10.125mM ($p < 0.01$) foi observada a presença de maior número de células em apoptose tardia/necrose em relação ao controle negativo.

Quando a linhagem ZR 7531 foi tratada com a mesma substância por 24 horas e avaliada no período de recuperação de 24 horas (t24), as células apresentaram a mesma resposta de apoptose precoce que o tratamento t0 (Figura 13B) nas concentrações de 1.125, 3.375 e 10.125mM ($p < 0.01$). Entretanto, no tratamento t24, foi possível observar que a apoptose tardia/necrose foi menor, quando comparados com o tratamento t0. As células tratadas sem e com período de recuperação aparentemente apresentaram sinais de apoptose precoce similares, ressaltando-se que no tratamento sem recuperação 55 a 62% das células se apresentaram em apoptose tardia/necrose (Figura 13A). Em contrapartida, quando

as células foram avaliadas no período de recuperação pós-tratamento (t24), 18 a 50% das células estariam em apoptose tardia/necrose (Figura 13B). Aparentemente, as células no tratamento t24 apresentam diminuição do processo de morte celular por apoptose tardia/necrose, mas mantiveram sinais de apoptose precoce, resultando no efeito dose-resposta de morte celular observado no ensaio de MTT e do ensaio de anexina V. Dessa forma, no tempo de recuperação as células mantêm sinais de apoptose, uma morte celular menos devastadora, e diminui a morte celular por necrose.

Já no tratamento de MCF-7 com pteroginina sem período de recuperação - t0 (Figura 13C), observou-se uma menor porcentagem de células em apoptose precoce (12 a 30%) e maior porcentagem quanto às células em apoptose tardia/necrose (6 a 82%). Pode ser observado aumento dose-resposta em relação a apoptose tardia/necrose e diferença significativa ($p < 0,01$) nas concentrações de 2.5, 5 e 10mM quando comparadas ao controle negativo (CN).

A linhagem de adenocarcinoma (MCF-7) quando tratada com a pteroginina por 24 horas e avaliada no período de recuperação de 24 horas (t24), as células apresentaram semelhante resposta em relação àquela verificada no tratamento sem período de recuperação (t0). Observou-se aumento na apoptose tardia/necrose (12 a 78%) e diminuição na porcentagem da apoptose precoce (5,5 a 15%) no tratamento t24, supondo que as células anteriormente em apoptose precoce passam para o estágio tardio do processo de morte celular (Figura 13D).

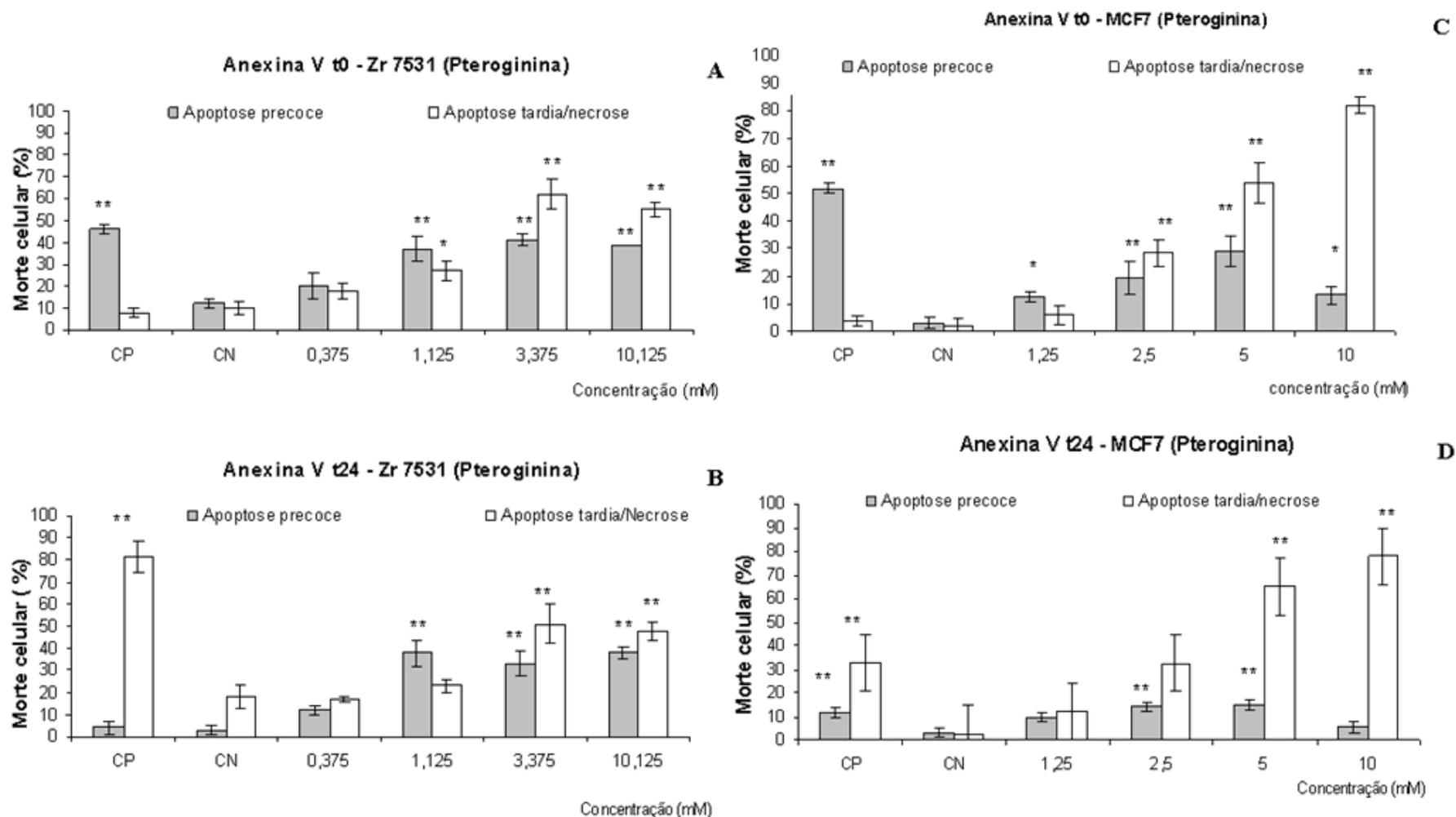


Figura 13 – Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. **(A)** (***) Apoptose precoce ($p < 0,01$). (***) Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$). (*) Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,05$) **(B)** (***) Apoptose precoce ($p < 0,01$). (***) Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$). **(C)** (***) Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (***) Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$). **(D)** (***) Apoptose precoce ($p < 0,01$). (***) Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$).

As células de carcinoma ductal invasivo (ZR 7531) tratadas com pteroginidina por 24 horas e sem período de recuperação pós-tratamento (t0) apresentaram apoptose precoce em 14 a 41% e apoptose tardia/necrose em 10 a 82% (Figura 14A). Quando comparadas com o controle negativo, somente na concentração de 2.0mM as células apresentaram maior morte por apoptose tardia ($p<0.01$).

Quando a linhagem ZR 7531 foi tratada com a pteroginidina por 24 horas (Figura 14B) e avaliadas no período de recuperação de 24 horas (t24), observou-se um padrão de morte celular similar, por apoptose precoce, em todas as concentrações e baixas porcentagens de apoptose precoce que variaram de 3 a 12%. Na avaliação de apoptose tardia/necrose as células pós-recuperação não apresentaram efeito dose-resposta para todas as concentrações de tratamento em relação ao controle positivo (Figura 14B). No tratamento t24 as células apresentaram uma diminuição na resposta de apoptose precoce quando comparado ao tratamento t0 (Figura 14A e 14B). Entretanto, no tratamento t24, foi possível observar que a apoptose tardia/necrose apresentou valores maiores em relação aos valores obtidos no tratamento t0 (20 a 87%).

Quanto à linhagem de adenocarcinoma (MCF-7) observou-se efeito dose-resposta em relação às células em a apoptose tardia/necrose (Figura 14C) e a maior concentração testada (10mM) apresentou maiores valores em porcentagem tanto para apoptose tardia/necrose (58,6%) quanto para apoptose precoce (37,8%) (quando comparada ao controle positivo (CP). O controle positivo (CP) e os tratamentos nas concentrações de 2.5; 5.0 e 10.0mM apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p<0,01$).

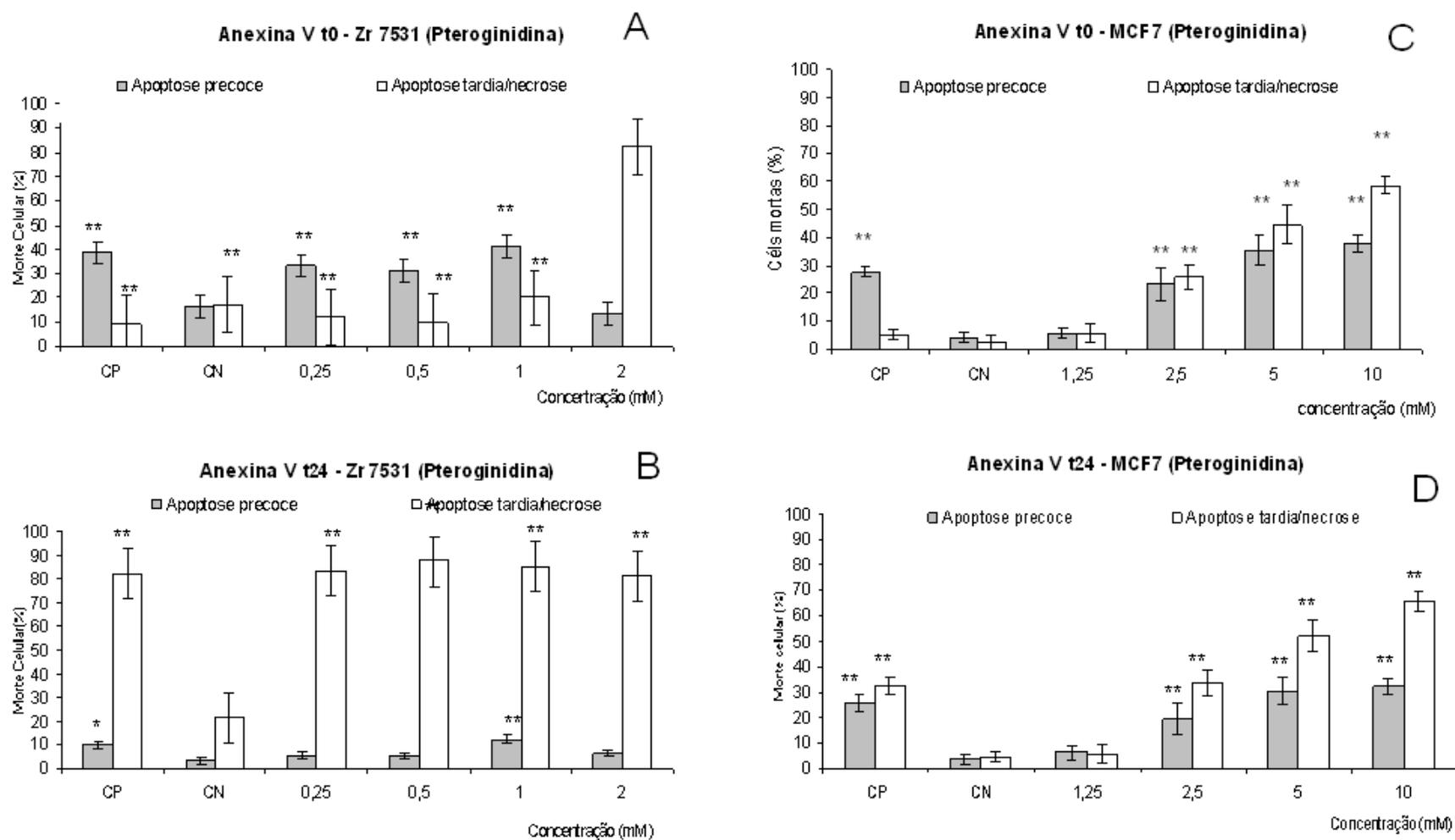


Figura 14. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio. **(A)** (** Apoptose precoce ($p < 0,01$) (** Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$) **(B)** (** Apoptose precoce ($p < 0,01$) (** Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$). **(C)** (** Apoptose precoce ($p < 0,01$) **(D)** (** Apoptose precoce ($p < 0,01$). (** Apoptose tardia/Necrose ($p < 0,01$).

4.3 Ensaio de Hoescht/ Iodeto

O método de Hoescht e Iodeto foi utilizado para a melhor caracterização de apoptose precoce, tardia e necrose. Podemos observar o padrão morfológico e de coloração (Figura 15A e 15C) fluorescente azul pelo Hoeschst e fragmentação nuclear representativo de apoptose precoce (AP). Em contrapartida, podemos notar os padrões de apoptose tardia (AT), onde vemos núcleos com cromatina fragmentada e coloração vermelha fluorescente (Iodeto de propídio) e necrose com núcleo normal e coloração fluorescente vermelha (Figura 15B e 15D).

No tratamento com pteroginina t0 (Figura 16A), foi possível observar apoptose (precoce e tardia) em 32 a 47% e necrose em 11 a 43% ambos na linhagem ZR 7531. Portanto, observou-se um aumento dose-resposta de apoptose com o tratamento com Pteroginina quando comparado com o controle negativo. Em todas as concentrações foi observado apoptose total (precoce + tardia) ($p < 0.05$) enquanto a necrose só foi observada nas maiores concentrações ($p < 0.01$). Nas menores concentrações foi possível observar que as células tratadas, principalmente na concentração de 1.125mM, apresentaram um aumento de apoptose precoce e tardia em relação àquelas que estariam em necrose. Assim, no tratamento sem recuperação (t0), 30 a 47% das células estariam em apoptose, destas 17% em apoptose precoce e 28% em apoptose tardia, enquanto 11 a 43% das células tratadas estariam em necrose (Figura 16B).

Quando as células de carcinoma ductal invasivo (ZR 7531) foram tratadas com Pteroginina por 24 horas e avaliadas no período de recuperação de 24 horas (t24), observou-se que as células pós-recuperação mantiveram sinais de apoptose (precoce e tardia) em 25 a 48% das células e a diminuição de necrose, com resposta entre 16 a 30% (Figura 16C). Quando comparado com o controle negativo

as células do período pós-recuperação apresentaram apoptose total nas concentrações de 1.125, 3.375 e 10.125mM, 43, 48 e 41 respectivamente ($p < 0.01$). Não foi observada diferença estatística entre o controle negativo e as células em necrose. Em contrapartida, quando as células foram avaliadas no período de 24 horas de recuperação pós-tratamento (t24), 25 a 48% apresentaram apoptose total destas 9% em apoptose precoce e 26% em apoptose tardia, enquanto 16 a 31% em necrose (Figura 16D).

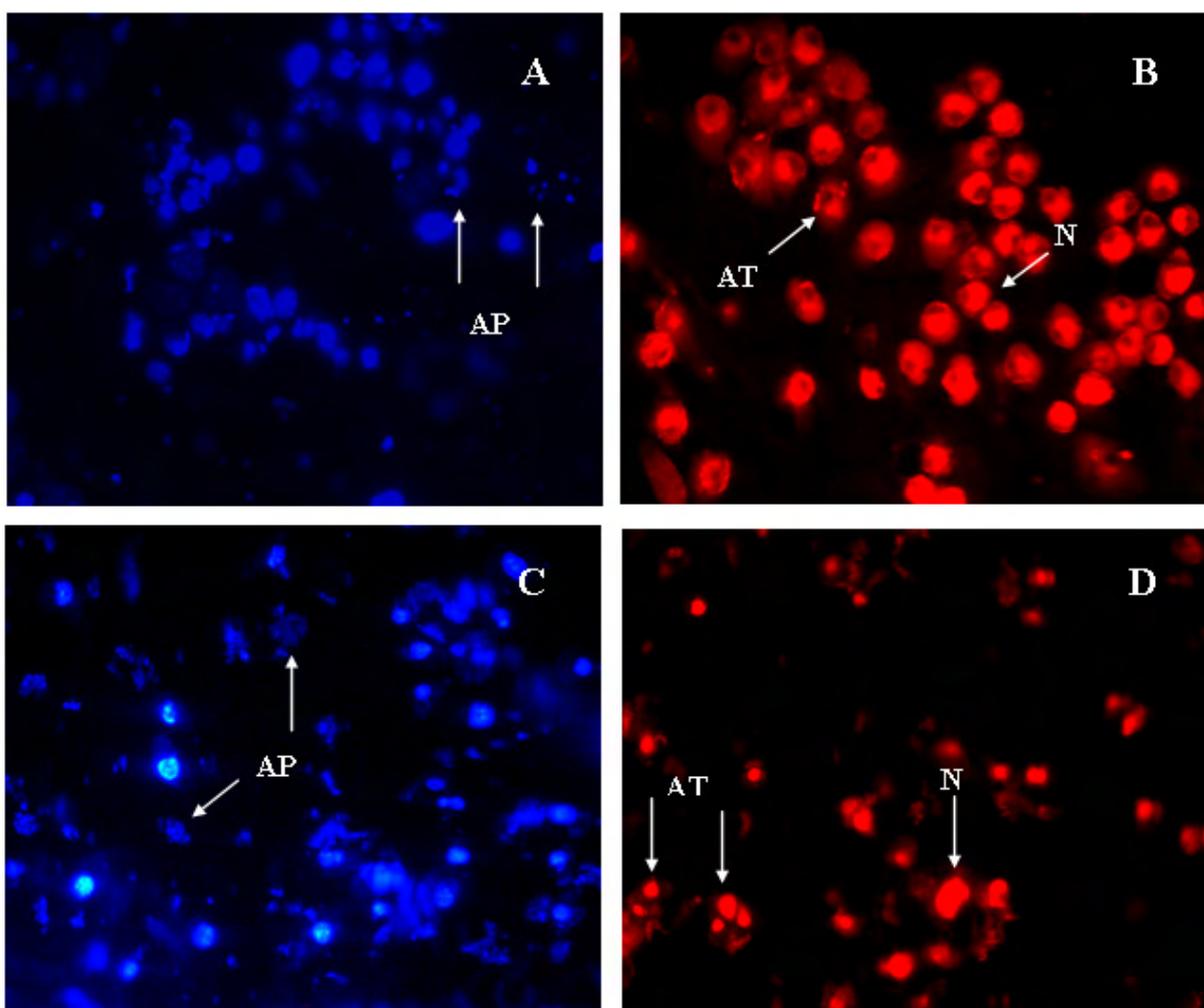


Figura 15. Ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst Iodeto. Células ZR-7531 tratadas com Pteroginidina (1.0mM A e B) e Pteroginina (3.375mM C e D). A) e C) células apoptóticas precoce (AP) com núcleos apoptóticos corados pelo Hoechst com fluorescência no espectro azul (setas); B) e D) Apoptose tardia (AT) e necrose (N) corados com Iodeto de propídio apresentando fluorescência no espectro

do vermelho (setas). Micrografias em microscópio de fluorescência observadas em absorvância de 360 e 538 nm com objetiva de 40x.

No tratamento sem período de recuperação (t_0) da linhagem ZR 7531 com o alcalóide pteroginidina (Figura 17A), foi possível observar apoptoses (precoce e tardia) em 33 a 53% e necrose em 6 a 28%. Portanto, observou-se um aumento dose-resposta de apoptose total com o tratamento com pteroginidina quando comparado com o controle negativo. Com o aumento das concentrações foi possível observar que as células tratadas apresentaram um aumento gradativo de apoptose total assim como àquelas que estariam em necrose. Assim, no tratamento sem recuperação (t_0), 33 a 53% das células estariam em apoptose, destas 23 a 30% em apoptose precoce e 16% a 40% em apoptose tardia, enquanto 6 a 28% das células tratadas estariam em necrose (Figura 17B).

