

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA-LTF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS
DE *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*
e *Cratylia floribunda*

GLÁUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

JOÃO PESSOA-PB

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GLÁUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS
DE *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*
e *Cratylia floribunda***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Prof. Delby Fernandes de Medeiros, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Orientador:

Profº Dr. Demétrius Antonio Machado de Araújo

Co-orientador:

Profº Dr. Luís Fernando Marques dos Santos

JOÃO PESSOA - PB

2009

GLÁUCIA VERÍSSIMO FAHEINA MARTINS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS
DE *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*
e *Cratylia floribunda***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita com as normas da ética científica.

Aprovada em 10 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Prof^a.Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará
(membro)

Prof^a.Dra. Darizy Flávia Silva de Amorim Vasconcelos
Universidade Federal da Paraíba
(membro)

AGRADECIMENTOS

Ao meu maravilhoso Deus pelo dom da vida e pelo cuidado comigo até aqui, que me ergueu nos momentos difíceis e me fez acreditar que eu sou capaz, não só por mim mesma, mas por causa Dele, que renova minhas forças a cada manhã;

Aos meus pais, Gualberto e Marluce Faheina, por todo amor, apoio, preocupação e bons exemplos, que me alicerçaram na caminhada da vida;

Ao meu filho Gabriel Henrique, pelo amor, carinho, alegria, e as brincadeiras, muitas vezes “exageradas”, mas que me animam e incentivam a ver a vida de forma mais descontraída;

Ao meu maravilhoso esposo, Paulo Rogério P. Martins, “more”, por todo amor e compreensão nesta etapa de minha vida, e por me fazer realmente acreditar no amor. Obrigada pela paciência, pois conseguimos construir nossa história nesse curto tempo de mestrado, ele termina aqui, mas nós continuamos no curso desta vida juntinhos!

A toda minha família que sempre torceu por mim, principalmente meu irmão Glauber Faheina e minha cunhada Evelyn Faheina, pelo incentivo e momentos compartilhados.

Aos verdadeiros amigos, que nem sempre estão perto fisicamente, mas merecem todo meu carinho, pela amizade; Joyce, Ebinha, Sabrina;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Demetrius A. M. Araújo, pela confiança, apoio, incentivo, orientação e principalmente pela liberdade que nos concede, de opinar e fazer escolhas, me fazendo crescer e amadurecer nesse mundo da Ciência. Mas principalmente agradeço pela amizade e companheirismo nesses 7 anos acadêmicos (desde o primeiro dia de aula!);

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Marques Santos, pela co-orientação, amizade, grande contribuição nas correções deste trabalho, pela descontração nas conversas e presteza em ajudar sempre que precisei;

A prof^{ta}. Dra. Cláudia do Ó Pessoa, por me receber no Laboratório de Oncologia Experimental-LOE-UFC, e possibilitar a execução de parte dos experimentos deste trabalho;

A prof^{ta}. Dra. Darizy Flávia Silva de Amorim Vasconcelos, por aceitar participar da banca examinadora, e pelas futuras sugestões que tenho certeza que serão pertinentes;

Ao prof. Dr. Márcio Viana Ramos, por ceder as lectinas para realização deste trabalho, e por ser o “culpado” da minha “paixão” por estas moléculas;

Aos amigos companheiros, do grupo de Citotoxicidade: Alethéia Lacerda, e meus queridos pupilos: Bruna Dantas, Beatriz Lima, Erik Melo, Caio e Kalina, e ainda meus “eternos” pupilos, Bruno Chaussê e Thalita Figueiredo, pela grande ajuda no laboratório e pelos “aperreios”, mas acima de tudo pelos momentos divertidos que passamos juntos no dia a dia, que tornam a rotina mais prazerosa;

Ao restante do grupo de Farmacologia Celular, Biologia Molecular e Bioinformática: Andréa Christina, Aron Miranda, Marcos Medeiros, Juan, Hélio, Itácio, pelo companheirismo e momentos compartilhados nas nossas discussões de seminários, que tanto acrescentou em minha formação;

A Marilene Rocha, pela amizade ímpar, pela alegria, exemplo de disposição e vontade, amiga para todas as horas, me ajudou em momentos que nem imaginei, apesar de me aperrear muito para conseguir isolar os benditos neurônios, quase que tiro os meus;

Mas principalmente agradeço as grandes amigas Teresa Cristina e Renata Almeida, também pertencentes ao grande grupo acima, pela eterna amizade e por tudo que passamos juntas nos Labimes, nos corredores, na cantina da Pioneira, e que me ensinaram também a entender e dar importância ao “mundo” procariótico;

Aos amigos funcionários do Departamento de BIOLOGIA MOLECULAR, Regina Emy, Bárbara Leal, Dione Porto, Célia, José Moreira, e as técnicas Rozângela Cordeiro e Alda Paulino pela convivência e presteza em ajudar sempre que precisei.