Quando as células ZR 7531 foram tratadas com Pteroginidina por 24 horas e avaliadas no período de recuperação de 24 horas (t_{24}), observou-se que as células pós-recuperação mantiveram sinais de apoptose (precoce e tardia) em 13 a 26,73% das células e o aumento gradativo de necrose, com resposta para necrose entre 17 a 35,5% (Figura 17C). Quando comparado com o controle negativo as células do período pós-recuperação apresentaram apoptose em todos os tratamentos nas concentrações de 0.25, 0.5, 1.0 e 2.0mM ($p < 0.01$). As células foram avaliadas no período de 24 horas de recuperação pós-tratamento (t_{24}), 27 a 48,6% apresentaram apoptose destas 13% em apoptose precoce e 26,7% em apoptose tardia, enquanto 17 a 35% em necrose (Figura 17D).

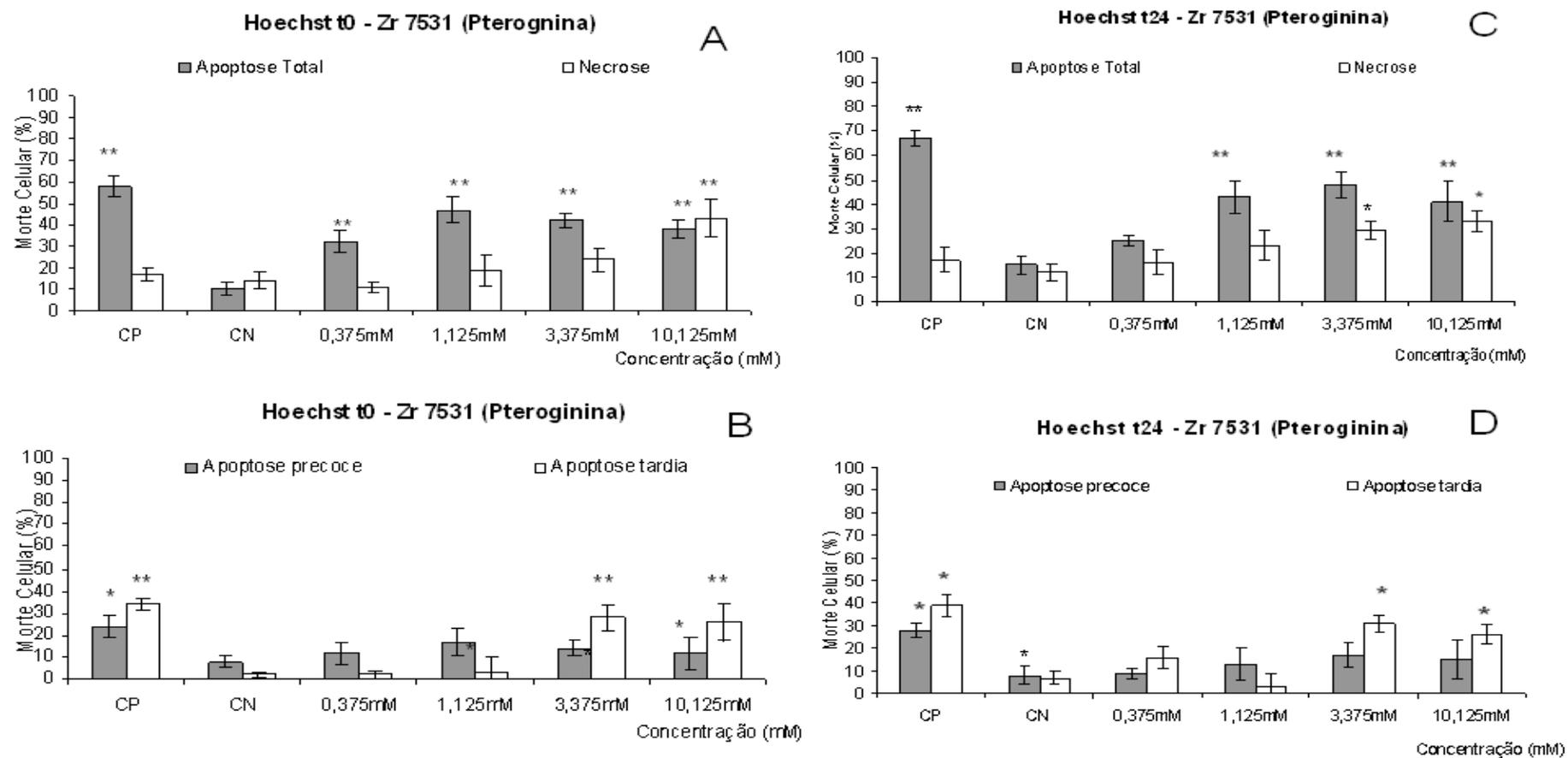


Figura 16. Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio. **(A)** (** Apoptose Total ($p < 0,01$). (** Necrose ($p > 0,01$). **(B)** (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (** Apoptose tardia ($p < 0,01$). **(C)** (** Apoptose Total ($p < 0,01$). (*) Necrose ($p < 0,05$). **(D)** (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (** Apoptose tardia ($p < 0,05$).

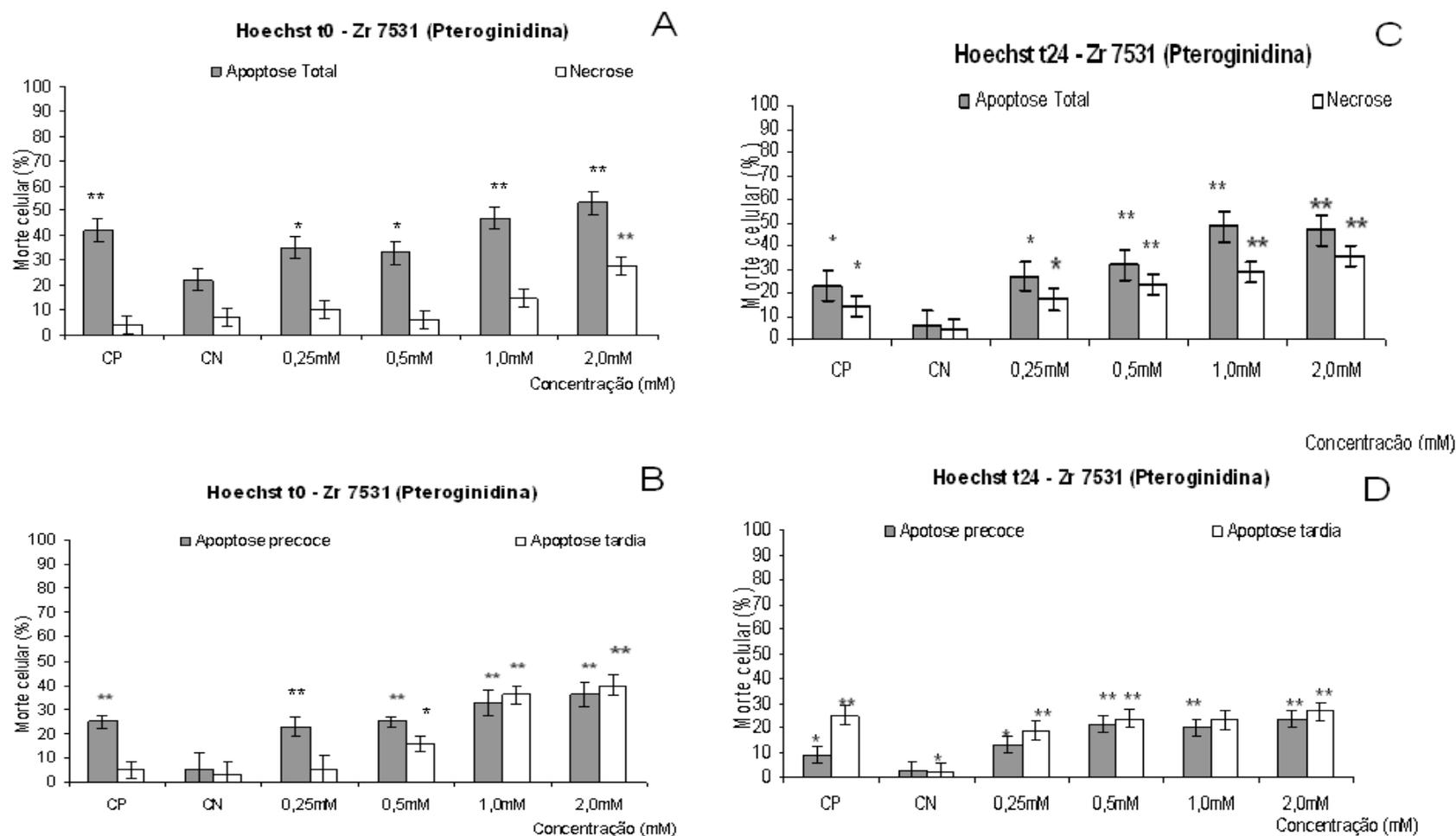


Figura 17. Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio. **(A)** (**) Apoptose Total ($p < 0,01$). (*) Apoptose Total ($p < 0,05$). **(B)** (**) Apoptose precoce ($p < 0,01$) (**) Apoptose tardia ($p < 0,01$). (*) Apoptose tardia ($p < 0,05$). **(C)** (**) Apoptose Total ($p < 0,01$) (*) Apoptose Total ($p < 0,05$). (*) Necrose ($p < 0,01$). (*) Necrose ($p < 0,05$). **(D)** (**) Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (**) Apoptose tardia ($p < 0,01$).

Avaliando-se a mesma substância em linhagem MCF-7 foi possível observar que em todas as concentrações há o predomínio de apoptose em relação à necrose. A concentração máxima (10.0mM) apresentou uma maior porcentagem de células em apoptose (52%) quando comparada ao controle positivo (45%), porém a quantidade de células em necrose aumenta cerca de 5 vezes em relação ao controle positivo (Figura 18A). Quando a apoptose é avaliada em precoce e tardia (Figura 18B), é possível observar o aumento na porcentagem de células em apoptose tardia em todas as concentrações como também o controle positivo. A concentração de 10.0mM determina a máxima porcentagem de células em apoptose tardia (45%) e em apoptose precoce (40%).

No tratamento de 24 horas com recuperação de 24 horas (t24), quando avaliamos as células de adenocarcinoma (MCF-7) após o tratamento com pteroginidina um efeito dose-resposta tanto para apoptose total quanto para necrose. Todas as concentrações apresentam valores maiores que a porcentagem do controle negativo para ambos parâmetros relacionados com a concentração do composto (Figura 19C). Quando avaliamos as células diferenciando os estágios de apoptose, as células deixam de apresentar uma curva dose-resposta. Para todas as concentrações observou-se porcentagens similares, supondo que as concentrações não estão relacionadas ao efeito produzido nas células. A porcentagem apresentada para a apoptose precoce variou de 9,4 a 24,8%, enquanto que para a apoptose tardia tivemos uma variação de 13 a 42% (Figura 19D).

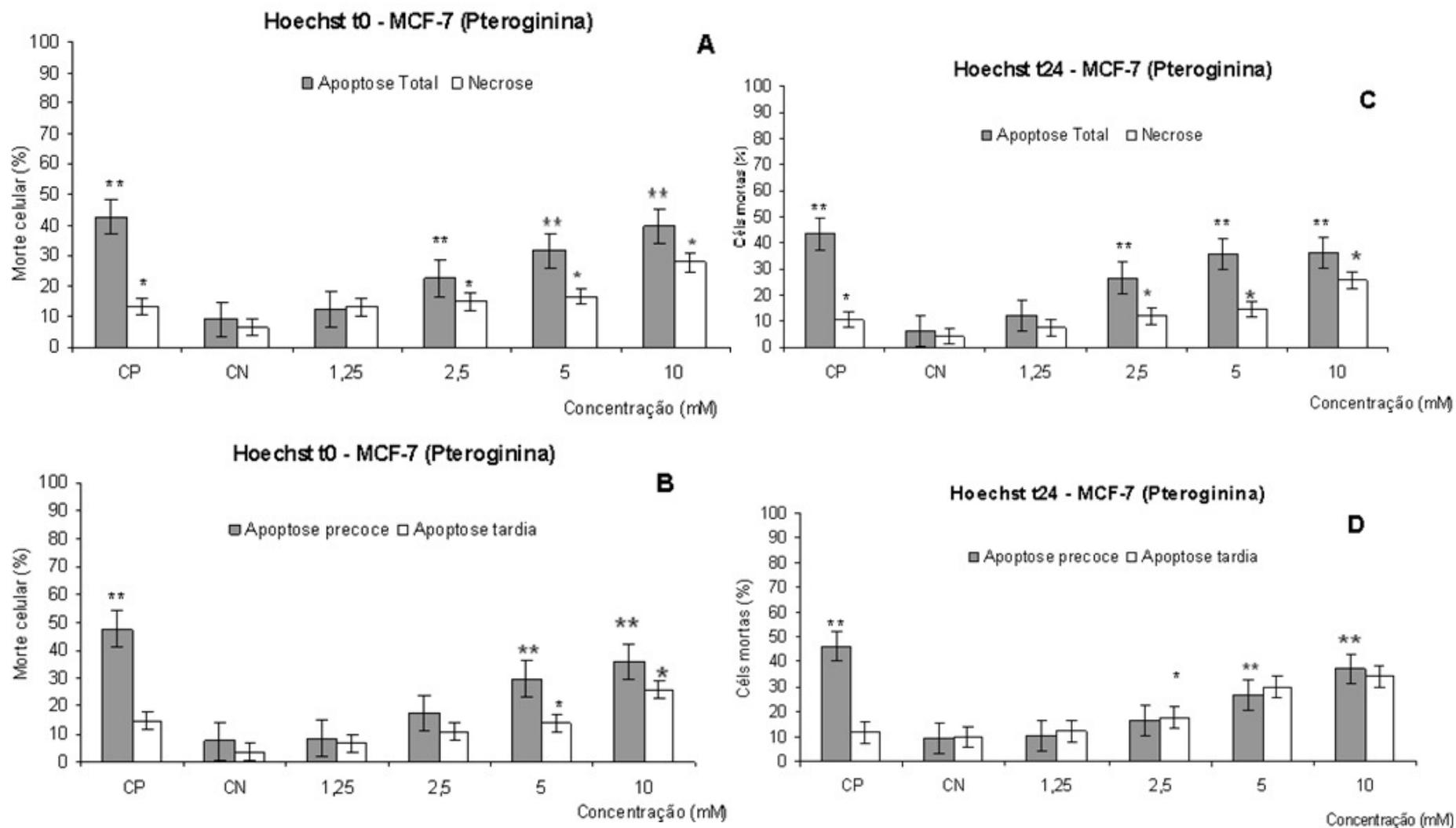


Figura 18. Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio. A) (** Apoptose Total ($p < 0,01$). (*) Necrose ($p < 0,05$). B) (** Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose tardia ($p < 0,05$). C) (** Apoptose Total ($p < 0,01$). (*) Necrose ($p < 0,05$). D) (** Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose tardia ($p < 0,05$))

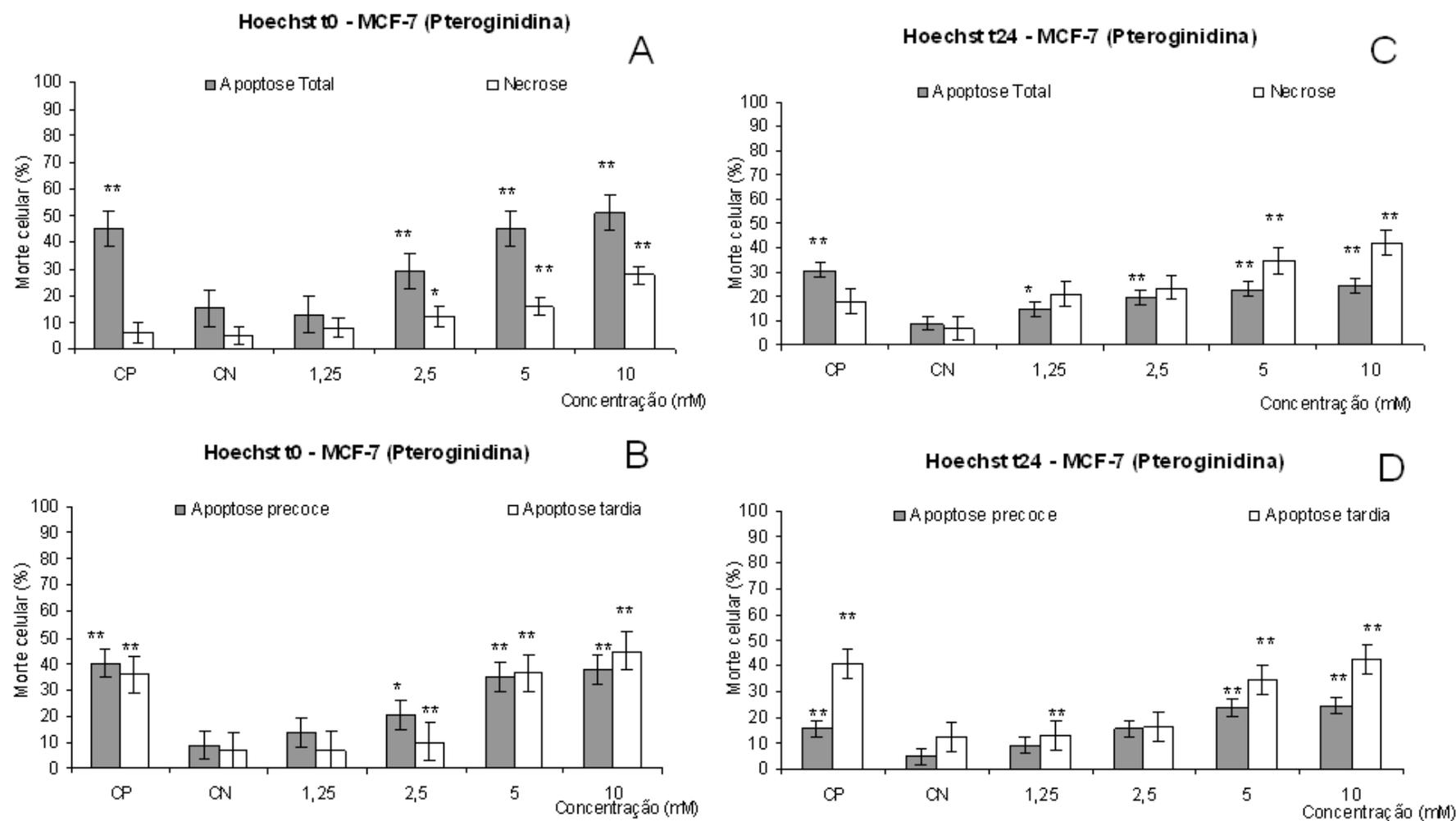


Figura 19. Ensaio de apoptose por Hoescht e Iodeto de propídio. **(A)** (** Apoptose Total ($p < 0,01$) (** Necrose ($p < 0,01$). (*) Necrose ($p < 0,05$) **(B)** Representação da apoptose precoce e tardia. (** Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (** Apoptose tardia ($p < 0,01$) **(C)**. (** Apoptose Total ($p < 0,01$). (** Necrose ($p < 0,01$). **(D)** (** Apoptose precoce ($p < 0,01$). (*) Apoptose precoce ($p < 0,05$). (** Apoptose tardia ($p < 0,01$).

4.4 Ensaio da Caspase 3/7

A medida da atividade das caspases 3 e 7 como um indicador de apoptose foi avaliada utilizando o ensaio luminescente, este ensaio fornece um substrato luminogênico que contém a seqüência tetrapeptídeo DEVD, que após a clivagem pela caspase 3/7 gera um sinal luminoso, produzido pela luciferase.

A figura 20A refere-se a resposta da atividade da enzima caspase 3/7 na linhagem celular ZR-7531 exposta ao tratamento com pteroginina por 24 horas sem recuperação (t0), observou-se um aumento significativo na atividade da caspase 3/7 na concentração de 1,125mM ($p < 0,05$), sugerindo que resposta de caspase 3/7 foi maior concentração intermediária e menor atividade na menor concentração (0,375 mM) e na maior concentração 3,375 mM.

Na incubação de 24 horas, seguida de recuperação, a concentração Caspase 3/7 liberada no sobrenadante das culturas apresentou um discreto aumento significativo dose resposta da caspase-3/7 (Figura 20B) que, corresponde aos dados obtidos a partir do ensaio de atividade, confirmando a ativação destas caspases.

O ensaio da atividade da caspase 3/7 tratadas com a pteroginidina t0 e t24 diminuiu em todas as concentrações nos dois períodos, exceto na concentração 0,25 mM do período t0, verificou aumento significativo da amostra após tratamento (Figura 21A e 21B).

A apoptose avaliada com ambas substâncias na linhagem de adenocarcinoma de mama, figura 20C A e 20D mostra um aumento significativo e similares no período t0 e t24 para pteroginina, mas apresenta níveis basais de morte celular comparado com o controle negativo ($p < 0,05$).

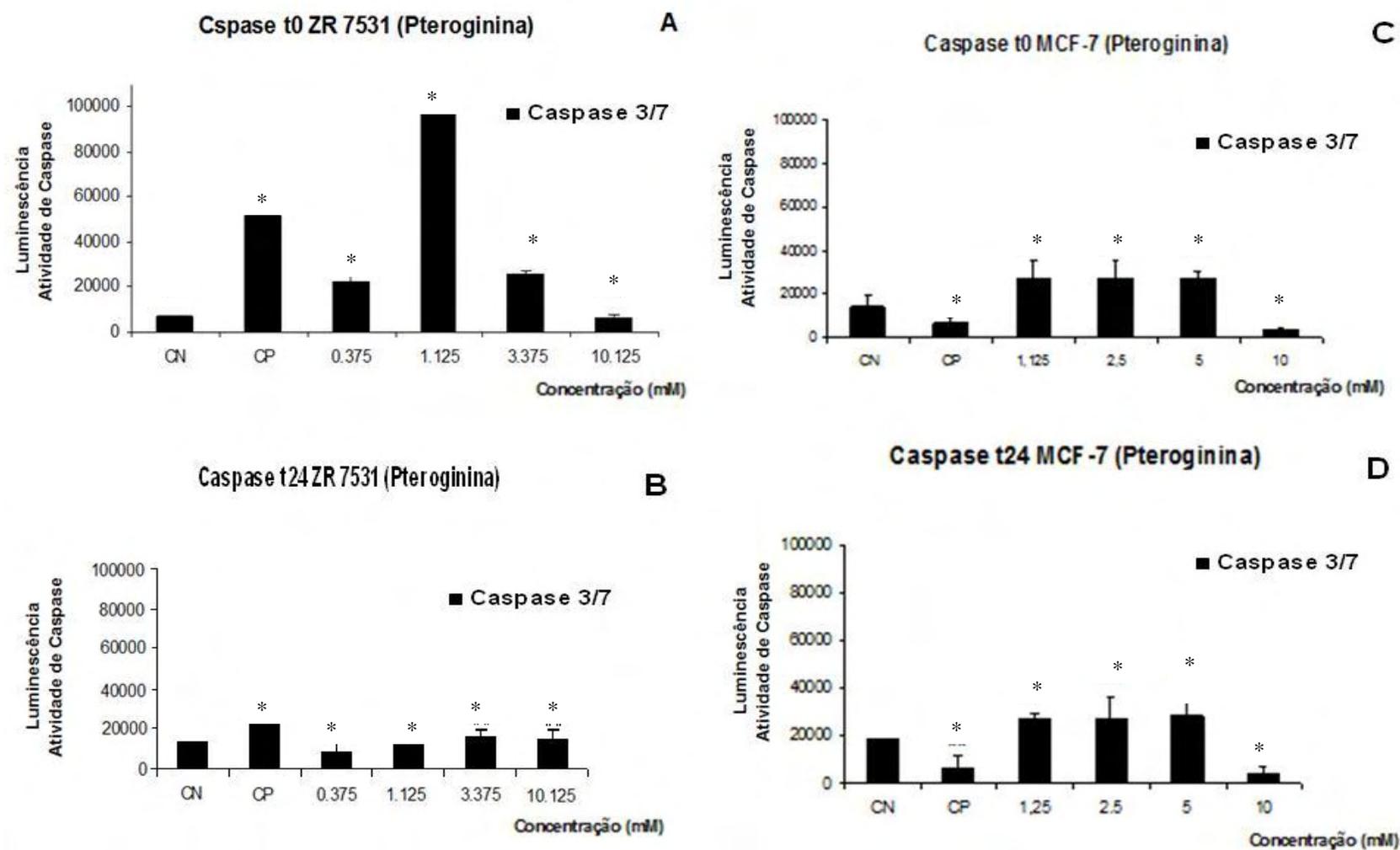


Figura 20. Ensaio de apoptose por luminescência por ativação da caspase 3/7. **(A)** Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). **(B)** Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). **(C)** Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). **(D)** Atividade da caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$).

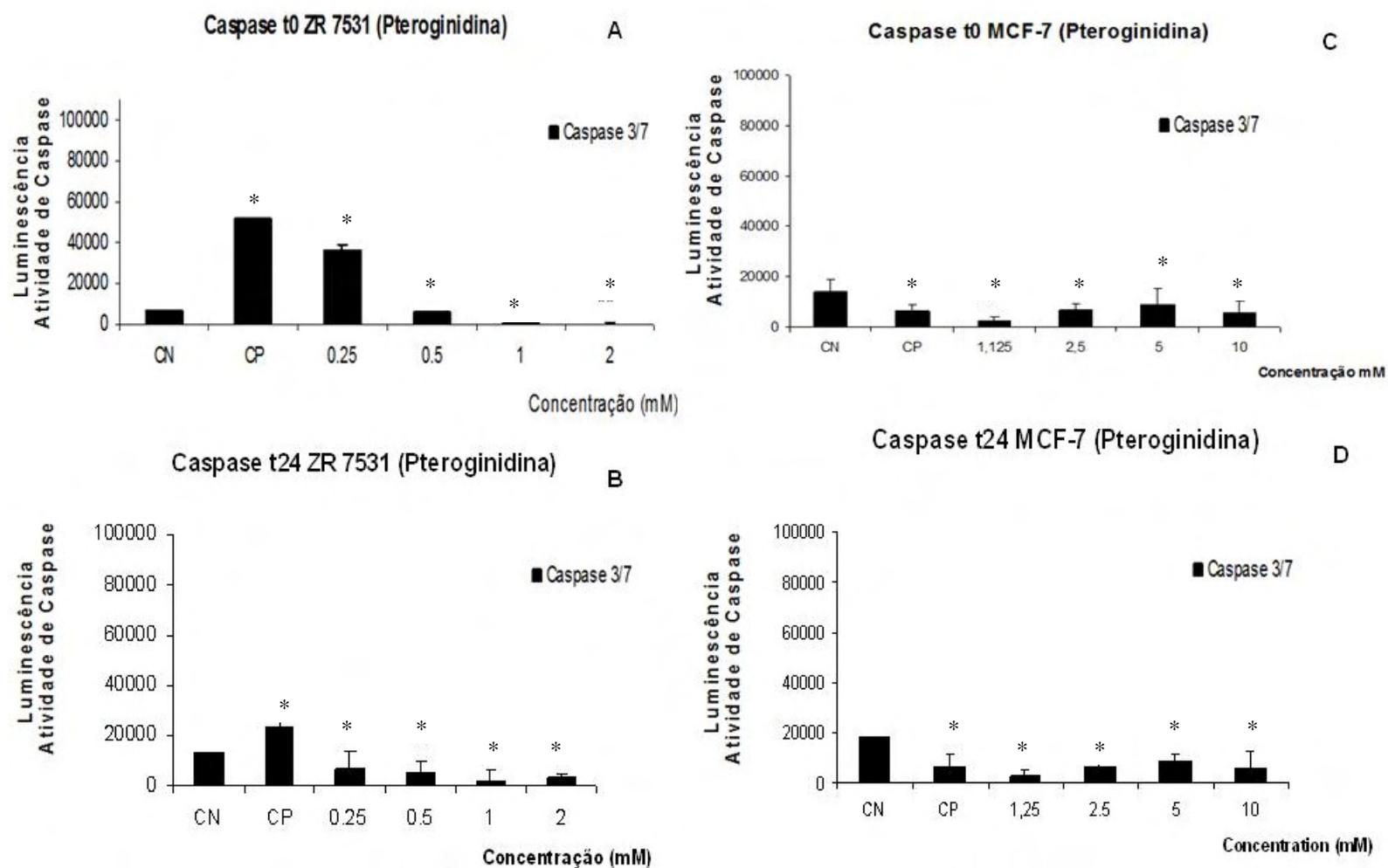


Figura 21 Ensaio de apoptose por luminescência por ativação da caspase 3/7. (A) Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). (B) Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). (C) Atividade caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$). (D) Atividade da caspase 3/7 (*) ($p < 0,05$).

Entretanto, nota-se que não ocorreu o mesmo comportamento da linhagem MCF-7 no período t0 e t24 para a pteroginidina (figura 21C e 21D). Observa-se que reduziu drasticamente o nível de atividade da concentração de caspase abaixo do nível basal, indicando uma baixa expressão de caspase 3/7. Portanto não foi observada a clivagem da caspase 3/7 nestas condições confirmando que estas substâncias não são capazes de induzir a ativação dessas enzimas, sugerindo ativação de morte celular por necrose.

5. DISCUSSÃO

Estudos sobre o câncer de mama vêm sendo desenvolvidos a passos largos nos últimos anos, revelando descobertas promissoras cujo objetivo é desenvolver opções de tratamento individualizadas e, com isso o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer de mama, especialmente a cura para os casos de tumor de mama avançado (AAPRO, 2001).

Atualmente tem sido enfatizada a relação entre apoptose e câncer, sugerindo que a progressão da neoplasia envolve alteração dos estágios de apoptose em células normais. Apoptose é uma morte celular programada que é a única forma exatamente regulada responsável por remover células disfuncionais, velhas ou danificadas (YANG *et al.*, 2006). Portanto, um importante processo fisiológico para manter o equilíbrio homeostático da regeneração de células teciduais ou remoção de células mortas. Uma vez iniciada a apoptose, ocorrem inúmeras variações morfológicas, como: perda de volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de vesículas citoplasmáticas que formam os chamados corpos apoptóticos (WU *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2006). O crescimento do tumor é determinado não somente pela progressão das células malignas, mas também pela velocidade com a qual estas células são mortas e eliminadas. Estudos que utilizam modelos animais e cultura de células têm demonstrado que a maioria dos cânceres apresenta alguma falha em programar a morte da célula neoplásica. Sendo assim, inibir o crescimento do tumor e induzir a morte nestas células tumorais acabam sendo estratégias terapêuticas ideais (YANG *et al.*, 2006).

Apesar da apoptose ser um processo essencial para todos os organismos multicelulares, ela também está envolvida ou associada a uma ampla variedade de doenças e condições patológicas (CHANDRA *et al.*, 2001; REED 1998). Isto tem revelado um atrativo alvo potencial para o tratamento de várias doenças. O processo

de desregulação da apoptose relacionado ao aumento inapropriado da morte celular pode resultar em doenças como isquemias, patologias neurodegenerativas, por outro lado a diminuição da apoptose, frequentemente associada a vários tipos de tumores e doenças autoimunes. Assim a regulação da apoptose nestas patologias podem ser beneficiadas com tratamentos específicos. Entretanto, vários assuntos ainda precisam ser discutidos antes do sucesso da regulação da apoptose ser implementada para o tratamento de doenças.

Como mencionado acima, apoptose é processo fisiológico essencial e amplo, qualquer tipo de distúrbio deste processo resulta em vários efeitos colaterais. Um dos primeiros mecanismos a sentir esta desestabilização, são as caspases iniciadoras através de várias cascatas de sinalização da apoptose que convergem no ponto alvo crucial anti-apoptotico das caspases executoras. Acreditava-se não ser necessário o conhecimento da cascata de sinalização da apoptose envolvida no processo de doença, mas devido as falhas nas tentativas de tratamentos, provavelmente por alta toxicidade e severos efeitos colaterais. Sabe-se hoje que o problema no tratamento de doenças específicas é frequentemente a falta de conhecimento do caminho apoptotico envolvido. Em outras palavras, para ser bem sucedida precisa ser em um alvo específico possibilitando inibir ou ativar o caminho envolvido no processo de doença. Em geral, o mecanismo de restrição da apoptose através do caminho mitocondrial, seria a de intervenção do passo de perturbação da função mitocondrial antes da ativação de proteínas Bax e/ou Bak, e sua oligomerização na membrana. Isto seria uma perturbação restrita da sinalização da apoptose em células, afetando somente a ativação funcional específica do processo de Bax/Bak. (KINNALLY & ANTONSSON, 2007).

Assim, manteria totalmente a função mitocondrial nas células, das quais pode ser extremamente importante em muitas condições onde a apoptose não é a causa direta da doença. Talvez, esta dificuldade em predizer qual efeito a inibição da apoptose terá no processo da doença. A inibição da apoptose pode limitar ou impedir dano ou destruição do tecido, favorecendo a recuperação e reduzindo os prejuízos. Em várias doenças a morte celular não é exclusivamente por apoptose, a necrose frequentemente está envolvida e o limite entre os dois processos não está bem definido. A célula pode presentir entrar na cascata de apoptose, mas no final por condições de conversão a célula entra em morte necrótica (NICOTERA, *et al.*, 1999).

Recentes evidências sugerem que as células tumorais com alterações na função apoptótica, podem divergir para outro caminho de morte celular, como a necrose apresentando perda da integridade física e promovendo portanto uma alternativa de abordagem terapêutica (ZONG & THOMPSON, 2006; DEGENHARDT *et al.*, 2006; ZONG *et al.*, 2004). A necrose aparece em células tumorais com erros na função apoptótica quando a taxa de consumo de energia excede a energia produzida. Este tipo de morte celular mais uma vez suporta a idéia da regulação do metabolismo celular ser um atrativo alvo terapêutico alternativo. Embora a necrose seja um mecanismo menos eficiente de morte celular comparado com a apoptose, ainda, permanece um meio tratável de morte das células tumorais com defeito na apoptose, apesar das possíveis consequências da promoção da inflamação. (DEGENHARDT *et al.*, 2006).

Aparentemente células tumorais com defeitos na apoptose requerem um processo catabólico da autofagia para promover uma origem alternativa de energia em períodos de privação metabólica inibida durante a necrose (DEGENHARDT *et al.*,

2006; LUM *et al.*, 2005). A autofagia é um processo onde as organelas e citoplasma volumosos são alvos de degradação pelos lisossomos (KLIONSKY, 2005) Células normais de mamíferos necessitam da autofagia basal para renovação de organelas e proteínas para manter o metabolismo e viabilidade durante períodos de privação de nutrientes (HARA *et al.*, 2006; KOMATSU *et al.*, 2006; KOMATSU *et al.*, 2005). Em células tumorais, a autofagia é necessária para manutenção do metabolismo e viabilidade celular, até o restabelecimento de suprimentos. Se persistir a deprivação de nutrientes, a célula progressivamente conduz a morte celular autofágica. Assim, em contraste da apoptose que é um processo rápido e irreversível de morte, o caminho autofágico é capaz de sobreviver ao estresse metabólico, além de poder ser interrompido (DEGENHARDT *et al.*, 2006).

Assim, a apoptose em muitos tratamentos, deve assegurar que as células não apenas mude o caminho para morte necrótica, das quais pode no final agravar em vez de melhorar a condição celular. É óbvio também que a ativação da morte celular programada deve ser focada nas células alvo da doença, minimizando os efeitos colaterais por indução inapropriada da apoptose em outras células e tecidos.

Dessa forma, é recomendável o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o câncer e para doenças neurodegenerativas, sendo necessário aprofundar o entendimento da integração dos múltiplos caminhos de morte celular.

As plantas, algumas vezes, têm sido utilizadas como agente medicinal popular desde o início da humanidade. O desenvolvimento de princípios ativos derivados de plantas e seus análogos sintéticos e semi-sintéticos serviram como caminho para descoberta de novos produtos farmacêuticos da medicina moderna. Desde 1961, vários compostos derivados de plantas foram aprovados como drogas anti-câncer nos USA: como vincas alcaloides, podofilotoxina, etoposídeo, teniposídeo,

camptotecinas e taxanos, estabelecendo uma possibilidade para o tratamento quimioterapêutico em muitos tipos de cânceres (LEE, 1999; NEWMAN & CRAGG, 2007).

Entretanto várias drogas anti-neoplásicas estão sendo avaliadas, quanto ao uso limitado por fatores como, baixo potencial, baixa solubilidade em água, toxicidade e resistência tumoral. Sendo assim necessário agentes anti câncer mais efetivos e seguros (SRIVASTAVA *et al.*, 2005).

O foco principal dos estudos da medicina tradicional e das formulações chinesas, na escolha de um novo agente potencial anti tumor, é direcionada na caracterização, no mecanismo de ação ou bioatividade para identificar novos compostos ativos. Planejando obter modificações nas estruturas das drogas gerando análogos sintéticos com aumento da atividade, diminuição da citotoxicidade ou melhorando o perfil farmacológico (LEE, 1999).

Produtos naturais com diversas atividades biológicas estão contribuindo para o desenvolvimento de aproximadamente de 75% das drogas (NEWMAN & CRAGG, 2007; LEE, 1999). Principalmente extratos ou substâncias isoladas de plantas têm sido freqüentemente avaliados quanto ao seu potencial anticarcinogênico. Artigos recentes demonstram extratos vegetais que são separados e purificados e assim entender os mecanismos de ação destas substâncias (SANDHYA & MISHRA, 2006). Pelo fato de muitos medicamentos utilizados no tratamento para câncer apresentarem estrutura semelhante ao de um alcalóide, atualmente estão isolando alcalóides de herbáceos nunca antes estudados para verificar os seus possíveis efeitos sobre a doença (SILVA *et al.*, 2008).

Embora a maioria dos estudos com alcalóides tenha como característica química comum grupamentos fenólicos (MCNULTY *et al.*, 2007; GRIFFIN *et al.*, 2007), a Pteroginina e Pteroginidina isoladas de *Pterogyne nitens* são alcalóides que apresentam em suas estruturas químicas grupamentos amina primária e terciária, com padrão de substituição do tipo *N,N*-diisoprenil. Pteroginidina apresenta padrão de substituição isoprenílica do tipo *N,N'*-diisoprenil o que confere menor polaridade e menor hidrossolubilidade em relação à pteroginina cujo padrão de substituição é do tipo *N,N*-diisoprenil. Alcalóides com grupamento amina e anéis indólicos foram estudados e demonstraram atividade antitumoral, antiviral, antifúngica e antiinflamatória (BAO *et al.*, 2004; DASSONNEVILLE *et al.*, 2000). Outras estruturas de alcalóides isolados de plantas estão sendo relacionadas a atividades analgésicas, antiarrítmicas e imunomodulatórias (XU *et al.*, 2006). Porém nenhum destes têm sido considerados compostos com atividade importante em tumores sólidos, incluindo o câncer de mama. Sendo assim, cada vez mais estudos apresentam linhagens celulares tumorais tratadas com alcalóides na busca de alguma atividade antitumoral, com diminuição da proliferação celular e indução de apoptose dose-resposta e tempo-resposta (HUANG *et al.*, 2003).

A Pteroginidina se trata de um composto guanidínico com substituição *N*₁,*N*₂-diisoprenil que quando comparado ao *N*₁,*N*₂,*N*₃-diisoprenil apresentou uma citotoxicidade razoável em relação ao alcalóide trissubstituído que se demonstrou altamente tóxico nas linhagens celulares (MAVAR-MANGA *et al.*, 2008). A modificação de grupamentos químicos ou a mudança de posição cis-trans de grupamentos pode conferir não só modificação de polaridade, bem como a modificação de sua atividade (BANSKOTA *et al.*, 2002; REGASINI *et al.*, 2008).