Ao atual chefe do departamento de BIOLOGIA MOLECULAR, Carlos Alberto Gadelha, pela ajuda, incentivo e compreensão nos momentos que precisei ser liberada para execução deste trabalho;

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelos ensinamentos, incentivo e contribuição na formação do meu aprendizado na vida acadêmica, em especial a Luís Fernando Marques Santos e Bagnólia Araújo Silva pelo exemplo de professores;

A todos os amigos da turma do mestrado 2007, pelo companheirismo e alegria que foram compartilhados durante o curso, em especial agradeço a Fabíola Fialho, Kelly Lira e Meri Emili, pela amizade construída de uma forma tão especial;

Aos funcionários do LTF que sempre ajudaram quando solicitados, Tânia (secretária da PG), Crispim (Biotério) e Vicente (companheiro de turma) com O N₂ líquido.

A meus primos Juliana, Janaína e Vinícius Faheina, que me receberam de forma inesquecível em Fortaleza-Ce, quando fui realizar uma das etapas deste trabalho, e que me fizeram valorizar cada dia mais a instituição “família”, mesmo que a distância.

Aos colegas do laboratório de Oncologia Experimental-LOE-UFC, em especial a Bruno Coêlho pela enorme ajuda em todos os experimentos lá realizados, pela sua disposição para trabalhar toda e qualquer hora; A Adriana, e José Roberto, os amigos “estrangeiros”, pela amizade rapidamente conquistada, a prof^a Raquel Montenegro pela ajuda e simpatia, e as técnicas Silvana e Erivanda pela ajuda sempre que solicitada; e a dona Rogéria que com tanta presteza preparava o material diariamente.

Meu muito obrigada a todos!

Vocês com certeza fazem parte deste trabalho.

Gláucia Veríssimo Faheina Martins

Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram o que Deus preparou para nós
Um futuro certo, cheio de esperança e paz, muita paz
Quero viver teus sonhos, teus planos, tudo que por mim conquistaste na cruz
A tua vontade é o meu prazer
Sem ti nada posso, opera em mim o teu poder
Vê o fruto do teu penoso trabalho
Alegra-te sobre mim, alegra-te sobre mim
É tão bom sonhar teus sonhos
É tão bom viver teus planos
E conhecer a graça de pertencer a ti

Deus fiel!

É tão bom fechar meus olhos
E contemplar com minha fé,
todas as tuas palavras,
tuas promessas pra mim,

Deus fiel!

"Ana Paula Valadão"

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Câncer	19
1.2 Produtos naturais como fonte de fármacos antitumorais	20
1.2.1 Lectinas vegetais	22
1.2.1.1 Lectinas de leguminosas	25
1.2.2 Atividade antitumoral de lectinas vegetais	27
1.3 Citotoxicidade	29
1.4 Morte celular	31
2. OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais utilizados	40
3.1.1 Equipamentos	40
3.1.2 Soluções	41
3.1.3 Animais	43
3.1.4 Células	44
3.1.4.1 Obtenção de macrófagos peritoneais	44
3.1.4.2 Linhagens celulares	44
3.2 Metodologia experimental	47
3.2.1 Lectinas	47
3.2.1.1 Preparo das soluções	48

3.2.2 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	48
3.2.2.1 Avaliação do efeito das lectinas sobre a morfologia celular	48
3.2.2.2 Técnica de MTT	48
3.2.2.3 Contagem de ácidos nucléicos (CAN)	50
3.2.2.4 Avaliação do potencial genotóxico das lectinas - Teste do Cometa	51
3.2.3 Análise morfológica- Coloração diferencial por Brometo de Etídeo/Laranja de acridina (LA)	54
3.2.4 Estudo do mecanismo de morte celular	56
3.2.4.1 Ensaios com citometria de fluxo	56
3.2.4.2 Análise da viabilidade celular – Determinação da integridade de membrana celular	57
3.2.4.3 Análise da fragmentação do DNA	57
3.2.4.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.	58
3.2.4.5 Análise dos dados de citometria de fluxo	59
4. RESULTADOS	61
4.1 Estudos da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	61
4.1.1 Análise morfológica do efeito das lectinas nas células tumorais	61
4.1.2 Efeito das lectinas na viabilidade e proliferação (MTT e CAN)	65
4.1.2.1 Cultura de macrófagos peritoneais	65
4.1.2.2 Linhagens tumorais	68
4.1.3 Avaliação do potencial genotóxico das lectinas	80
4.2 Estudo do mecanismo de morte celular	84
4.2.1 Efeito das lectinas no percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas	84
4.2.2 Efeito das lectinas na integridade de membrana plasmática	87
4.2.3 Efeito das lectinas na fragmentação do DNA	89
4.2.4 Efeito das lectinas no potencial transmembrânico mitocondrial	93

5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	108

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática dos três tipos de lectinas de plantas.	24
Figura 2: Estrutura terciária representativa de um monômero de uma lectina de leguminosa (a); Dimerização em ConA (b); Tetramerização em ConA.	26
Figura 3: As duas principais vias apoptóticas.	34
Figura 4: Fragmentação do DNA mediada por CAD.	35
Figura 5: Fotomicrografia da linhagem celular J774 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x	46
Figura 6: Fotomicrografia da linhagem celular HL-60 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x	46
Figura 7: Fotomicrografia da linhagem celular MCF-7 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x	47
Figura 8: Fotomicrografia da linhagem celular MOLT-4 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x	47
Figura 9: Imagens representativas do teste do cometa. Em A vemos células sem danos; e em B vemos os vários tipos de caudas visualizadas no teste do cometa. Fonte: WONG, 2005	54
Figura 10: Células coradas com Brometo de etídeo e laranja de acridina. Em A observamos células viáveis coradas pela laranja de acridina. Em B visualizamos células apoptóticas (setas brancas) mostrando o núcleo fragmentado, e células necróticas coradas em laranja pelo brometo de etídeo.	55
Figura 11: Fotografia do citômetro de fluxo utilizado nos ensaios de determinação da integridade de membrana, análise da fragmentação do DNA, e avaliação do potencial de membrana mitocondrial.	56
Figura 12: Estrutura da Rodamina 123.	58
Figura 13: Fotomicrografia de células J774 tratadas com lectinas nativas ou desnaturadas pelo calor. Observação em microscópio óptico invertido com contraste de fase.	62
Figura 14: Fotomicrografia de células MCF-7 tratadas com lectinas. Observação em microscópio óptico invertido com contraste de fase.	63

Figura 15: Fotomicrografia das células MOLT-4 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por 72h e observadas em microscópio óptico invertido com contraste de fase.	64
Figura 16: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C-D), CFL (E-F) sobre a viabilidade da cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongos SWISS no período de 24 de incubação (n=2), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, D, F).	67
Figura 17: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem de macrófagos tumorais J774 em 24h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN.	68
Figura 18: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C) e CFL (E-F) sobre a viabilidade da linhagem de macrófagos tumorais J774 em 24h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, F).	69
Figura 19: : Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral MCF-7 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN.	70
Figura 20: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C-D) e CFL (E-F) sobre a viabilidade da linhagem tumoral MCF-7 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A,C,E) e CAN (B,D,F).	72
Figura 21: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT.	73
Figura 22: Efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, D, F).	75
Figura 23: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral MOLT-4 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN.	76
Figura 24: Efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a viabilidade da linhagem tumoral MOLT-4 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e contagem de ácidos nucléicos (B, D, F).	78
Figura 25: Índice de dano ao DNA de células MCF-7 (A) e MOLT-4 (B) e HL-60 (C) no controle (não-tratadas) ou tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL, por 24 horas, nas concentrações 5, 25 e 50µg/mL, determinado pelo teste do cometa.	80
Figura 26: Efeito das lectinas na linhagem MCF-7 analisado pela coloração diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento.	84
Figura 27: Efeito das lectinas na linhagem MOLT-4 analisado pela coloração	85

diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento.