Quando, nesse estudo, comparamos a citotoxicidade de ambos alcalóides, podemos observar maior atividade citotóxica da Pteroginidina em relação a Pteroginina devido às suas concentrações próximas ao seu respectivo IC50 serem menores. A Pteroginina no período sem (t0) e com recuperação (t24) e a Pteroginidina no período sem recuperação (t0) demonstraram possuir um mesmo efeito-dose resposta para apoptose precoce em todas as concentrações estudadas. Já a Pteroginidina apresentou um efeito dose-resposta similar tanto para apoptose precoce quanto para a apoptose tardia no tratamento seguido de período de recuperação de 24 horas. Dessa maneira podemos sugerir que as substituições na estrutura guanidínica dos alcalóides poderiam estar relacionadas com a intensidade do efeito produzido nas células. Geralmente a relação entre estrutura e atividade de um composto é interessante para se conhecer a função dos grupamentos substituídos e conseqüentemente seu mecanismo de ação (SAKURAI *et. al.*, 2005).

Os nossos resultados, até o presente momento, sugerem que ambos alcalóides isolados de *Pterogyne nitens* possivelmente induzem a apoptose em células tumorais de câncer de mama. Indução de uma morte celular programada que existe na sua forma latente em todas as células do corpo inclusive as tumorais acaba se tornando uma terapia vantajosa quando comparada à outros mecanismos de ação de quimioterápicos convencionais.

Dessa maneira, a investigação de novos compostos é desejável na busca para um tratamento mais efetivo contra câncer de mama. Os alcalóides propostos para o presente estudo isolados na *P nitens*, ainda não foram plenamente investigados para a atividade biológica anti-tumoral em linhagens celulares de câncer de mama, podendo ter ação nessas linhagens neoplásicas e permitindo o restabelecimento dos sinais de apoptose.

Estudos prévios demonstram que alcalóides possuem atividade antiproliferativa importante para tumores sólidos (ZHANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2005). Ainda esses compostos demonstram possuir seletiva citotoxicidade, fato este que estimula a melhor investigação de sua atividade anticarcinogênica. Assim, podendo atuar como um potencial agente na eficácia terapêutica em pacientes com câncer de mama.

Em nosso laboratório foi demonstrado que esses alcalóides de *P.nitens* são capazes de induzir a diminuição da proliferação celular em linhagens celulares de câncer de colo uterino (SiHa, Hela e C33A) e câncer de pulmão (A549). Esses estudos estimularam a investigação do efeito antiproliferativo em linhagens celulares de câncer de mama com diferente *background* genético (carcinoma ZR 7531 *versus* adenocarcinoma MCF-7).

Outros trabalhos utilizando extratos de plantas, onde foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, contra células de ovários de hamster chineses sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides, e de flavonoídes com atividade inibitória da mieloperoxidase e como um potencial agente antioxidante (BOLZANI *et al.*, 1995; FERNANDES *et al.*, 2008; REGASINI *et al.*, 2008 a,b; REGASINI, 2008c).

Entretanto, amplo espectro de atividades biológicas tem sido descrito para alcalóides guanidínicos de origem marinha, sendo que, por outro lado, poucos estudos relatam o potencial de produtos obtidos de plantas altas com atividade anti-câncer (BERLINCK, 1996; BERLINCK, 2002). Alguns compostos isolados de *P.nitens*, nitensidina D e E, pteroginina, pteroginidina foram avaliados *in vitro* quanto a atividade citotóxica pelo ensaio de MTT em linhagens de leucemia mieloblástica

humana (HL-60), carcinoma de colon humano (HCT-8), melanoma humano (MDA-MB-435), e glioblastoma humano (SF-295). O valor médio da concentração inibitória (IC50) foi determinado usando protocolo do National Cancer Institute (NCI), os resultados demonstraram que todos os compostos foram inativos com IC50 > 5 µg/mL para todas as linhagens celulares, exceto a nitensidina E que apresentou maior atividade entre os compostos em diferentes linhagens celulares (REGASINI *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi possível observar que os alcalóides Pteroginina e Pteroginidina, extraído de *Pterogyne nitens* (Fabaceae) única espécie do gênero e que representa uma fonte de inúmeros alcalóides guanidínicos citotóxicos (Bolzani, 1995), apresentaram efeito citotóxico dose-resposta em linhagem celular de carcinoma ductal (ZR 7531) invasivo e adenocarcinoma (MCF-7). Aparentemente, a melhor resposta citotóxica foi observada no tratamento sem recuperação para ambas substâncias e maior intensidade do efeito foi observado para a Pteroginidina. Diversas plantas, inclusive a *P. nitens*, parecem possuir princípios ativos capazes de controlar a proliferação desordenada das células malignas. A citotoxicidade dos alcalóides isolados de *P. nitens* já foi estudada em células gastrointestinais ulceradas e neste estudo foi demonstrada a ação antiinflamatória das substâncias (MAVAR-MANGA *et al.*, 2006). Embora a Pteroginina e Pteroginidina demonstre efeito citotóxico dose-resposta, aumento de morte celular em linhagem de carcinoma ductal invasivo e adenocarcinoma de mama, é preciso avaliar qual o tipo de morte celular está sendo induzida. O ideal para uma boa substância anticarcinogênica é a indução de morte celular por apoptose pois se trata de uma forma altamente regulada e organizada de morte celular programada (YAN *et al.*, 2008), observada

em resposta a numerosos estímulos (BRAS *et al.*, 2005) que elimina células não viáveis como um programa intrínseco de suicídio celular (STANDER *et al.*, 2007).

Na avaliação de apoptose induzida pela Pteroginina e Pteroginidina em linhagem ZR 7531 pelo método da anexina V, foi observado um maior efeito dose-resposta de apoptose tardia/necrose e um pequeno e similar de apoptose precoce em todas as concentrações. Primeiramente o ensaio de apoptose foi avaliado por citometria, ambos os alcalóides de *P. nitens* apresentaram efeitos anti-apoptóticos distintos, sendo que a Pteroginina apresentou apoptose tardia/necrose tanto no tratamento por 24 horas quanto no tratamento seguido de período de recuperação, enquanto que a Pteroginidina apresentou no período de recuperação pós-tratamento um efeito intenso de apoptose tardia/necrose. Esses resultados poderiam sugerir que a apoptose precoce e apoptose tardia/necrose são mais exuberantes no tratamento sem recuperação, possivelmente indicando etapas finais do processo de apoptose e/ou necrose.

Por outro lado, menor porcentagem de células estariam em apoptose precoce e a maioria em apoptose tardia/necrose no período de recuperação pós-tratamento, possivelmente indicando as células continuariam o processo de morte celular (apoptose ou necrose) em etapas posteriores ao tratamento. Sendo assim, muitas células mortas por apoptose apresentam características fisiológicas semelhantes a uma célula morta por necrose após certo período de tratamento (SUN *et al.*, 2005). Somente proteínas BH3, induzem a morte celular tipo necrose (VANDE *et al.*, 2000). A necrose nestes casos, serve como substituto para apoptose mediada por caspase (OPPENHEIM *et al.*, 2001).

A análise de apoptose (Anexina V) por citometria de fluxo das células de adenocarcinoma de mama (linhagem celular MCF-7) observou-se que o efeito dose-

resposta é mais pronunciado em relação ao efeito produzido nas células de carcinoma ductal invasivo (linhagem celular ZR-7531). Após o período de recuperação de 24 horas (t24) tanto para a Pteroginina quanto para a Pteroginidina verificou-se o aumento na porcentagem de células em apoptose tardia/necrose e diminuição de apoptose precoce como já havia sido observado em ZR 7531, porém menos pronunciado. Em um estudo com células MCF-7 tratadas com altas doses de tamoxifeno também induziu a morte celular por necrose (BURSCH *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de estratégias que aumente o potencial terapêutico das drogas citotóxicas anti-câncer, estão direcionadas na combinação quimioterápica, com objetivo de atingir menor toxicidade sistêmica e resistência as drogas (ARLEN *et al.*, 2001, HAAS, 2001). Suplementos dietéticos, bem como agentes fitoterápicos com alta eficácia anti-câncer e menor toxicidade em tecidos normais são sugeridos como possíveis candidatos para serem investigados para eficácia sinérgica em combinação com drogas anti-câncer (KELLOFF, 2000).

Células tratadas com doxorrubicina tem manifestado alterações nas características morfológicas associadas à apoptose, o que pode ser um dos mecanismos de ação desta substância além do intercalamento ao DNA. Tyagi, *et al.*, (2002), demonstraram resultados de efeitos de sinergismo terapêutico da doxorrubicina com o flavonóide silibina em células de câncer de próstata DU145, os efeitos encontrados *in vitro* em termos da inibição do crescimento celular com redução de um quarto da concentração inicial da dose de doxorrubicina 100 μ M, pode ser alcançado com 25 μ M em combinação com dose 100nM para silibina. Consistentemente mostrou que esta combinação por 48 horas induz forte efeitos de morte celular apoptótica 41%, comparados com os agentes sozinhos com 15% de células apoptóticas nestas linhagens.

Crawford & Bowen (2002), em estudo com agonistas dos receptores sigma 2, demonstrou induzir apoptose em várias linhagens de câncer de mama, inclusive a MCF-7 tratadas com 100 μ M de doxorrubicina por 48 horas pelo ensaio de ligação da anexina V, de maneira independente da ativação das caspases e proteína p53. Isto sugere, que o caminho apoptótico é distinto daqueles agentes que causam danos ao DNA e outros estímulos apoptóticos.

A Citometria de fluxo é um método qualitativo, quantitativo e exato para análise de apoptose (CHINKWO, 2005; BERTHO *et al.*, 2000), porém o ensaio não distingue a apoptose tardia da necrose, pois o método avalia a apoptose pela translocação da fosfatidilserina para a membrana externa fosfolipídica (GRIFFIN *et al.*, 2007; RÜCKER-MARTIN *et al.*, 1999). Entretanto, a avaliação de apoptose por esse método não permite determinar os diferentes estágios de apoptose, denominados precoce e tardia (PEC *et al.*, 2003; BOERSMA *et al.*, 2005). As células em necrose e em apoptose tardia exibem padrões característicos, especialmente quanto à permeabilidade de membrana para o iodeto de propídio que ao ser permeabilizado no citosol não podem ser distinguidos (MACIOROWSKI *et al.*, 1998; ELSTEIN & ZUCKER, 1994, PEC *et al.*, 2003). Outra desvantagem do ensaio por citometria de fluxo é o fato de procedimentos técnicos que antecedem a avaliação de apoptose (seleção celular ou centrifugação) enfraquecem a exposição de fosfatidilserina ou aumentam a ruptura de membrana o que poderia levar em resultados falso-positivos (KOROSTOFF *et al.*, 1998).

Assim, a seleção e identificação de células em apoptose tardia são mais difíceis de caracterizar no ensaio de anexina V quando comparada com o método de Hoechst/Iodeto (MACIOROWSKI *et al.*, 1998; ELSTEIN & ZUCKER, 1994).

Portanto, no presente estudo, para melhor caracterização das alterações que ocorrem na célula durante o estágio de apoptose precoce foi realizado o ensaio de Hoechst/Iodeto e comparado com os resultados de anexina V. (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992). São visíveis as mudanças morfológicas nucleares, na permeabilidade de membrana e na formação de corpos apoptóticos (MACIOROWSKI *et al.*, 1998). Assim, foi possível melhor observar a diferença entre os estágios de apoptose precoce e tardia nas células ZR 7531, no qual a Pteroginina no período sem (t0) e com recuperação (t24) e a Pteroginidina no período sem recuperação (t0) demonstraram possuir um maior efeito-dose resposta para apoptose tardia e menor efeito para apoptose precoce em todas as concentrações estudadas.

Quando avaliamos as células MCF 7 quanto ao ensaio de Hoechst, foi possível observar que no tratamento sem período de recuperação (t0) as células mais se apresentaram em apoptose tardia quando tratadas com Pteroginidina. Ao passo que tanto os valores de apoptose precoce quanto os de necrose permaneceram sem grandes variações. Porém, se observa o melhor comportamento das células tratadas com Pteroginina após o período de recuperação de 24 horas, pois os valores apoptose precoce e apoptose tardia são similares, supondo que toda vez que uma célula entra em apoptose, ela se encaminha para a apoptose tardia de forma equilibrada. A Pteroginidina por sua vez passa a apresentar aumento na porcentagem de células em necrose e em apoptose tardia.

A externalização da fosfatidilserine também foi induzida por produtos tóxicos em células T primárias e em células do epitélio renal na presença de inibidores de caspases e na ausência da atividade de caspases. Outros estudos sugerem que apoptose pode ocorrer na ausência de atividade de caspase incluindo o uso de

estaurosporina (LANKIEWICZ *et al.*, 2000; NUTT *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2004) e ceramida (JONES *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 2000). Sendo isto um mecanismo importante para determinar a externalização da fosfatidilserina na ausência de atividade de caspase.

Lock *et al.*, (2007) em estudo, com células de cancer renal Caki-1, utilizando a externalização da fosfatidilserina como marcador de apoptose, durante o tratamento com drogas anticancer 5-fluorouracil (5-FU), e pro-drogas, doxiluridina (Dox) e floxuridina (Flox), demonstrou ocorrer apoptose via mecanismo dependente de caspase, provavelmente causada pela ativação da caspase 3, como também demonstrada em Wu *et al.*, (2001).

Em contraste, a externalização da fosfatidilserina produzidas por estaurosporina na linhagem A-498 apresentou caminho independente de caspase, efeito similar ocorreu com Caki-1. Altas concentrações de pró-drogas foram necessárias comparadas 5-fluorouracil (5-FU) no aumento de anexina V, sugerindo baixo metabolismo celular. Da mesma maneira, as células foram tratadas 5-FU na presença do inibidor de caspase N-benzyloxycabonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (ZVAD), bloqueando a apoptose e ativação da caspase 3, a exposição celular com Dox e Flox na presença ZVAD, conduziu a morte celular necrótica depois de 96 horas de tratamento (LOCK *et al.*, 2007).

A descoberta da inibição das caspases e da mudança da forma de morte apoptótica por necrose tem sido relatada (LEMAIRE *et al.*, 1998).

Experimentos subsequentes foram conduzidos na presença de outros mediadores da externalização da fosfatidilserina. O tratamento dessas mesmas linhagens com o agente anti-câncer cisplatina (50 μ M) ou com o inibidor de proteína de quinase C estaurosporina (0.3 μ M) resultou em 20–30% de células anexina V

positivas. O tratamento com o inibidor de caspase N-benzyloxycabonyl- Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (ZVAD) bloqueou a ligação da anexina V depois do tratamento de 48 horas com cisplatina. O padrão de morte celular tem dividido entre apoptose da qual é programada e ativada por proteases e caspases específicas, e por necrose. Entretanto, agora acumula mais evidências que a morte da célula pode ocorrer na ausência e independentemente da ativação de caspase (LOCK *et al.*, 2007).

Lassus *et al.*,(2002), em um estudo com cinco linhagens de células tumorais humanas, demonstrou sensibilidade aos agentes citotóxicos amplamente utilizados nas pesquisas sobre câncer a cisplatina e etoposideo. Na linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549 e osteosarcoma U2OS, a caspase-2 e Apaf-1 foram necessárias para produção dos aspectos morfológicos da apoptose e liberação do citocromo c. Em, contraste, a linhagem de cancer de mama MCF-7 não requer ativação da caspase-2 para a liberação do citocromo c, talvez por ser caspase independente da liberação do citocromo c nestas linhagens ou outras caspases estão envolvidas.

Na continuidade deste estudo foi realizada a avaliação da atividade apoptótica pela via das caspases executoras 3 e 7. As modificações morfológicas que ocorrem na célula em apoptose são promovidas por uma família de cisteína-proteases denominadas caspases. Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos, as pró-enzimas, que são convertidas em forma ativa após clivagem proteolítica e ativadas, em caspases, somente quando a célula recebe algum sinal de morte. Uma vez ativadas atuam em cascata, as caspases iniciadoras, dentre elas a Caspase 9, ativam as caspases efetoras, função da Caspase 3, que por sua vez atua na degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (BRATTON *et al.*, 2001; VACULOVA *et al.*, 2008; SHARIFIA *et al.*, 2009).

Estudos de apoptose avaliando a atividade das caspases 3/7 com a linhagem de carcinoma ductal invasivo ZR-7531, até onde conhecemos, são inexistentes. Entretanto nossos resultados, demonstraram um aumento na atividade das enzimas com diferença significativa nas menores concentrações no período t0 sem recuperação, onde a maior atividade foi maior na concentração de 1,125 mM para pteroginina. No período t24 para a mesma substância foi observado um discreto aumento dose resposta. Resultados semelhantes foram encontrados para a pteroginidina no período sem recuperação em relação ao aumento da atividade da caspase na menor concentração de 0,25 mM. No período com recuperação não foi observado atividade das caspases 3/7.

Embora não existam estudos na literatura, acreditamos na hipótese na qual a atividade da caspase 3/7 pode ser avaliada nas menores concentrações onde os danos da função celular ainda não estão totalmente comprometidos. Entretanto ensaios deverão ser realizados no futuro para tornar essa hipótese consistente. Por outro lado, não podemos afirmar a sensibilidade da linhagem de adenocarcinoma (MCF7) na indução da caspase 3/7.

A recuperação da viabilidade celular após tratamento das células MCF-7 no tempo 24h é notável nas concentrações 1,125, 2,5 e 5,0 mM investigadas para pteroginina quando comparadas com a pteroginidina, apresentando nível similar em relação ao período t0. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato das células que entraram em apoptose ativando a via das caspases 3/7 no período t0 mantiveram a mesma quantidade de liberação da enzima quando recuperadas, favorecendo a morte da população celular que conseguiu recuperar-se dos danos causados, com isso entrando em apoptose pela ativação da caspase 3/7 em baixos níveis.

Para a pteroginina na linhagem MCF-7, comparando com o controle negativo, apresentou maiores valores de leitura nas concentrações 1,125, 2,5 e 5,0 mM. No tratamento com pteroginidina, não ocorreu aumento em relação ao controle negativo, demonstrando assim, apenas o nível basal de morte celular na linhagem não tratada. Sugerindo que, especialmente a pteroginidina, provavelmente induz outro tipo de morte celular que não ative a caspase 3/7, como por exemplo a necrose ou ativa outras vias da sinalização celular. Rogalska *et al.*, (2010), demonstrou que quando ocorre inativação da caspase 3 ou caspase 8 por um período longo de incubação, induz a transição do tipo de morte celular apoptótica para necrose.

No presente estudo e em outros relatos, demonstrou que a célula de cancer mamário MCF-7 são resistentes as quimioterapias (HORTOBAGYI, *et al.*,1997; BOVEN, 1996). A baixa susceptibilidade das células MCF-7 as drogas convencionais como doxorrubicina ou cisplatina pode ser atribuído a um caminho apoptótico aberrante. (DEL BUFALO *et al.*, 2000; WESIERSKA-GADEK *et al.*, 2003). Tem sido amplamente discutido que as células MCF-7 não expressa níveis detectáveis da caspase efetora -3, a enzima essencial na cascata apoptótica e de fragmentação do DNA. A ausência da atividade da caspase-3 é devido ao ponto de mutação no gene da CASP -3 que é funcionalmente deletado, pela introdução prematura do stop codon no RNAm. É conhecido, portanto que as células MCF-7 entram em apoptose na ausência completa de quebra da fita de DNA e sem muitas características na mudança morfológica (CHEN, WONG, 2009; JNICKE *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2005)

Várias evidências mostram que a apoptose de células que encontram defeitos ou erros na replicação do DNA durante a proliferação é dependente da degradação da proteína Rb, fatores inibitórios CDK, p21 e p27 e da proteína MDM2, um inibidor da atividade de p53 (LEVKAU *et al.*, 1998; BELIZÁRIO *et al.*, 1991; BELIZÁRIO *et al.*, 1999; HIESH *et al.*, 1999). Estudo confirmado com mutante das proteínas MDM2 e Rb, nos quais as seqüências de aminoácidos DEVD – sítio preferencial de clivagem pela caspase 3 foram substituídos por aminoácidos neutros. Na ausência de degradação dessas proteínas, as células resistiram à apoptose induzida por vários agentes fisiológicos e farmacológicos (TAN *et al.*, 1997; FATTMAN *et al.*, 2001). Não há entretanto, evidências de que uma pressão seletiva na população de células malignas de um tecido tumoral produza células cujas proteínas apresentem mutações em sítios de clivagem de enzimas caspases como um fenômeno geral da resistência à apoptose. Em outros estudos, encontrou-se um baixo nível de caspase-3 detectável no tratamento da linhagem MCF7 com paclitaxol (KOTTKE *et al.*, 2002) e significativo aumento da atividade da enzima das células expostas a doxorubicina. (WANG *et al.*, 2004; ZOLI *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que a ativação das caspases funcionam como um suporte, mas não é um instrumento necessário para disparar a maquinaria apoptótica nessa linhagem (CHEN & WONG, 2009).