Figura 28: Efeito das lectinas na linhagem HL-60 analisados pela coloração diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento. 86

Figura 29: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células MCF-7. 88

Figura 30: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células MOLT-4. 88

Figura 31: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células HL-60. 89

Figura 32: Análise da fragmentação do DNA de células MCF-7 por citometria de fluxo. 90

Figura 33: Análise da fragmentação do DNA de células MOLT-4 por citometria de fluxo. 91

Figura 34: Análise da fragmentação do DNA de células HL-60 por citometria de fluxo. 92

Figura 35: Avaliação da despolarização mitocondial de células MCF-7 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. 93

Figura 36: Avaliação da despolarização mitocondial de células MOLT-4 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. 94

Figura 37: Avaliação da despolarização mitocondial de células HL-60 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e soluções	41
Tabela 2: Meios de cultura	42
Tabela 3: Tampões	43
Tabela 4: Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	46
Tabela 5: Citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre macrófagos peritoneais e a linhagem J774 no período de 24 horas de incubação, avaliada pelo método de MTT e CAN.	79
Tabela 6: Citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre as linhagens, MCF-7, HL-60 e MOLT-4 no períodos de 72 horas de incubação, avaliada pelo método de MTT e CAN.	79
Tabela 7: Tabela de frequência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem MCF-7 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50µg/mL.	82
Tabela 8: Tabela de frequência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem MOLT-4 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50µg/mL.	83
Tabela 9: Tabela de frequência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem HL-60 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50µg/mL.	83

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
[]	Concentração
MØ	Macrófagos
AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator 1 de ativação de protease apoptótica
Bcl-2	Proteínas que regulam a permeabilidade da membrana mitcondrial, que podem ser pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas
BE	Brometo de etídeo
CAD	DNase ativada por caspase
CAN	Contagem de ácidos nucleicos
CI₅₀	Concentração Inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo
CO₂	Dióxido de carbono
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Conbr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
DL₅₀	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido tetracético Etilenodiamino dissódico
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica
IAP	Proteína inibidora de apoptose (Inhibitory apoptosis protein)
ICAD	Inibitor de CAD
J774	Linhagem tumoral macrofágica murina
LA	Laranja de acridina
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MCF-7	Linhagem de células tumorais de epitélio mamário
MOLT-4	Linhagem de células de linfócitos T tumorais
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
PBS	Tampão fosfato-salina
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	fitohemaglutinina
p53	Proteína supressora tumoral
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	Revoluções por minuto
SBA	Aglutinina de soja
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Smac/DIABLO	Proteína mitocondrial pró-apoptótica
TRAIL	Ligante indutor de apoptose
U	Unidades
WGA	Aglutinina de gérmen de trigo (weath germ agglutinnin)
WHO	World Health Organization
x	Veze

AValiação DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS DE *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. Dissertação de mestrado. Autora: Gláucia Veríssimo Faheina Martins. Orientador: Demetrius Antonio Machado de Araújo. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Aprovada em 10 de junho de 2009.

RESUMO

Lectinas constituem uma classe de glicoproteínas que ligam-se reversivelmente e seletivamente à carboidratos, sendo capazes de distinguir pequenas diferenças estruturais em oligossacarídeos complexos. Estudos têm mostrado que a ligação de lectinas a carboidratos de superfície de células normais e tumorais provoca vários efeitos biológicos, tais como, proliferação celular em linfócitos normais e apoptose em células tumorais. Neste trabalho, foi investigado a citotoxicidade das lectinas de plantas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (Conbr) e *Cratylia floribunda* (CFL), sobre linhagens de células normais e tumorais. Inicialmente, a atividade citotóxica das lectinas foi avaliada pelos ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT) e medida do conteúdo de ácidos nucleicos (CAN). As lectinas ConA, Conbr e CFL não diminuíram a viabilidade de células normais (macrófagos peritoneais), no entanto, mostraram-se citotóxicas para as linhagens tumorais J774, MCF-7, MOLT-4 e HL-60. O ensaio de MTT foi o mais sensível aos efeitos das lectinas sobre a viabilidade celular do que o ensaio de CAN, sendo ConA a lectina mais citotóxica, seguida de Conbr e CFL. Os valores de CI_{50} variaram em torno de 10, 20 e 45 $\mu\text{g/mL}$, para ConA, Conbr e CFL respectivamente. O potencial genotóxico das lectinas também foi avaliado usando o teste do cometa, mostrando que essas proteínas produziram alto índice de lesões do DNA nas células MCF-7, MOLT-4 e HL-60, atingindo uma frequência de danos superior a 70% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para todas as lectinas. Nessas mesmas linhagens tumorais, as lectinas também causaram alterações morfológicas, avaliadas por coloração diferencial com brometo de etídeo e laranja de acridina, características de apoptose, sendo possível observar necrose nas concentrações mais elevadas. Nos ensaios que avaliaram apoptose, as lectinas ConA, Conbr e CFL causaram fragmentação internucleossomal e perda da integridade de membrana, nas maiores concentrações testadas e despolarização mitocondrial. Concluiu-se que as lectinas ConA, Conbr e CFL são citotóxicas para as células tumorais causando morte celular por apoptose, podendo ser consideradas como uma classe de moléculas com elevado potencial antitumoral.

Palavras-chave: Lectinas, câncer, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose.

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC POTENTIAL OF LECTINS *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. Master's dissertation. Author: Gláucia Veríssimo Faheina Martins. Advisor: Demetrius Antonio Machado de Araújo. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Approved on June 10th, 2009.

ABSTRACT

Lectins constitute a class of glycoproteins which are capable of binding carbohydrates selectively and reversibly, distinguishing small structural differences in complex oligosaccharides. Some studies have shown that binding of lectins to carbohydrate surface of normal and tumor cells leads to various biological effects such as, cell proliferation in normal lymphocytes and apoptosis in tumor cells. This study investigated the assessment of cytotoxic lectins of legumes *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (Conbr) and *Cratylia floribunda* (CFL) in normal, mouse peritoneal macrophage, and tumor cells. Initially the cytotoxic activity of the lectins was evaluated by reduction of tetrazolium (MTT) salt assay and measured the content of nucleic acids (CAN). ConA, Conbr and CFL not decreased the viability of peritoneal macrophages, but showed to be cytotoxic for J774, MCF-7, Molt-4 and HL-60 lineages. The MTT assay was more sensitive to the effects of lectins on cell viability and ConA was the most cytotoxic, followed by Conbr and CFL. The IC₅₀ values ranged from around 10, 20 and 45 µg/mL at ConA, Conbr and CFL respectively. The genotoxic potential of lectins was also evaluated using the comet assay, showing that proteins had a high rate of lesions in DNA from MCF-7, Molt-4 and H-60 cells, reaching a damage frequency exceeding 70% in concentration of 50 µg/mL for all lectins. The lectins caused morphological changes as assessed by differential staining with ethidium bromide and acridine orange, characteristic of apoptosis, and necrosis can be observed in higher lectin concentrations in tumor cell lines. In tests that evaluated the apoptosis, ConA, Conbr and CFL caused internucleosomal fragmentation, loss of membrane integrity which is characteristic of late apoptosis or necrosis, and mitochondrial depolarization. It was concluded that ConA, Conbr and CFL exhibited cytotoxicity to tumor cells causing cell death by apoptosis, therefore these proteins can be considered as a class of molecules with antitumor potential.

Keywords: Lectins, cancer, cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.3 Câncer

Células cancerígenas, por definição, proliferam a revelia do controle normal e são capazes de invadir e colonizar tecidos da vizinhança. Muitos cânceres são originados de uma única célula que sofreu uma mutação somática, mas a progênie desta célula necessita de muitas outras mutações adicionais, antes que elas se tornem um câncer. Este fenômeno de progressão tumoral, o qual usualmente leva muitos anos, reflete a ação da evolução por mutação e seleção natural entre células somáticas; a taxa deste processo é acelerada por ambos agentes mutagênicos (iniciadores tumorais) e por certos agentes não-mutagênicos (promotores tumorais) que afetam a expressão gênica, estimulam a proliferação celular, e alteram o balanço ecológico de células mutantes e não-mutantes. Estes muitos fatores contribuem para o desenvolvimento de um câncer, e alguns destes são evitáveis, uma vez que uma larga proporção de cânceres são em princípio preveníveis (ALBERTS et al., 2004).