Embasados nos resultados obtidos, através dos ensaios por nós empregados, consideramos serem necessários maiores estudos sobre os mecanismos que levam a linhagem de câncer de mama humano MCF-7 a apresentar resistência a altas doses de tratamento com ambas substâncias no período t0 e t24 apresentando leituras similares entre os ensaios.

6. CONCLUSÕES

1. Os alcalóides Pteroginina e Pteroginidina, extraído de *Pterogyne nitens*, apresentaram efeito citotóxico dose-resposta em linhagem celular de carcinoma ductal invasivo e adenocarcinoma de mama. Aparentemente, a melhor resposta citotóxica ocorreu no tratamento sem recuperação para ambas substâncias e maior intensidade do efeito foi observado para a Pteroginidina.

2. Na avaliação de apoptose induzida pela Pteroginina e Pteroginidina pelo método da anexina V, foi observado um maior efeito dose-resposta de apoptose tardia/necrose e um efeito pequeno e similar de apoptose precoce em todas as concentrações nas duas substâncias e nos diferentes tempos de tratamento. Enquanto que a Pteroginidina apresentou no período de recuperação pós-tratamento um efeito intenso de apoptose tardia/necrose.

3. No ensaio de Hoechst/Iodeto foi possível melhor observar a diferença entre os estágios de apoptose precoce, tardia e necrose nas células ZR 7531, no qual a Pteroginina no período sem (t0) e com recuperação (t24) e a Pteroginidina no período sem recuperação (t0) demonstraram possuir um maior efeito-dose resposta para apoptose tardia e menor efeito para apoptose precoce em todas as concentrações estudadas. Quando avaliamos as células MCF 7, foi possível observar que no tratamento sem (t0) e com período de recuperação (t24) as células apresentaram em apoptose tardia quando tratadas com Pteroginidina.

4. A indução da apoptose pela clivagem da caspase 3/7 no ensaio quimioluminescente na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7), não foi observada para Pteroginina e Pteroginidina (t0 e t24), quando comparadas com a

linhagem de carcinoma ductal ZR-7531. A Pteroginina no período t0 foi capaz de aumentar o nível de ativação da caspase 3/7 e induzir a apoptose na linhagem ZR 7531 em relação ao período t24. Ainda, a Pteroginidina foi capaz de induzir baixos níveis de ativação da caspase 3/7 no período t0.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no cancer da mama feminine. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.48, n.1, p. 113-131, 2002.

ALMEIDA, O. J.; ZEFERINO, L. C.; ALVARENGA, M.; SOUZA, G. A; PINTO, G. A.; CESTARI, A. L. O. Carcinoma ductal in situ associado a carcinoma invasivo na mesma mama: análise do grau nuclear e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos receptores de estrógeno. **RBGO**, v. 26, n. 6, p. 435-439, 2004.

ANTONSSON, B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 256/257, p. 141-155, 2004.

AAPRO, M. S. Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer: A Review of Key Findings from the 7th International Conference, St Gallen. **Oncology.**, v. 6, p. 376-385, 2001.

ARLEN, W. D.; GULLEY, P.; FERNANDEZ J.; NOONE, P.; FEDENKO, M.; HAMILTON, PARKER, K.; KRUGER, M., C.; PLUDA, E. A., J., DAHUT, W. L. A randomized Phase II trial of docetaxel (taxotere) plus thalidomide in androgen-independent prostate cancer. **Semin. Oncol.**, v. 28, p.62- 66, 2001.

ARKIN, M. Protein – protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. **Curr Opin Chem Biol.**, v.9, p. 317-324, 2005.

BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. Mechanisms of apoptosis. In: BITTAR, E. E. **Advances in molecular and cell biology**. Greenwich,CT: JAI Press, 1997. v. 20, p. 183-229.

BELIZÁRIO, J. E.; ALVES, J.; OCCHIUCCI, J. M.; GARAY-MALPARTIDA, M.; SESSO, A. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1011-1024, 2007.

BELIZÁRIO, J. E.; SHERWOOD, S. W.; BEÇAK, W. Induction of apoptosis by tumor necrosis factor and butyrolactone, achemical inhibitor of cyclin dependent kinases.

Braz. J. Med. Res., v. 32, p. 473- 482, 1999.

BELIZÁRIO, J. E.; DINARELLO, G. A. Interleukin 1- β increase cell resistance to TNF- α by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle. **Cancer Res.**, v. 51, p.2379-2385, 1991.

BERGANTINI, A. P. F.; CASTRO, F. A.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 2, p. 120-125, 2005.

BERLINCK R. G .S. Natural guanidine derivatives. **Nat Prod Rep.** v. 19, p. 617-49, 2002.

BERNSTEIN, J. L.; LÓPEZ-CARRILLO, L.; WANG, L. The epidemiology of Her-2/neu and p53 in breast cancer. **Rev. Salud Pública México**, v. 41, suppl. 2, p. s114-s123, 1999.

BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; COUTINHO, S. G. Flow Cytometry in study of cell death. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 429-433, 2000.

BOERSMA, H. H.; KIETTSCLAER, B. L. J. H.; STOLK, L.M. L.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A. K.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications.**J. Nucl. Med.**, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BOLASÉLL, A. H. T.; ZETTLER, C. G.; VINHOLES, J.; MACHADO, S. M.; KLIEMANN, C. Indicadores de prognóstico em câncer de mama com axila negativa:

receptor de estrógeno e expressão de p53 e de c-cerbB-2. **RBGO**, v. 22, n. 7, p.449-454, 2000.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. In research reported previously, bioactivity-guided fractionation of a methanol-chloroform extract of the leaves revealed five guanidine alkaloids that exhibited selective toxicity to the DNA repair-deficient yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain RS321 over the repair-proficient wild-type strain RAD+, suggesting a potential anticancer activity. **J. Nat. Prod.** v. 58, p. 1683, 1995.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

BOVEN E.; JONG, J.; KUIPER, C. M.; BAST, A., VAN DER VIJGH, W. J. Relationship between the tumour tissue pharmacokinetics and the antiproliferative effects of anthracyclines and their metabolites, **Eur. J. Cancer**, v. 32A, p. 1382–1387, 1996.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Epidemiologia. Câncer de mama. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/cancer/mama/>. Acesso em: 20 abr. 2009.

BRACKE, M. E.; VANHOECKE, B. W. A.; DERYCKE, L.; BOLCA, S.; POSSEMIERS, S.; HEYERICK, A.; STEVENS, C. V.; KEUKELEIRE D. D; DEPYPERE, H. T.;

VERSTRAETE, W.; WILLIAMS, C. A.; MCKENNA, S. T.; TOMAR, S.; SHARMA, D.; PRASAD, A. K.; PASS, A. L. ; PARMAR, V. S. Plant Polyphenolics as Anti-Invasive Cancer Agents. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 8, p. 171-185, 2008.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res**, v. 6, p. 229-239, 2004.

BRATTON, B. S.; SRINIVASULA, S. M.; SUN, X.M.; BUTTERWORTH, M.; ALNEMRI, E. S.; COHEN, G. M. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **EMBO J.**, v. 20, p. 998-1009, 2001.

BRAULT, L.; MIGIANU, E.; NÉGUESQUE, A.; BATTAGLIA, E.; BAGREL, D.; KIRSH, G. New thiophene analogues of kenpaullone: synthesis and biological evaluation in breast cancer cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 757-763, 2005.

BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. **Methods**, v. 44, p. 235-240, 2008.

BURSCH, W.; ELLINGER, A.; KIENZL, H.; TOROK, L.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M.; WALKER, R.;HERMANN, R. S. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1595-1607, 1996.

CARVALHO P. R. F.; FURLAN M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTONk D. G. I.; BOLZANI V. S. Acetylated DNA-damaging Clerodane diterpenes from *Casearia Sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 31, p. 119-128, 2004.

CHANDRA J.; ZHIVOTOVSKY B., ZAITSEV S., JUNTTI-BERGGREN L., BERGGREN P. O., ORRENIUS S. Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. **Diabetes**, n. 50, Suppl 1, p. S44–S47, 2001.

CHEN, T.; WONG, Y. S. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, n. 41, p. 666–676, 2009.

CHINKWO, K. A. *Surtherleia frutescens* extracts can induce apoptosis in cultured carcinoma cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 163-170, 2005.

COHEN, G. M. Caspases: The executioners of apoptosis. **Biochem. J.** v.326, p. 1–16, 1997.

COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patología celular I: lesión e morte da célula. In: COTRAN,R.S.; VINAY KUMAR, M.V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural da célula e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-26.

CRIVOS, M.; MARTINEZ, M. R.; POCHETTINO, M. L; REMORINI, C. S. Y. A; TEVES, L. Pathways as "signatures in landscape": towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guaraní (Northeastern Argentina). **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 3, p. 1-12, 2007.

CRAWFORD, K. W.; BOWEN, W. D. Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines. **Cancer Res.**, v. 62, p. 313-322, 2002.

DASSONNEVILLE, L.; LANSIAUX, A.; WATTELET, A.; WATTEZ, N.; MAHIEU, C.; MIERT, S. V.; PIETERS, L.; BAILLY, C. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 409, p. 9-18, 2000.

DEL BUFALO, D.; BIROCCIO, A.; TRISCIUOGGIO, D.; BRUNO, T.; FLORIDI, A.; AQUINO, A.; ZUPI, G. Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used, **Eur. J. Cancer**, v. 38, p. 2455–2462, 2002.

DEGENHARDT, K.; MATHEW, R.; BEAUDOIN, B.; BRAY, K.; ANDERSON, D.; CHEN, G.; MUKHERJEE, C., S. H. .I. Y.; GELINAS, C.; FAN, Y.; NELSON, D. A, JIN, S., WHITE, E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell.**, n. 10, p. 51- 64, 2006.

DIVE, C.; GREGORY, C. D.; PHIPPS, D. J.; EVANS, D. L.; MILNER, A. E.; WYLLIE, A. H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 3; n. 1133, p. 275-285, 1992.

DUMONT, P.; INGRASSIA, L.; ROUZEAU, S.; RIBAUCCOUR, F.; THOMAS, S.; ROLAND, I.; DARRO, F.; LEFRANC, F.; KISS, R. The Amaryllidaceae isocarbostryril Narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or

mitochondrial pathways in câncer cells but not in normal fibroblasts. **Neoplasia Press.**, v. 9, p. 766-776, 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H., HOKOYAMA, H., OKAMA, K., IWAMATSU A., NAGATA,S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, p. 43-50, 1998.

EARNSHAW, W.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 383-424, 1999.

ELSTEIN, K. H.; ZUCKER, R. M. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. **Exp. Cell. Res.**, v. 211, p. 322-331, 1994.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. **J. Clin. Invest.** v. 108, p. 957–962, 2001a.

FADOK, V. A.; CATHELIN, A.; DALEKE, D. L.; HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 1071–1077, 2001b.

FARR, D. R.. Functional foods. **Cancer Lett.**, v. 114, p. 59-63, 1997.

FATTMAN, C. L.; DELACH, S.; DOU Q. P.; JOHNSON D. E. Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase 3 and 7 during etoposide-induced apoptosis. **Oncogene**, v. 20, p. 2918-2926, 2001.

FERNANDES, D. C.; REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; OLIVEIRA, O. M.; SIQUEIRA, D. H. Myeloperoxidase Inhibitory and Radical Scavenging Activities of Flavones from *Pterogyne nitens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 56, n. 5, p. 723-726, 2008.

FERRINI, F. S.; ROSSI, M. A.; MOURÃO NETO, M.; SOARES, F. A. Schirrous invasive ductal carcinoma of the breast overexpress p53 oncoprotein. **São Paulo Med. J.**, v. 119, n. 1, p. 04-06, 2001.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

GARRIDDO, C.; KROEMER, G. Life's smile, death's grin: Vital functions of apoptosis-executing proteins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 16, p. 639-646, 2004.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends Cell. Biol.**, v. 8, p. 267-271, 1998.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-12, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUPTA S.; AFAQ F.; MUKHTAR H. Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal versus Human Prostate Carcinoma Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 287, p. 914-920, 2001.

HAAS, N. B. Can chemotherapy alter the course of prostate cancer. **Semin. Urol. Oncol.**, v. 19, p. 212-221, 2001.

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature**, v. 2, p. 231-341, 2000.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**. v. 9, p. 691-704, 2004.

HARA, T.; NAKAMURA, K.; MATSUI, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; YOKOYAMA, M.; MISHIMA, K.; SAITO, I.; OKANO, H.; MIZUSHIMA, N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature**, n. 441, p.885-889, 2006.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 685-687, 2000.

HOCKENBERY, D. M. The Bcl-2 oncogene and apoptosis. **Semin. Immunol.**, v.4, p. 413-420, 1990.

HORTOBÁGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview, **Drugs**, v. 54 p. 1–7, 1997.

HSIEH, J. K.; CHAN, F. S. G.; O'CONNOR, D. J.; MITTNACHT, S.; ZHON, S.; LU, X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. **Mol. Cell.**, v. 3, p. 181-193, 1999.

JÄNICKE, R. U.; NG, P.; SPRENGART, M. L.; PORTER, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis, **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9357–9360, 1998.

JEFFREY, B. K. A célula. In: JEFFREY, B. K. **Atlas de histologia funcional**. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p. 1-25.

JONES, B. E.; LO, C. R.; SRINIVASAN, A.; VELENTINO, K. L.; CZAJA, M. J., Ceramide induces caspase-independent apoptosis in rat hepatocytes sensitized by inhibition of RNAsynthesis. **Hepatology**, v. 30, p. 215-222, 1999.

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 1–27, 1995.

KELLOFF, G. J. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. **Adv. Cancer Res.**, v.78, p. 199–334, 2000.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 27–45, 2002.

KINNALLY, K. W.; ANTONSSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, p. 857-868, 2007.

KITAJIMA, M; NAKAMURA, T; KOGURE, N; OGAWA, M; MITSUNO, Y; ONO, K; YANO, S; AIMI, N; TAKAYAMA, H. Isolation of gelsedine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* and avaluation of the cytotoxic activity of gelsimium alkaloids for A431 epidermoid carcinoma cells. **J. Nat. Prod.** v. 69, n. 4, p. 715-718, 2006.

KITTS, D. D.; WIJEWICKREME, A. N.; HU, C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 203, p. 1-10, 2000.

KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **J. Cell. Sci.** v. 118, p. 7-1, 2005

KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S.; VIEIRA, R. J. S. Familial aggregation of breast/ovarian cancer: age of onset along subsequent generations in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, suppl. 3, p. 181-185, 1998.

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; UENO, T.; IWATA, J.; MURATA, S.; TANIDA, I.; EZAKI, J.; MIZUSHIMA, N.; OHSUMI, Y.; UCHIYAMA, Y.; KOMINAM, EI; TANAKA, K.; CHIBA, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **J. Cell. Biol.** v. 169, p. 425-434, 2005.

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; CHIBA, T.; MURATA, S.; IWATA, J.; TANIDA, I.; UENO, T.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; KOMINAMI, E. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, p. 880-884, 2006.

KOMEN, J.; WOLBERS, F.; FRANKE, H. R.; ANDERSSON, H.; VERMES, I.; BERG, A. V. D. Viability analysis and apoptosis induction of breast cancer cells in a microfluidic device: effect of cytostatic drugs. **Biomed Microdevices**, v. 10, p. 727-737, 2008.

KOROSTOFF, J.; WANG, J.F.; KIEBA, I.; MILLER, M.; SHENKER, B.J.; LALLY, E. T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 9, p. 4474-4483, 1998.

KOTTKE, T. J.; BLAJESKI, A. L.; MENG, X. W.; SVINGEN, P. A.; RUCHAUD, S.; MESNER, P. W.; BOERNER, S. A.; SAMEJIMA, K.; HENRIQUEZ, N. V.; CHILCOTE, T. J.; LORD, J.; SALMON, M.; EARNSHAW, W. C.; KAUFMANN, S. H. Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells, **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 804–815, 2002.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol. Rev.**, n. 87, p. 99–163, 2007.

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 1661–1675, 2006.

KUWANA, T.; NEWMAYER, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, p. 691–699, 2003.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr.-Relat. Cancer**, n. 13, p. 293–325, 2006.

LANKIEWICZ, S.; MARC LUETJENS, C.; TRUC BUI, N.; KROHN, A. J.; POPPE, M.; COLE, G. M. *et al.* Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. **J. Biol. Chem.**, n. 275, p. 17064–17071, 2000

LASSUS, P.; OPITZ-ARAYA, X.; LAZEBNIK, Y. Requirement for Caspase-2 in Stress-Induced Apoptosis Before Mitochondrial Permeabilization. **Science**, v. 297, n. 5585, p. 1352 - 1354, 2002.

LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **Am. J. Psychiatry**. v. 150, p. 1752-3, 1993.

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 10, 2005.

LEE, KUO-HSIUNG. Novel Antitumor Agents From Higher Plants. **Med. Res. Rev.**, v. 19, n. 6,5, p. 69–596, 1999.

LEVKAU, B.; KOYAMA, H.; RAINES, E. W.; CLURMAN, B. E.; HERREN, B.; ORTH, K.; ROBERTS, J. M.; ROSS, J. M. Cleavage of p21 and p27 mediates apoptosis in endothelial cell through activation of cdk2: role of a caspases cascade. **Mol. Cell.**, v. 1, p. 553-563, 1998.

LEMAIRE, C.; ANDREAU, K.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. **FEBS Lett.** n. 425, p. 266–270, 1998.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Mol.Cancer Ther.**, v. 4, n. 4, p. 505-515, 2005.

LIU, Y; ZHANG, Y. M; SONG, D. F; CUI, H. B. Effect of apoptosis in human cancer and probable mechanisms by genistein. **Wei Sheng Yan Jiu.**, v. 34, n. 1, p. 67-69, 2005.

LOCK, E. A.; REED, C. J., KINSEY, G. R., SCHNELLMANN, R. G. Caspase-dependent and -independent induction of phosphatidylserine externalization during apoptosis in human renal carcinoma Cak1-1 and A-498 cells. **Toxicology**, v. 229, p. 79–90, 2007.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e**

tóxicas. 3ªed., Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum, p. 395, 2000.

LUM, J. J.; BAUER, D. E.; KONG, M.; HARRIS, M. H.; LI, C.; LINDSTEN, T.; THOMPSON, C. B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell.**, v. 120, p. 237-248, 2005.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO Rep.**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T., MANTOVANI M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicol in Vitro**, v. 18, p. 337–342, 2004.

MALORNI, L.; CACACE, G.; CUCCURULLO, M.; POCSFALVI, G.; CHAMBERY, A.; FARINA, A.; DI MARO, A.; PARENTE, A.; MALORNI, A. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to mitogenic concentration of 17 β -estradiol. **Proteomics**, v. 6, p. 5973–5982, 2006.

MARSH, S., LIU G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 61, p. 381–387, 2009.

MACIOROWSKI, Z.; DELIC, J.; PADOY, E.; KLIJANIENKO, J.; DUBRAY, B.; COSSET, J-M.; DUMONT, J.; MAGDELÉNAT, H.; VIELH, P. Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Hodgkin's lymphomas. **Cytometry**, v. 32, p. 44-50, 1998.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; MARIA, S. S. Morte celular. IN: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. São Paulo: Manole, 2001. cap. 23, p. 275-281.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 8, p.872-885, 2008.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J.F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc-annexin v. **J. Nucl. Med.**, v. 44, n. 1, 2003.