O câncer é mais apuradamente descrito como sendo o produto do mal funcionamento da regulação do ciclo celular cujas células mutadas e injuriadas, as quais são normalmente mortas, são permitidas a progredir realizando o ciclo celular, acumulando mutações (FOSTER, 2008). Muitas mutações ocorrem em protooncogenes e genes supressores de tumor. Protooncogenes normalmente agem em diferentes níveis de proliferação celular, mas podem promover crescimento quando mutados, similarmente, a mutação de genes supressores de tumor podem retardar a inibição da progressão do ciclo celular, com isto facilitando o crescimento anormal (VERMEULEN et al., 2003; FOSTER, 2008).

O câncer pode ser causado por uma das três vias, isto é, dieta incorreta, predisposição genética, e pelo meio ambiente. Pelo menos 35% de todos os cânceres são causados por dieta incorreta, e no caso do câncer de cólon, a dieta pode responder por 80% dos casos. A predisposição genética proporciona 20% de casos de câncer, com isto levando a maioria de cânceres sendo associados com a carcinogênese ambiental (REDDY et al., 2003). Doll e Peto (1981) reportaram que nos Estados Unidos os maiores carcinógenos ambientais incluem o ar, a poluição da água, a radiação e medicação.

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de

câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil), de cólon (655 mil), e de mama (502 mil). Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70 % ocorreram em países de média ou baixa renda World Health Organization (WHO, 2009). Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos. Parkin e colaboradores (2001) estimaram que, no ano de 2000, o número de casos novos de câncer em todo o mundo seria maior que 10 milhões. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para ao ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e do colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2007).

Na última década, avanços na pesquisa sobre o câncer têm intensificado nosso entendimento da biologia e genética do câncer. Entre o mais importante destes avanços está o entendimento dos genes que interrompem o processo apoptótico e que levam a iniciação, progressão e metástase do tumor. No entanto um mecanismo de supressão tumoral identificado nos testes que utilizam produtos naturais pode ser a indução da apoptose, desse modo estabelecendo uma base genética para a terapia do câncer por produtos naturais (REDDY et al., 2003).

Tem sido mostrado que drogas anticancerígenas sintéticas causam morte de células não-específicas, enquanto produtos naturais oferecem ação protetora e terapêutica para todas as células, apresentando baixa citotoxicidade para células normais. O estudo de um programa molecular de agentes quimiopreventivos que agem induzindo apoptose indicou que os efeitos diferenciais de compostos estudados em distintas vias moleculares da apoptose, justifica investigações adicionais de produtos naturais na tentativa de usar elementos moleculares da apoptose na quimioprevenção do câncer (REDDY et al., 2003).

1.4 Produtos naturais como fonte de fármacos antitumorais

A função de produtos naturais como uma fonte para novos medicamentos tem sido reconhecida desde tempos remotos (FAMSWORTH et al., 1985; CRAGG et al., 1997). A

despeito do maior progresso científico e tecnológico na química combinatória, drogas derivadas de produtos naturais têm dado uma enorme contribuição para a descoberta de novos compostos (CRAGG; NEWMAN, 1999; ROCHA et al., 2001).

As plantas têm uma longa história de uso no tratamento do câncer (HARTWELL, 1982). Muitos produtos obtidos da natureza com um rico potencial terapêutico têm sido explorados devido ao seu uso benéfico e efetivo contra muitos cânceres humanos, ou na estratégia de prevenção destes, ou como opção terapêutica para matar células tumorais. Como exemplo de produtos naturais que vêm sendo avaliados quanto a sua atividade quimiopreventiva estão os compostos antioxidantes, como a vitamina C, o β -caroteno e os flavonóides como a quercetina (REDDY et al., 2003). Muitos destes produtos ocorrem naturalmente como compostos não nutritivos que estão envolvidos no mecanismo de defesa contra predadores e para própria defesa do organismo vegetal. Alguns destes agentes são derivados de plantas terrestres, aonde outros são obtidos de microorganismos, e animais (CRAGG et al., 2005; BANEERJE et al., 2008).