MORRISON, B. J.; SCHMIDT, C. W.; LAKHANI, S. R.; REYNOLDS, B. A.; LOPEZ, J. A. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2008.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. **Genome Biol.**, v. 5, n. 4, p. 219, 2004

NEHEME C. J.; PEDRO L. R.; MORAES. B.; CAVALHEIRO, A. J. Intrapopulational variability of styrylpyrones in leaves of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from Carlos Botelho State Park. **Biochem. System. Ecol.** v. 30, p. 613–616, 2002.

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, n. 70, p. 461-77, 2007.

NICOTERA, P.; LEIST M.; FERRANDO-MAY E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. **Biochem. Soc. Symp.** v. 66, p. 69–73, 1999.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol. Res.**, v. 59, p. 365–378, 2009.

NUTT, L. K.; CHANDRA, J.; PATAER, A.; FANG, B.; ROTH, J.; SWISHER, S. G., *et al.*,. Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochromes c release during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, n. 277, p. 20301-20308, 2002

OPPENHEIM, R. W.; FLAVELL, R. A.; VINSANT, S.; PREVETTE, D.; KUAN, C. Y.; RAKIC, P. Programmed Cell Death of Developing Mammalian Neurons after Genetic Deletion of Caspases. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 13 p. 4752-4760, 2001.

PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. A.; MEIRELLES, R. S. P.; D. A SILVA, E.V.G.; MARQUES, G.D. A.; ROSSINI JÚNIOR, OLAMIR. Fatores de Risco para Câncer de Mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 48, n. 2, p. 231-237, 2002.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, p. 1451–1461, 2003.

PERRY, D. K.; CARTON, J.; SHAH, A. K.; MEREDITH, F.; UHLINGER, D. J., HANNUN, Y.A. Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 9079-9084, 2000.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Bioch Bioph Acta**, v.1644, p. 83– 94, 2004.

REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. **Cancer J. Sci. Am**, v. 4, p.S8–S14, 1998.

REGASINI, L. O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; PINHEIRO FERREIRA, P. M.; PESSOA, C.; LOTUFO, L. V. C., MORAES, M. O.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 473-476, 2009.

REGASINI, L. O.; FERNANDES D. C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M., BOLZANI V. S, BARREIRO E. J.; CARDOSO-LOPES, E. M.; YOUNG, M. C. M.; TORRES L. B.; VELLOSA, J. C. R.; OLIVEIRA, O. M. M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Quim. Nova**, n. 31, p. 802- 806, 2008a

REGASINI, L. O.; VELLOSA, J. C. R.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; OLIVEIRA, O. M. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1739-1744, 2008b.

REGASINI, L. O.; OLIVEIRA, C. M.; VELLOSA, J. C.; REBUGLIO, O. M.; MASCARENHAS F. O.; SILVA, D. H. S.; AND BOLZANI, V. S. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 24, p. 4609-4613, 2008c.

RIGGS, D. R.; JACKSON, B. J.; VONA-DAVIS, L.; NIGAM, A.; MCFADDEN, D. W. In vitro effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regards to cell growth, cytokine production, and apoptosis. **Am. J. Surg.**, v. 189, p. 680-684, 2005.

ROGALSKA, A.; SZWED, M.; ZWIAK, Z. J. Aclarubicin-induced apoptosis and necrosis in cells derived from human solid tumours. **Mutat. Res.** 2010. Abr., 24, [Epub ahead of print].

ROSALES-HERNANDEZ, M. C.; BERMÚDEZ-LUGO, J.; GARCIA J.; TRUJILLO-FERRARA, J.; CORREA-BASURTO J. Molecular Modeling Applied to Anticancer Drug Development. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 9, p. 230-238, 2009.

RÜCKER-MARTIN, C.; HÉNAFF, M.; HATERN, S. N.; MERCADIER, J-J. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis of adult rat ventricular myocytes *in vitro*. **Basic Res. Cardiol.**, v. 94, p. 171-179, 1999.

SANDHYA, T.; MISHRA, K. P. Cytotoxic response of breast cancer cell lines, MCF-7 and t-47D to triphala and its modification by antioxidants. **Cancer Lett.**, v. 238, p. 304-313, 2006.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, p. 528-537, 2000.

SHARIFIA, A. M.; ESLAMI, H.; LARIJANI, B.; DAVOODI, J. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. **Neurosci. Lett.**, v. 459, p. 47-51, 2009.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002.

SRIVASTAVA V.; NEGI A. S.; KUMAR J. K.; GUPTA M. N.; KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorg Med Chem.**, v. 13, p. 5822-908, 2005.

SON, Y.-O.; KIM, J.; LIM, J.-C.; CHUNG, Y.; LEE J.-C. Ripe fruits of *Solanum nigrum* inhibits growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 1421-1428, 2003.

TAN, X.; MARTIN, S. J.; GREEN, D. R.; WANG, J. Y. J. Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor and CD95-induced cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 9613-9616, 1997.

TAKEI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; SATO, M.; STRAUS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of ^{99m}Tc-annexin v, ¹⁸F-FDG, and histologic evaluation. **J. Med. Nucl.**, v. 46, n. 5, p. 794-799, 2005.

THOMADAKI, H.; TALIERI, M.; SCORILAS, A. Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer. **Cancer Lett.**, n. 247, p. 48-55, 2007.

THOMPSON, A.M. p53 and breast câncer. **Breast**, v. 2, p. 8-10, 1993.

THORBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science**, v. 281. p. 1312-1316, 1998.

TIBREWAL, Y. W. N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **TRENDS Cell. Biol.**, v. 16, n. 4, 2006.

TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTER, C.; ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 178, n. 1, p.113-117, 1998.

TYAGI, A. K.; SINGH, R. P.; AGARWAL, C.; CHAN, D. C. F.; AGARWAL, R. Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Growth Inhibition, G2-M Arrest, and Apoptosis. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 3512–3519, 2002.

URREA-BULLA A.; SUAREZ M. M.; MORENO-MURILLO B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v. 75: p. 392–394, 2004.

VACULOVA, A. ZHIVOTOVSKY, B. Chapter Eight Caspases: Determination of Their Activities in Apoptotic Cells. **Methods Enzymol.**, v. 442, p. 157-181, 2008.

XU, G.; MCLEOD, H. L. Strategies for enzyme/Prodrug cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3314-3324, 2001.

VAGUNDA, V, S.; MARDOVÁ, J.; VAGUNDOVÁ, M.; JANDÁKOVÁ, E.; Z'ALOUĐÍK, J., KOUKALOVÁ, H. Correlations of Breast Carcinoma Biomarkers and p53 Tested by FASAY and Immunohistochemistry, **Pathol. Res. Pract.**, v. 199, p. 795–801, 2003.

VANDE VELDE, C.; CIZEAU, J.; DUBIK, D.; ALIMONTI, J.; BROWN, T.; ISRAELS, S.; HAKEM, R., GREENBERG, A. H. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p.5454-5468, 2000.

VAN GENDEREN, H. O.; KENIS, H.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, p. 953–963, 2008.

VAN HEERDE, W.L.; ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA, L.; DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A. P., REUTELINGSPERGER, C.P.M. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, p. 549–559, 2000.

VOUSDEN, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1602, p. 47-59, 2002.

WANG, Y.; CHAN, F. L.; LEUNG, L. K. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. **Life Sci.**, v: 77, p: 39-51, 2005.

WANG, S.; KONOREV, E. A.; KOTAMRAJU, S.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; KALYANARMAN, B.. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 25535–25543, 2004.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WATANABE, M.; HITOMI, M.; VAN DER WEE, K.; ROTHENBERG, F.; FISHER, S. A.; ZUCKER, R.; SVOBODA, K. K. H.; GOLDSMITH, E. C.; HEISKANEN K.M.; NIEMINEN, A. L. The Pros and Cons of Apoptosis Assays for Use in the Study of Cells, Tissues, and Organs. **Microsc. Microanal.** v. 8, p. 375–391, 2002.

WESIERSKA-GADEK, J.; GUEORGUIEVA, M.; HORKY, M. Dual action of cyclin-dependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis. A

comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin, **Pol. J. Pharmacol.**, v. 55, p. 895–902, 2003.

WU, X. X.; KAKEHI, Y.; MIZUTANI, Y.; LI, U, J.; TERACHI, T.; OGAWA, O. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil. **Int. J. Oncol.**, v. 19, p. 19–24, 2001.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate. **Cancer Lett.**, v. 231, p. 215-227, 2006.

YANG, X. T.; EDGERTON, S.; THOR, A. D. Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy, **Int. J. Oncol.** v. 26, p. 1675–1680, 2005.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A.. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 873-885, 2003.

ZASLAU, S.; RIGGS, D.R.; JACKSON, B.J.; ADKINS, F.C.; JOHN, C.C.; KANDZARI, S.J.; MCFADDEN, D.W. In vitro of pentosan polysulfate against malignant breast cells. **Am. J. Surg.**, v.188, p.589- 592, 2004.

ZHANG, J.; YU, D.; LIU, D.; LIU, Z. Extraction and composition of three naturally occurring anticancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts. **Phytomedicine**, v. 14, p. 50-56, 2007.

ZHANG, Y.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Lett.**, v. 211, n. 2, p.175-188, 2004.

ZHANG, X. D., GILLESPIE, S. K., HERESY, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. **Mol. Cancer Ther.** v. 3, p. 187–197, 2004b.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**,v. 20, p.1-15, 2006.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q.; THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes Dev.**, v.18, p.1272-1282, 2004.

ZOLI, W.; ULIVI, P.; TESEI, A.; FABBRI, F.; ROSETTI, M.; MALTONI, R.; GIUNCHI, D. C.; RICOTTI, L.; BRIGLIADORI, G.; VANNINI, I.; AMADORI, D. Addition of 5-fluorouracil to doxorubicinpaclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cancer cell lines, **Breast Cancer Res.**, v. 7, p. 681–689, 2005.

CAPÍTULO 2

ALKALOIDS EXTRACTED FROM *PTEROGYNE NITENS* INDUCE APOPTOSIS IN MALIGNANT BREAST CELL LINE

Roberta Aparecida Duarte^(a), Elaine Rodrigues Mello^(a), Camila Araki^(a), Mauro César Cafundó de Moraes^(a), Vanderlan da Silva Bolzani^(b), Dulce Helena Siqueira e Silva^(b), Luis Octavio Regasini^(b), Tarsia Giabardo Alves Silva^(a), Valdecir Farias Ximenes^(c), Christiane Pienna Soares^{(a)*}.

^(a)School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State - UNESP, R. Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14801-902, Araraquara, Sao Paulo, Brazil. ^(b)Institute of Chemistry of Araraquara, University of São Paulo State - UNESP, R. Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, Zip code 14801-970, Araraquara, Sao Paulo, Brazil. ^(c)School of Sciences of Bauru, University of São Paulo State - UNESP, Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube 14-01, Zip code 17033-360, Bauru, Sao Paulo, Brazil.

* Author to whom correspondence must be sent:

C.P. Soares. Address: Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. Phone +55 16 3301 6554; fax +55 16 3301 6559; e-mail address: soarescp@hotmail.com, soarescp@fcfar.unesp.br

Abstract

In the present study, two alkaloids isolated from *Pterogyne nitens*, a plant native to Brazil, have been shown to induce apoptosis in human breast cancer cells. These compounds, pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD), were tested for their effect on a human infiltrating ductal carcinoma cell line (ZR-7531). The cell line was treated with each alkaloid at several concentrations. Time-dependence (with or without recuperation time) and concentration-dependence (in the range 0.25 to 10 mM) were investigated in cytotoxicity and apoptosis assays. The annexin assay indicated an apparently higher percentage of death by necrosis of malignant cells after 24h exposure to both *Pterogyne nitens* extracts than the Hoechst assay. Thus, our results in the two tests demonstrated that the Hoechst assay can discriminate between late apoptotic cells and necrosis, whereas the flow-cytometry-based annexin V assay cannot. We concluded that PGN and PGD have effective antineoplastic activity against human breast cancer cells *in vitro*, by inducing programmed cell death.

Key Words: Breast cancer cell line, cytotoxic activity, alkaloids, apoptosis, necrosis, flow cytometry.

Introduction

Breast cancer is a major cause of morbidity and mortality among women worldwide [1]. In North America and Europe, approximately 11% of all women and 1% of all men will develop breast cancer, many of these patients (approximately 35%) eventually succumbing to this disease. There are several therapeutic drugs that are currently in use, including drugs that inhibit specific hormone receptors, inhibit growth factor receptors, and induce cell cycle arrest [2]. Research has elucidated several specific prognostic and predictive factors to identify patients at high risk of the aggressive disease, metastasis and of recurrence of the disease, in order to combat these statistics [3]. For this reason, there is an obvious need to develop more efficacious treatment strategies.

Brazil has the biggest biodiversity in the world. Plants, since the ancient times, have been used to treat a large amount of diseases including cancer [4-6]. Many compounds with biological activities were obtained from Cerrado, Brazil's second largest biome [7-10].

Pterogyne nitens Tulasne (Fabaceae-Caesalpinioideae), popularly known as “bálsamo”, “yvira-ró”, “cocal”, and “amendoinzeiro”, is a native tree in South America [11-12]. It is used as an ornamental due to its attractive flowers and fruits. Medicinal uses of this species have not been reported frequently, although aqueous preparations from stem barks have been used by Paraguayan communities in the therapy of ascariasis [13]. Previous bioprospection studies have demonstrated the presence of guanidine alkaloids, which exhibited cytotoxic activity against HL-60 (human myeloblastic leukemia) and SF-245 (human glioblastoma) cells, and phenolic compounds with anti-inflammatory, antioxidant, antimutagenic and, antidiabetic activities [14-22].

In this study, we demonstrated that two alkaloids isolated from *P. nitens*, pterogynine (PGN) and pterogynidine (PGD) (Figure 1), showed an interesting potential anti-tumor activity *in vitro* by inducing programmed cell death. In addition, we present the results obtained by methods (Annexin-V, Hoechst and Caspase 3/7) used for the quantitation of the apoptosis.

Materials and methods

Cytotoxicity assay

Pterogyne nitens leaves were collected at the Botanic Garden of Sao Paulo, São Paulo State, Brazil, in May 2003. A voucher specimen (SP204319) has been deposited in the herbarium of the Botanic Institute (São Paulo State, Brazil).

Extraction, isolation and identification of alkaloids

The shade-dried leaves (2.8 kg) were ground and defatted with hexane (2.0 L x 5, at room temperature, for five weeks) and exhaustively extracted by maceration with ethanol (4.0 L x 5) at room temperature, for five weeks. The ethanol extract was concentrated under reduced pressure (≤ 40 °C), to yield 12.7 of a syrup. The concentrate was then diluted with methanol-water (4:1) (3.5 L) and partitioned successively with ethyl acetate (5.0 L x 3) and *n*-butanol (5.0 L x 3). After removal of the solvent 3.7 and 5.9 g of extract were afforded, respectively. The *n*-butanol residue (2.5 g) was subjected to gel permeation chromatography on a column of Sephadex LH-20 in methanol to afford nine fractions, which were combined on the basis of their TLC visualized with Sakaguchi's and Dragendorff's reagents [23], to yield an alkaloidal fraction (587 mg). Separation of this fraction on reversed-phase silica gel column chromatography (RP-18) by elution with increasing amounts of acetonitrile in water

afforded eight fractions (ALK-1 – ALK-8). Fraction ALK-3 (121 mg) was subjected to repeated column chromatography on silica gel (230-400 mesh), eluted with chloroform-methanol mixtures (ranging from 0 to 35 % of methanol), to furnish the guanidine alkaloids, pterogynine (PNG, 27 mg) and pterogynidine (PDG, 22 mg). The molecular structures of these compounds were identified by comparison with literature data [24-25], mainly ^1H and ^{13}C NMR (Figure 1).

Pterogynine (PNG, yield 4.6 %, calculated from the alkaloidal fraction): yellow oil. ^1H NMR δ_{H} (*multiplicity*; *J* in Hz; position): 7.44-7.64 (*br s*, H-1 and H-3), 3.72 (*d*; 6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.62 (*s*, H-4'), 1.68 (*s*, H-5'). ^{13}C NMR δ_{C} (position): 155.7 (C-2), 39.0 (C-1'), 119.2 (C-2'), 135.8 (C-3'), 17.8 (C-4'), 25.2 (C-5').

Pterogynidine (PDG, yield 3.8 %, calculated from the alkaloidal fraction): yellow oil. ^1H NMR δ_{H} (*multiplicity*; *J* in Hz; position): 7.72 (*t*; 6.5; H-3 and H-4), 7.20 (*br s*; H-1), 3.70 (*t*; 6.5, H-1'), 5.16 (*t*, 6.5, H-2'), 1.63 (*s*, H-4'), 1.69 (*s*, H-5'). ^{13}C NMR δ_{C} (position): 156.9 (C-2), 38.7 (C-1'), 119.0 (C-2'), 136.0 (C-3'), 17.7 (C-4'), 25.1 (C-5').

Cell culture

Human infiltrating ductal carcinoma cells (ZR-7531) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). Cells were grown at 37°C in DMEM media and Ham's F10 (Sigma, St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, in an incubator containing 5% CO_2 .

Cell treatment

To explore the induction of apoptosis (Annexin-V, Hoechst and Caspase 3/7 assays) and to determine the cytotoxicity of alkaloids PGN and PGD, cells were grown to 70% confluence and treated for 24h with alkaloids (t0) or treated for 24h with alkaloids and then for another 24h with fresh medium (t24) to observe recuperation. Various concentrations of the alkaloids, from 0.25 to 10mM, diluted in the culture media from a 40 mM stock solution in water, were used in the apoptosis and cytotoxicity tests.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of both alkaloids was determined by the MTT colorimetric assay, which was performed to detect tumor cell viability after incubation. The cells were cultured in 96-well plates. At 70% confluence, cells were treated with the alkaloids as previously described. 10 μ L of MTT, a tetrazolium dye (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue; Sigma, St. Louis, MO), was added to each well. Plates were incubated in contact with the dye for 4 hours. Mitochondrial dehydrogenase activity reduced the yellow MTT dye to a purple insoluble formazan, which was then solubilized with acidified isopropanol and absorbance was read at 540 nm in an ELISA plate reader (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc.,USA). Doxorubicin (DOX) at 15 μ g/mL was used as a positive control. Cytotoxicity was calculated as follows: % cytotoxicity = [(absorbance treated cells – absorbance untreated cells) / absorbance untreated cells] x 100, as proposed by Zhang et al. (2004) [26]. Concentration that presents 50% of cytotoxicity (IC₅₀) were calculated from concentration response curve.

Annexin V assay

Annexin V / propidium iodide (PI) staining were used to assess both apoptosis and necrosis. Untreated cells were used as negative control and DOX, a well established drug used to induce apoptosis, as positive control. Controls and treated cells were harvested by trypsinization, and washed twice with PBS. Cells were resuspended in 500 μ L of binding buffer containing 5 μ L of annexin V-FITC (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, AlexisTM, San Diego, USA) and 5 μ L of PI and then incubated for 10 min. at room temperature. Fluorescence and physical properties of the cells were captured by flow cytometry, via an analog-digital converter (ADC), and processed with integrated software (Becton Dickinson-Bioscience, FACS CaliburTM, San Jose, California, USA).

Hoechst assay

Differential staining with specific fluorochromes can be used to distinguish cells undergoing apoptosis from viable and necrotic cells. The human cells (10^6 cells/mL) were cultured in 12-well plates to 70% confluence and then treated with the alkaloids as described previously and trypsinized. Next, the cells were washed in PBS and suspended in a solution of 1 mg/mL of PI, 1.5 mg/mL fluorescein diacetate (DAF) and 1 mg/mL Hoechst 33342 (HO; Sigma, St. Louis, MO) in PBS. The apoptosis was classified by morphology and color of the cells, and quantified. The cells were classified as viable (spherical blue nucleus stained by HO, green cytoplasm stained by DAF excited at 360nm), apoptotic (blue nucleus with apoptotic bodies stained by HO, green cytoplasm) or necrotic (red enlarged nucleus with spherical vesicles stained by PI, excited at 538nm). Finally, the apoptotic cells were classified as early (blue nucleus with apoptotic bodies) or late (nucleus colored red with apoptotic bodies), as proposed by Korostoff (1998), and Elstein & Zucker (1994) [27-28].

Caspase 3/7 assay

Caspase Glo 3/7 assay was performed according to directions of the supplier (Promega, Madison, WI, USA). ZR-7531 cells were seeded in white walled 96-well plate at 2.5×10^4 cells/well of DMEM and were allowed to attach for overnight. Next day the medium was changed and cells were treated with alkaloids PGN and PGD. Cell-free medium was used as a blank and DOX was used as positive control. After treating the cells, medium was replaced with 100 μ L 1:1 (v/v) of DMEM:Glo 3/7 reagent and was incubated for 30 min at 37°C in 5% CO₂. Luminescence was measured by microplate reader (Berthold, USA). Caspase 3/7 activity was presented as a mean of Relative Light Units (RLU). The following formula was used to calculate caspase 3/7 activity in RLU: $RLU = \text{Luminescence (samples)} - \text{Luminescence (blank)}$.

Statistical analyses

For statistical analysis of the cytotoxicity assay (MTT), Annexin V, Hoechst and Caspase methods, data were first tested for normality. This showed a normal distribution, so a parametric test was applied. Differences were tested by one-way analysis of variance (ANOVA), with Tukey's post-test. This analysis was performed with GraphPad Prism® Version 5.1 software (GraphPad Software Inc., USA). Results are expressed as mean of three independent experiments \pm standard deviation.

Results

Alkaloids cytotoxicity

Pterogynine and pterogynidine exhibited high cytotoxicity for ZR-7531 cells. Concentration-response was observed for both compounds and both time of treatments (Figure 2). At maximum concentration (10.125 mM), when tested for 24h, PGN caused $71.4\pm 7.3\%$ cell death and no statistical significance between DOX in both times (Figures 2A and 2B).

The cytotoxicity of PGD was higher at 2 mM, showing $57.0\pm 4.3\%$ and $72.0\pm 4.1\%$ cell death, for t0 and t24, respectively (Figure 2C and 2D). Statistical difference was observed between DOX and 2 mM of PGD for t0, but not for t24. IC₅₀ values of PGN and PGD were 3.3 ± 0.2 mM and 0.7 ± 0.4 mM, respectively, for t24. This indicates that PGD is more cytotoxic than PGN for this time of treatment in ZR-7531 cell line.

Annexin-V assay

To evaluate the apoptosis induced by the alkaloids from *Pterogyne nitens*, the annexin V assay was performed by flow cytometry (Figure 3). The tests were carried out on treated cells at t0 and t24.

After 24h of treatment (t0) with PGN (Figure 3A), early apoptosis was observed in $38.0\pm 3.0\%$ of the cells and late apoptosis/necrosis in $55.0\pm 3.0\%$ at 10.125 mM. For t24 with PGN (Figure 3B), early apoptosis was observed in $38.0\pm 3.0\%$ of the cells and late apoptosis/necrosis in $48.0\pm 4.0\%$ at 10.125 mM. A concentration-dependent response was observed in both periods of treatment. Apparently, at t24 the cells showed a drop in signals

for late apoptosis/necrosis, while maintaining the level of early apoptosis. In other words, fewer cells suffered the devastating cell death observed as necrosis, after 24h recuperation.

The results of the annexin V assay for PGD are illustrated in Figures 3C and 3D. The ductal invasive carcinoma cells treated with PGD for t0 showed early apoptosis 13.4±3.0% of the cells and late apoptosis/necrosis 82.1±4.0% of the cells at 2.0 mM. When the cells were treated with PGD for t24, there was a similar response for early apoptosis to that observed at t0. However, the late apoptosis/necrosis rate was much higher at t24 and no concentration-response was observed (Figure 3D).

Hoechst assay

The method of HO, with PI, was used for a better characterization between early apoptosis, late apoptosis and necrosis. In the treatment with PGN for t0 (Figure 4A), it was possible to observe total apoptosis (early and late) of 30 to 47% and necrosis of 10 to 43% of the cells. A concentration-dependent increase of early apoptosis was observed on treatment with pterogynine, relative to the negative control. Early apoptosis was observed at all concentrations ($p < 0.05$), whereas late apoptosis was only seen at the higher concentrations ($p < 0.01$) (Figure 4B). At the lower concentrations, there was an increase in the number of cells in early and late apoptosis, compared to necrosis. Thus, in the treatment at t0, 30 to 47% of the cells were in apoptosis, of which 13.75% were in early and 26.0% in late apoptosis (Figure 4B).

The cells treated with PGN maintained signs of apoptosis (early and late) in 25 to 48% of the cells at t24, while the number in necrosis fell to 16 to 30% (Figure 4C). Compared to the negative control, the cells at t24 showed apoptosis at concentrations of 1.125, 3.375 and 10.125mM ($p < 0.01$). A statistical difference in rate of necrosis was also observed between

the negative control and the cells treated with 3.375 and 0.125mM (Figure 4C). When the cells were observed at t24, 25 to 48% showed apoptosis, of which 13.5% were in early apoptosis and 25.5% in late apoptosis, while 16 to 30% were in necrosis (Figure 4D).

In the treatment with pterogynidine, at t0, we observed necrosis in 4 to 28% (Figure 4A) and apoptosis (early and late) in 22 to 53% of cells (Figure 5B). An increase of apoptosis with the lowest dose was observed, relative to the negative control. At higher concentrations, the treated cells exhibited a gradual but steady increase in early and late apoptosis, and a smaller rise in necrosis. Likewise, in the treatment at t0, 33 to 53% of the cells were in apoptosis, 23.1% in early apoptosis and 16.3% in late apoptosis, while 6 to 28% of the treated cells were in necrosis (Figure 4A).

When the cells treated with PGD were assayed at t24, it was observed that apoptosis signals (early and late) were maintained in 13 to 26.73% of the cells (Figure 5D) and there was a gradual increase in the necrosis response with the dose, from 17 to 35.5% (Figure 4C). Comparing the negative control cells with all of the treatments, it was confirmed that it induced higher apoptosis signals, whereas 9 to 25.5% of treated cells were in necrosis ($p < 0.01$). At t24, 27 to 46.6% of cells showed apoptosis, of which 13% were in early and 26.7% in late apoptosis (Figure 5D).

Caspase 3/7 assay

Apoptotic activity was evaluated through effector caspases 3 and 7 pathway using a luminescent method. This assay produces a luminescent substrate that has a four-peptide

sequence (DEVD), which after cleavage by caspase 3/7 generates a light signal, produced by luciferase. Figure 7 shows to caspase 3/7 enzyme activity in ZR-7531 cell line treated with alkaloids.

Cells treated with PGN, caspase 3/7 activity was higher at concentration of 1.125 mM for t0 (RLU = $62,980.5 \pm 1,353.4$), suggesting that induction caspase 3/7 activation of apoptosis was higher at an intermediate concentration. Lowest activity was observed at 10.125 mM due to PGN cytotoxicity.

Although, no statistical differences were observed between DOX and PGD at 0.25 mM (RLU = 35.8673 ± 2.170) for t0, apparently induction of apoptosis at this concentration was verified. At higher concentrations, PGD didn't show caspase 3/7 activity because of its cytotoxic effect.

For the treatment period of t24, both compounds showed no statistical significance between of them and DOX, indicating higher induction of apoptosis (Figures 7B and 7D). However, when comparing t0 and t24, lower caspase 3/7 activity was observed because of higher cytotoxicity of the compounds for t24.

Figure 8 shows ZR7531 treated with PGN and PGD. We observe cell death with morphology rounded in the higher concentrations (Figure 8 A, B and E) whereas in lower concentrations the cells are confluent (Figure 8 C, D, F, G and H).

Discussion

The aim of this study was to characterize the effects of pterogynine and pterogynidine, extracted from *Pterogyne nitens* on the viability and apoptosis of breast cancer cell line. Cytotoxicity assay of compounds provided additional support for the previous reports of Regasini et al. (2009) [15], in which were cytotoxic and anticarcinogenic alkaloid isolates

from *P. nitens* stem. Also these results provide additional support for a recent report of Lopes et al (2009) [28] in which in vitro cytotoxic, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of alkaloid pterogynidine were reported.

Alkaloids with terminal amino groups and indole rings have been studied and found to possess antitumoral, antiviral, antifungal and anti-inflammatory activities [29-30]. Other structures of alkaloids isolated from plants are being related to analgesic, antiarrhythmic and immunomodulatory activities [31]. However, none of these compounds has been considered to have important activity in solid tumors, including breast cancer. Thus, a growing number of studies involving treatment of tumoral cell lines with alkaloids in the search for some antitumor activity are necessary.

In the present study, it was observed that the alkaloids PGN and PGD, exerted concentration-dependent cytotoxicity to invasive ductal carcinoma cell line. Apparently, the best cytotoxicity was seen in the treatment for t0, for both substances, with higher effect being observed with PGD.

The PGN and PGD alkaloids of *P. nitens* showed a significant apoptosis induction with concentration-dependent profile against ZR-7531 by the Annexin-V assay. Firstly, when apoptosis was assessed by flow cytometry, both alkaloids exhibited different anti-apoptotic effects: PGN induced late apoptosis for the t0 treatment, which became weaker at t24, while PGD produced an intense effect of late apoptosis/necrosis at t24. These results suggest that apoptosis is more exuberant in the treatment with PGN at t0. On the other hand, a smaller percentage of cells treated with PGD were in early apoptosis and most were in late apoptosis/necrosis for the t24 period, possibly indicating the cells continued the process of cell death (apoptosis or necrosis) in stages subsequent to the treatment [27].

In the present study, to improve the characterization, the Hoechst/propidium iodide assay was carried out and compared with the Annexin-V results. It was possible to observe

better the difference between early and late apoptosis in the ZR-7531 cells, showing that PGN, at t0 and t24, and PGD at t0 exhibited a larger concentration-response effect for late apoptosis and a smaller effect for early apoptosis, in all of the studied concentrations.

Apoptosis studies evaluating caspase 3/7 activity in ZR-7531 cell line, as far as we know, doesn't exist. We assumed the hypothesis that caspase 3/7 activity can be evaluated at lower concentrations as function of cell damages, which are not yet totally understood [32-33]

Guanidine alkaloids form a rare group of natural products. Although most chemical studies on plant alkaloids show they have phenolic groups in common [34-35], PGN and PGD isolated from *Pterogyne nitens* are unusual alkaloids. Their chemical structures bear disubstituted guanidine moiety. PGD has a guanidine structure with *N,N'*-diisoprenyl substitution. Compared to *N,N',N''*-triisoprenyl, it shows reasonable cytotoxicity relative to the trisubstituted alkaloid, which was demonstrated to be highly deleterious to the cell lines [35-36]. Comparing the cytotoxicity of the two alkaloids, we observed greater activity in PGD than in PGN, due to the lower IC₅₀ of the former. PGD also showed a similar concentration-response effect for early apoptosis and late apoptosis in the treatment followed by the period after 24 hours of treatment.

Conclusion

The results of this study indicated that pterogynine and pterogynidine inhibit the proliferation of human breast cancer cells and induce cell death by apoptosis. The alkaloids, isolated from *Pterogyne nitens*, could be a good chemotherapeutic compounds against human breast cancer cells. We also suggest that the substitutions in the guanidine structure of the alkaloids might be related to the intensity of the effect produced in the cells.

References

- [1] Lu R, Serrero G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/ granulín precursor). *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:142-147.
- [2] Kim JB, Lee K, Ko E, Han W, Lee JE, Shin I, Bae J, Kim S, Noh D. Berberine inhibits growth of the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Planta Med* 2008;74:39–42.
- [3] Waterhouse DW, Dragowska WH, Gelmon KA, Mayer LD, Bally MB. Pharmacodynamic behavior of liposomal antisense oligonucleotides targeting Her-2/neu and vascular endothelial growth factor in an ascetic MDA435/LCC6 human breast cancer model. *Cancer Biology & Therapy* 2004;3:197-204.
- [4] Brandão MG, Zanetti NN, Oliveira P, Graél CF, Santos AC, Monte-Mór RL. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;120:141–148.
- [5] Kwiecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, de Lemos Wiese LP, Rossi MH, Gonzalez E, Felício JD, Filho DW, Pedrosa RC. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;17:69–75.
- [6] Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, Matos OM, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;111:396–402.

- [7] Espindola LS, Vasconcelos Jr, JR, de Mesquita ML, Marquié P, de Paula JE, Mambu L, Santana JM. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Medica* 2004;70:1093–1095.
- [8] de Mesquita ML, Grellier P, Blond A, Brouard JP, Paula JE, Espindola LS, Mambu, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005;13:4499–4506.
- [9] Tempone AG, Borborema SET, de Andrade HF, de Amorim GNC, Yogi A, Carvalho CS, Bachiega D, Lupo FN, Bonotto SV, Fischer DCH. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 2005;12:382-390.
- [10] Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Micheld S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;123:439–445.
- [11] Lorenzi H. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*; Plantarum: Nova Odessa 1998;1:151-160.
- [12] Bukart A. *Las leguminosas argentinas*; Aemé Agency: Buenos Aires 1952;1:156-143.
- [13] Crivos M, Martinez MR, Pochettino ML, Remorini C, Sy A, Teves L. Pathways as signatures in landscape: towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guaraní (Northeastern Argentina). *Journal of Ethnobiology & Ethnomedicine* 2007;2:1-12.

-
- [14] Regasini LO, Velloso JCR, Silva DHS, Furlan M, Oliveira OMM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MCM, Barreiro EJ, Bolzani VS. Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* 2008; 69:1739-1744.
- [15] Regasini LO, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Barreiro EJ, Ferreira PMP, Pessoa C, Lotufo LVC, Moraes MO, Young MCM, Bolzani VS. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 2009;72:473-476.
- [16] Regasini LO, Fernandes DC, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Furlan M, Bolzani VS, Barreiro EJ, Cardoso-Lopes EM, Young MCM, Torres LB, Velloso JCR, Oliveira OMM. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). *Química Nova* 2008; 31:802-806.
- [17] Regasini LO, Oliveira CM, Velloso JCR, Oliveira OMMF, Silva DHS, Bolzani VS. Free radical scavenging activity of *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae). *African Journal of Biotechnology* 2008;7:4609-4613.
- [18] Regasini LO, Lopes AA, Silva DHS, Furlan M, Young MCM, Maria DA, Barreiro EJ, Bolzani VS. Antiproliferative effect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 2007;28:335-340.

- [19] Fernandes DC, Regasini LO, Velloso JCR, Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Bolzani VS, Oliveira OMM, Silva DHS. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2008;56:723-726.
- [20] Ferreira FG, Regasini LO, Oliveira AM, Campos JADB, Silva DHS, Cavalheiro AJ, Santos RA, Bassi CL, Bolzani VS, Soares CP. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo de *Tradescantia pallida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009;19:61-67.
- [21] Regasini LO, Vieira-Júnior GM, Fernandes DC, Bozlani VS, Cavalheiro AJ, Silva DHS. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae) using High-Resolution Gas Chromatography. *Journal of the Chilean Chemical Society* 2009; 54:218:221.
- [22] Souza A, Vendramini RV, Brunetti IL, Regasini LO, Silva DHS, Pepato MT. Tratamento crônico com extrato etanólico de *Pterogyne nitens* não melhora parâmetros clássicos do diabetes experimental. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2009;19:412-417.
- [23] Weber CJ. A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. *Journal of Biological Chemistry* 1930;16:55-63.
- [24] Corral RA, Orazi OO, Petrucelli MF. A new guanidine alkaloid. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1969;25:1020-1025.

-
- [25] Bolzani VS, Gunatilaka AAL, Kingston DGI. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 1998;58:1683-1688.
- [26] Zhang Y, Ong CN, Shen HM. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer Lett* 2004;211:175-188.
- [26] Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infection and Immunity* 1998;66:4474-4483.
- [27] Elstein KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Experimental Cell Research* 1994;211:322-331.
- [28] Lopes, FCM, Rocha A, Pirraco A, Regasini LO, Silva DHS, Bolzani VS, Azevedo I, Carlos IZ, Soares R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009; 9:15-26.
- [29] Bao B, Sun Q, Yao X, Hong J, Lee CO, Sim CJ, Im KS, Jung JH. Cytotoxic bisindole alkaloids from a marine sponge *Spongosorites* sp. *Journal Nat Prod* 2005;68:711-715.
- [30] Dassonneville L, Lansiaux A, Wattlelet A, Wattez N, Mahieu C, Miert SV, Pieters L, Bailly C. Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and

neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 2000;409:9-18.

[31] Xu YK, Yang SP, Liao SG, Zhang H, Lin LP, Yue JM. Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *J Nat Prod* 2006;69:1347-1350.

[32] Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther.* 2006; 5(7):763-5.

[33] Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(1):21-4.

[34] Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. Selective cytotoxicity of Pancreatistatin-relates natural *Amaryllidaceae* alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International* 2007;7:01-07.

[35] Maciorowski Z, Delic J, Padoy E, Klijanienko J, Dubray B, Cosset JM, Dumont J, Magdelénat H, Vielh P. Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Hodgkin's lymphomas. *Cytometry* 1998;32:44-50.

[36] Mavar-Manga H, Haddad M, Pieters L, Baccelli C, Penge A, Quentin-Leclercq J. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115:25-29

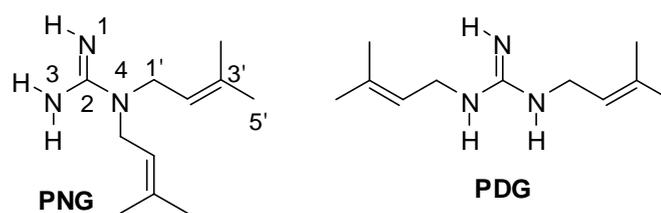


Figure 1. Molecular structures of guanidine alkaloids, pterogynine (**PNG**) and pterogynidine (**PDG**), isolated from the leaves of *Pterogyne nitens*.

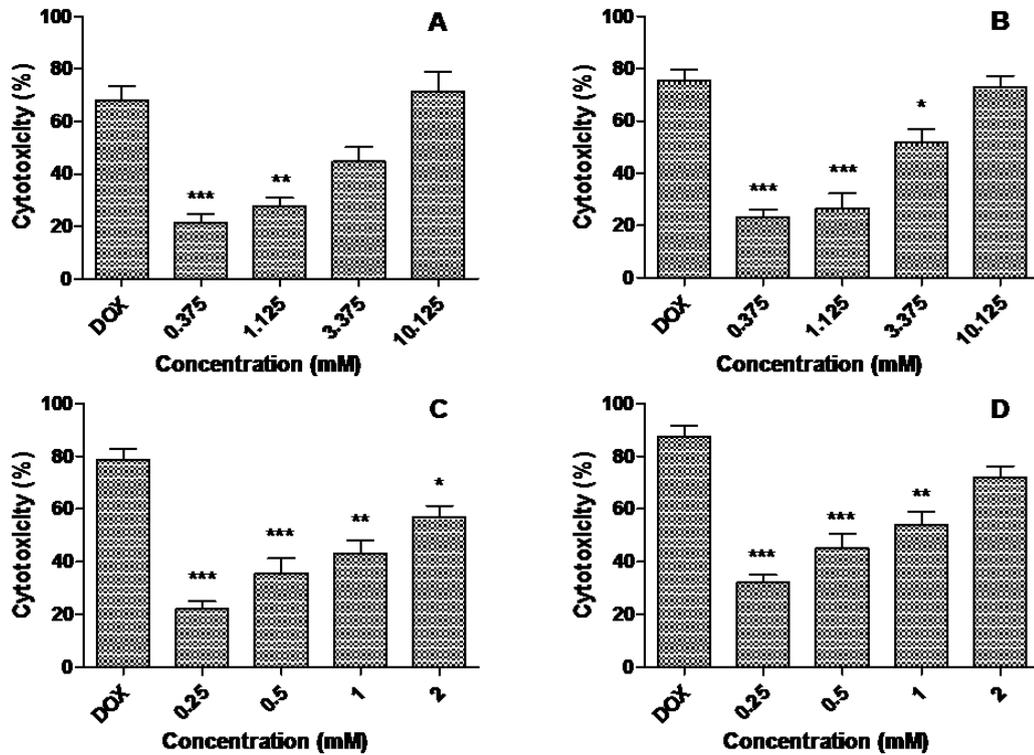


Figure 2. Cytotoxicity by MTT assay in ZR-7531 cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm standard error and subjected to One-way ANOVA with Tukey's test (treatment versus DOX). (A) Cells treated with PGN for t0; (B) Cells treated with PGN for t24; (C) Cells treated with PGD for t0; (D) Cells treated with PGD for t24. DOX: doxorubicin at 15 μ g/mL; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

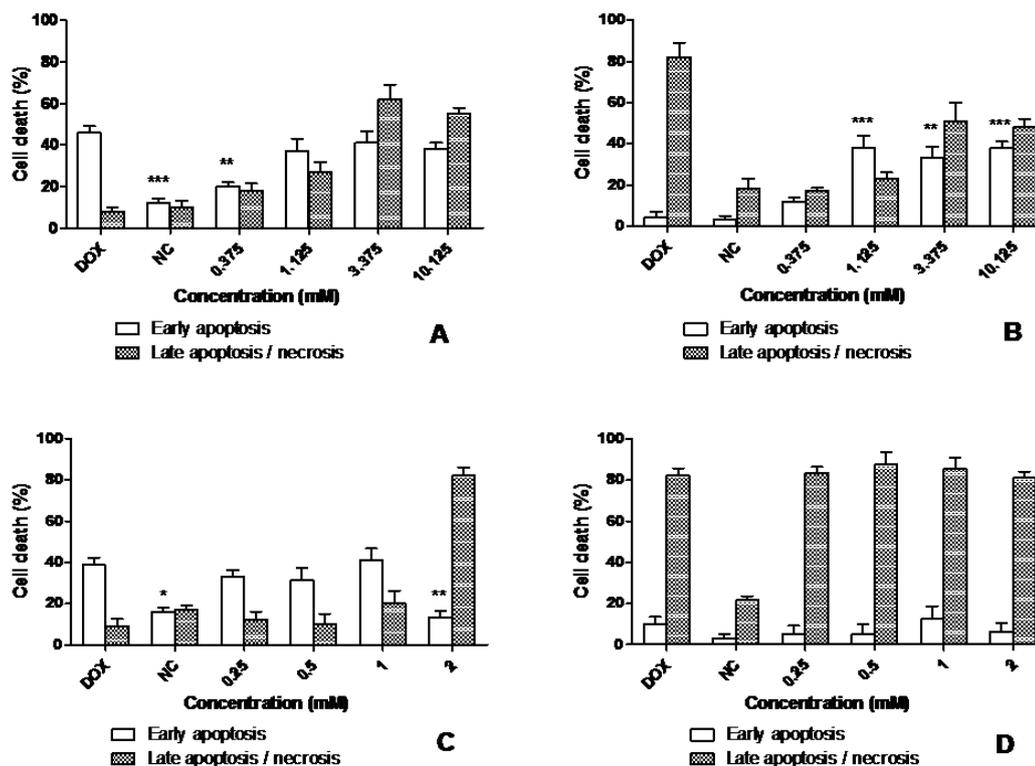


Figure 3. Apoptosis by Annexin-V assay in ZR-7531 cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm standard error and subjected to One-way ANOVA with Tukey's test (treatment versus DOX, for early apoptosis). (A) Cells treated with PGN for t0; (B) Cells treated with PGN for t24; (C) Cells treated with PGD for t0; (D) Cells treated with PGD for t24. DOX: doxorubicin at 15 μ g/mL; NC: untreated cells; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

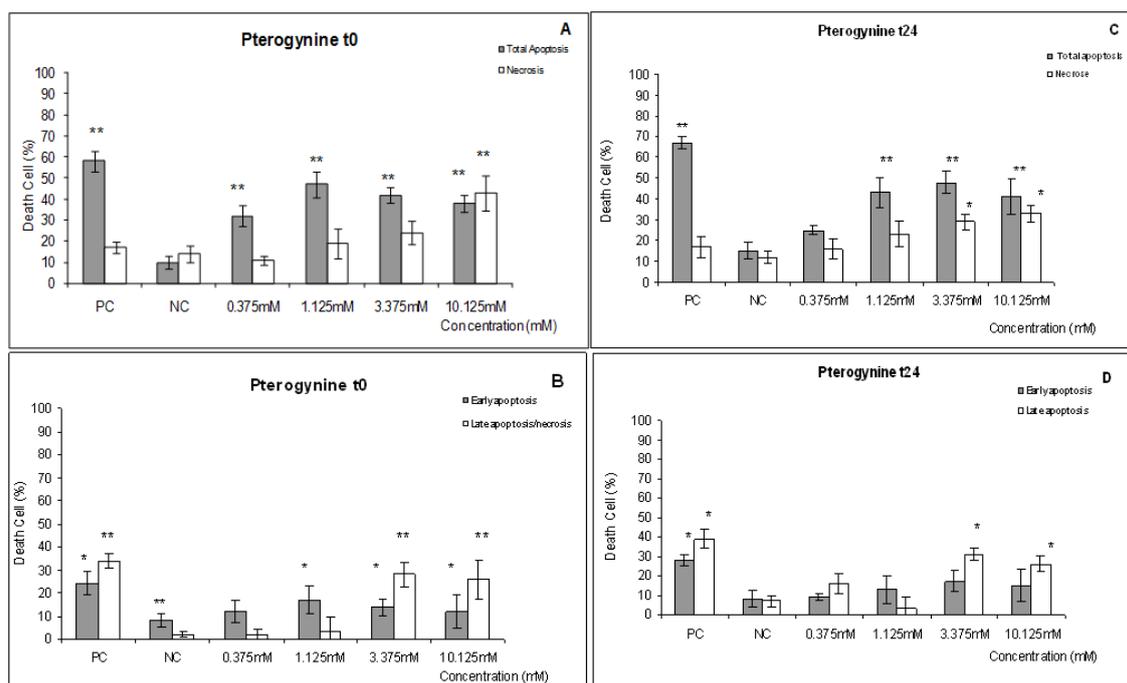


Figure 4. Apoptosis by Hoechst / PI assay in ZR-7531 cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm standard error and subjected to One-way ANOVA with Tukey's test (treatment versus PC, for early apoptosis). (A) Cells treated with PGN for t0, relation between total apoptosis and necrosis; (B) Cells treated with PGN for t0, relation between early and late apoptosis; (C) Cells treated with PGN for t24, relation between total apoptosis and necrosis; (D) Cells treated with PGN for t24, relation between early and late apoptosis. PC: doxorubicin at 15 μ g/mL; NC: untreated cells; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

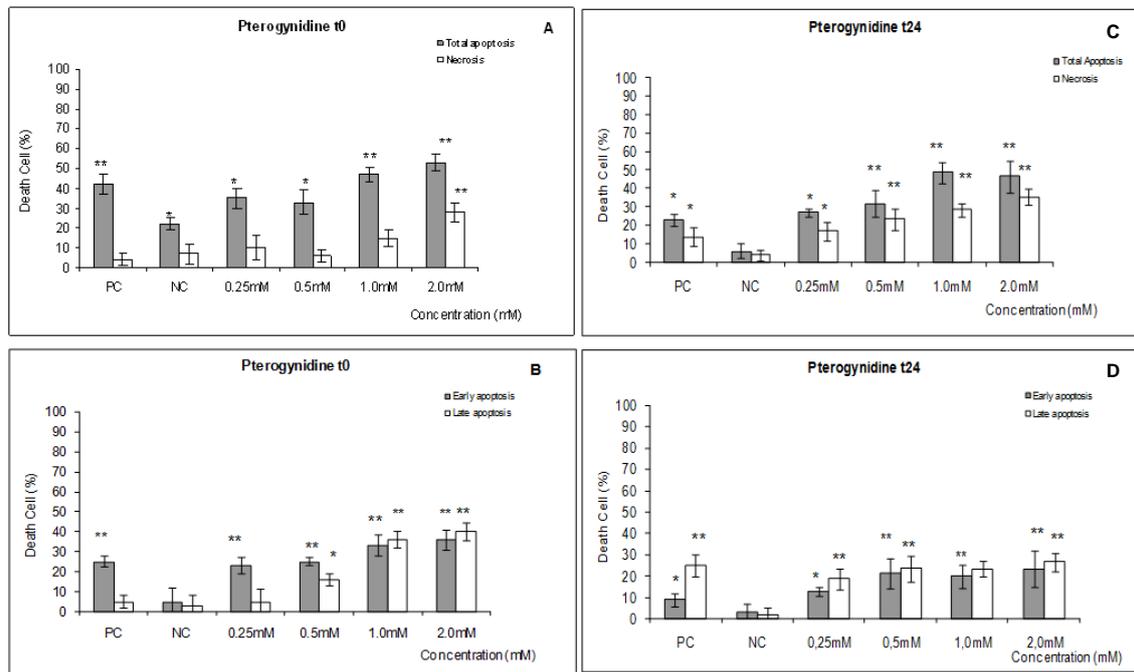


Figure 5. Apoptosis by Hoechst / PI assay in ZR-7531 cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm standard error and subjected to One-way ANOVA with Tukey's test (treatment versus PC, for early apoptosis). (A) Cells treated with PGD for t0, relation between total apoptosis and necrosis; (B) Cells treated with PGD for t0, relation between early and late apoptosis; (C) Cells treated with PGD for t24, relation between total apoptosis and necrosis; (D) Cells treated with PGD for t24, relation between early and late apoptosis. PC: doxorubicin at 15 μ g/mL; NC: untreated cells; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

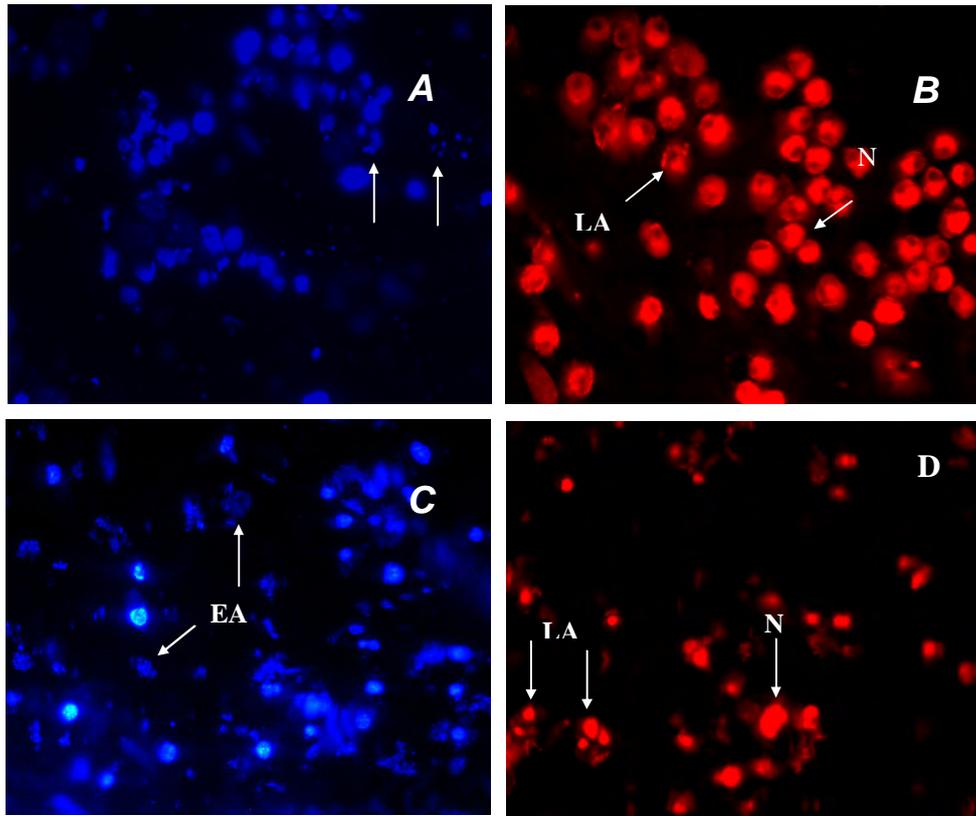


Figure 6. Apoptosis assay by Hoechst and propidium iodide. ZR-7531 Cells treated with 1.0 mM of pterogynidine (A and B) and 3.375 mM of pterogynine (C and D). (A) and (C) early apoptotic cells (EA) with apoptotic nuclei stained by Hoechst with fluorescence in the blue spectrum (arrow); B) and D) Late apoptosis (LA) and necrosis (N) stained propidium iodide shown fluorescence in the red spectrum (arrow). Fluorescence microscope micrographs observed in absorbance of 360 and 538 nm with a 400x.

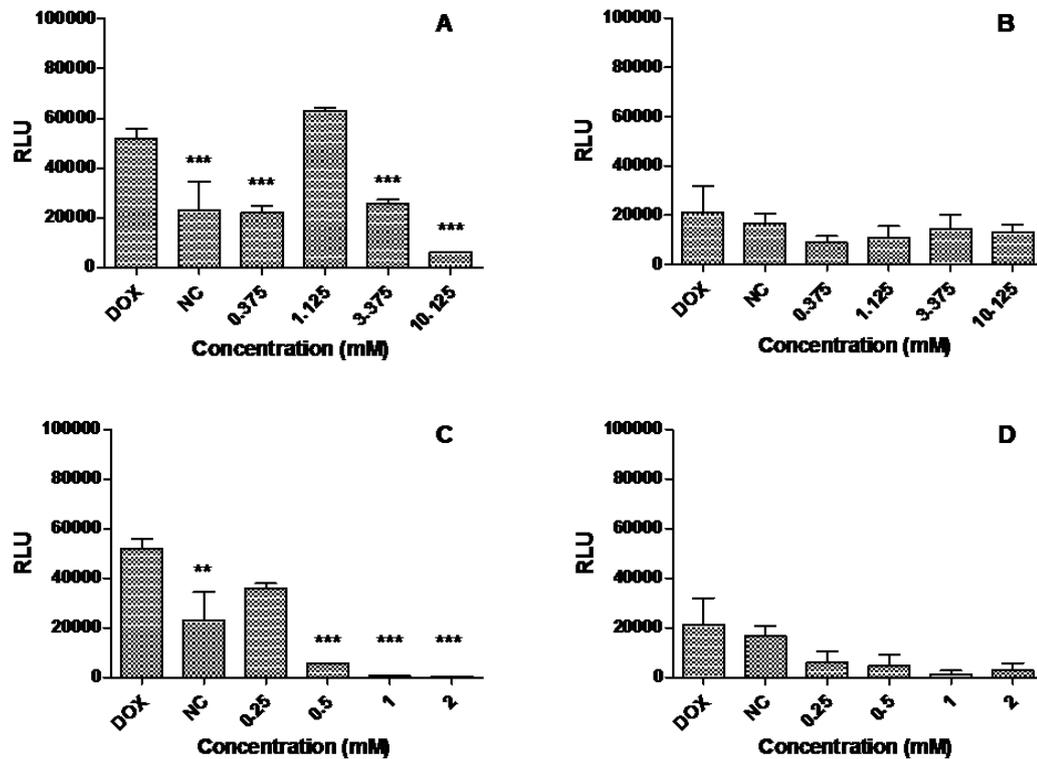


Figure 7. Caspase 3/7 activity ZR-7531 cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm standard error and subjected to One-way ANOVA with Tukey's test (treatment versus DOX). (A) Cells treated with PGN for t0; (B) Cells treated with PGN for t24; (C) Cells treated with PGD for t0; (D) Cells treated with PGD for t24. DOX: doxorubicin at 15 μ g/mL; NC: untreated cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

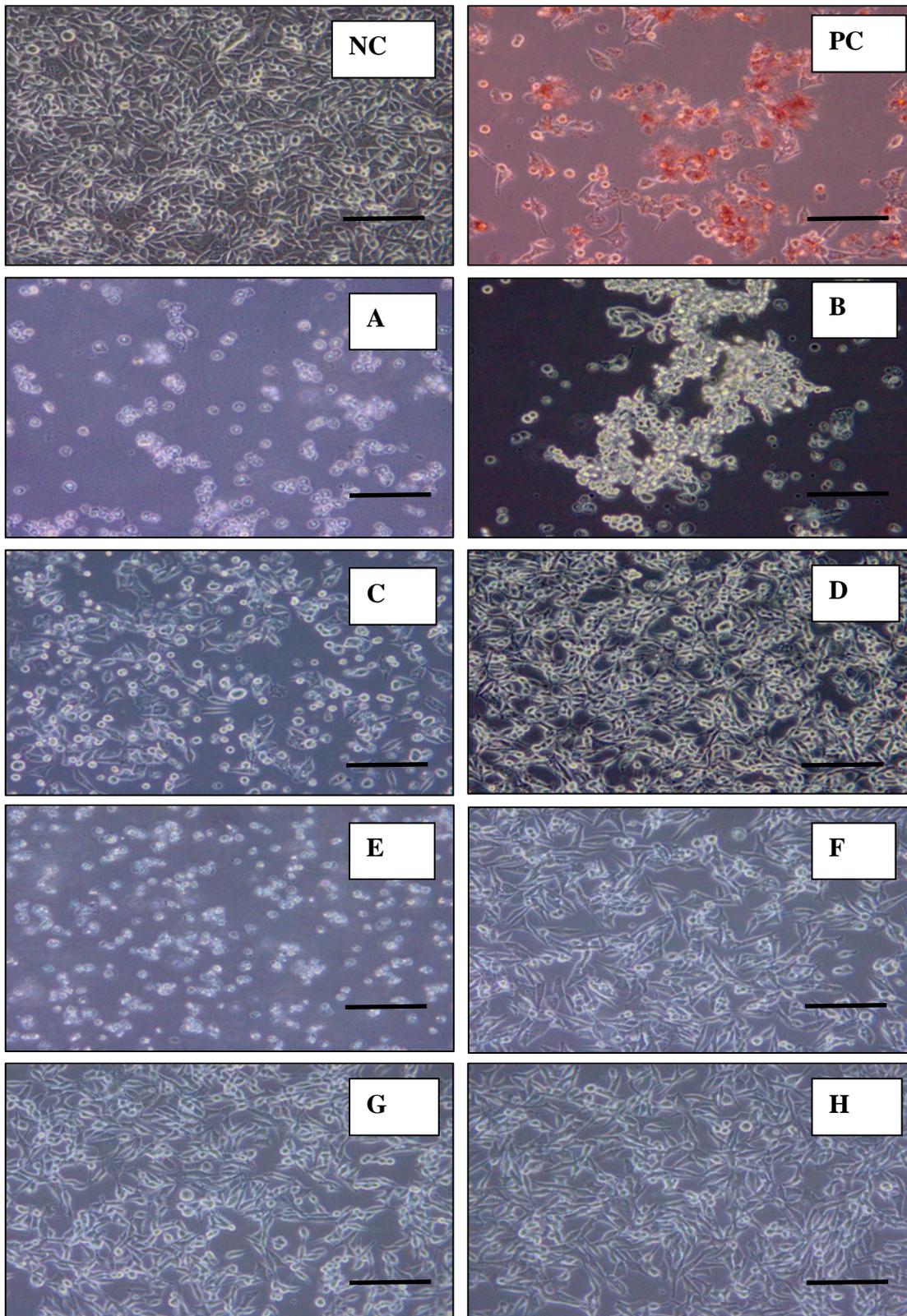


Figure 8. Cell line (ZR 7531) treated with PGN and PGD. Cell line treated with PGN at different concentrations A) 10,125 mM, B) 3,375 mM, C) 1,125 mM, D) 0,375 mM. Cell line treated with PGD at different concentration E) 2,0 mM F) 1,0 mM G) 0,5 e H) 0,25. NC (Negative Control); PC (Positive Control-Doxorubicin 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Scale bars equal to 100 μm