A literatura indica que muitos produtos naturais estão disponíveis como agentes quimioterápicos contra câncer de ocorrência freqüente (REDDY et al., 2003). Desde aproximadamente 1500a.C., plantas e extratos de plantas têm sido reconhecidos como tendo atividade anticâncer, entretanto o estudo racional e organizado por agentes anticancerígenos de origem vegetal iniciou na década de 1950 que pela primeira vez associou a atividade antitumoral a constituintes puros originados de plantas. Nesse período foi feita a descoberta e desenvolvimento de alcalóides vinca, vinblastina e vincristina, e o isolamento de podofilotoxinas citotóxicas. Como resultado o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou um extensivo programa de coleção de plantas em 1960, focado principalmente nas regiões temperadas. Isto levou a descoberta de muitos novos quimioterápicos mostrando uma série de atividades citotóxicas (CASSADY; DOUROS, 1980), incluindo os taxanos e camptotecinas. Mas seu desenvolvimento em agentes ativos clinicamente foi estendido por um período de mais de 30 anos, do início da década de 1960 a 1990 (CRAGG; NEWMAN, 2005).

No processo de descoberta de drogas anticâncer, os estudos pré-clínicos no Instituto Nacional do Câncer dos estados Unidos (US-NCI) em linhagens tumorais humanas *in vitro* e seleção de testes *in vivo* ajudaram a identificar a maioria das drogas alvos. No próximo estágio de desenvolvimento de drogas, ensaios toxicológicos de produção e de formulação são realizados antes da droga iniciar uma triagem clínica (LEE, 1999).

O produto natural não precisa ser necessariamente o melhor composto para o uso farmacêutico (KINGSTON, 1996). Esses compostos podem servir como protótipo para o *design* e desenvolvimento de uma segunda geração de agentes com características melhoradas, como o aumento da eficácia e da estabilidade, a melhora das propriedades farmacocinéticas e a diminuição dos efeitos colaterais (ORTHOLAND; GANESAN, 2004). A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, por meio do uso da relação entre a estrutura e atividade biológica.

Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de uma dieta a base de plantas é altamente associado com a redução dos riscos de desenvolvimento de certos tipos de câncer (BLOCK et al., 1992, REDDY et al., 2003). Isto pode ser devido ao fato que as plantas contêm numerosos componentes ativos fisiologicamente, ou fitoquímicos, que podem alterar a via bioquímica associada com a iniciação, promoção, ou progressão do câncer (BOLAND et al., 1992; STEINMETZ; POTTER, 1996). O Resveratrol, encontrado naturalmente em plantas reduz o crescimento de células cancerígenas e a metástase (KIMURA; OKUDA, 2000), e é capaz de inibir a angiogênese (KOZUKI et al., 2001). Vale ressaltar que alguns dos fitoquímicos que estão sendo intensivamente estudados pela sua função na quimioprevenção do câncer são as lectinas. (ABDULAEV; DE MEJÍA, 1997). Lectinas de plantas são um grupo de glicoproteínas ativas biologicamente que têm mostrado possuir atividade quimiopreventiva *in vitro*, *in vivo*, e em caso de estudos em humanos (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005).

1.4.1 Lectinas vegetais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que têm especificidade por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos, podendo ser encontradas em quase todos os organismos, incluindo plantas, vertebrados, invertebrados, bactéria e vírus (PEUMMANS; VAN DAMME, 1996). A história da pesquisa com lectinas ou “lectinologia” iniciou em 1888, quando Hermann Stillmark, um estudante de doutorado da Universidade de Dorpat na Estônia, uma das mais antigas universidades da Rússia czarista, descobriu que extratos de *Ricinus comuni* causavam aglutinação de eritrócitos, e mostrou que o ingrediente ativo era uma proteína denominada por ele de ricina. A palavra aglutinina foi então

largamente usada para descrever moléculas e extratos que causam agrupamento ou aglutinação de eritrócitos e outras células. Foi somente em 1954 que o termo lectina foi introduzido por Boyd e Shapleigh para enfatizar a habilidade exibida por algumas aglutininas de plantas em discriminar eritrócitos do grupo sanguíneo ABO, devido às reações com os resíduos de açúcar expostos (BIES et al., 2004; HARTLEY et al., 2004).

A moderna era da lectnologia teve início no começo dos anos 1960's com duas grandes descobertas por Peter C. Nowell (1960) que estabeleceu que a lectina de *Phaseolus vulgaris* conhecida como fitohemaglutinina (PHA), é mitogênica, pois possui a capacidade de estimular linfócitos a entrar em mitose, assim como a lectina de ConA também apresentava a mesma atividade mitogênica, mas diferentemente de PHA essa atividade podia ser inibida por pequenas concentrações de monossacarídeos, por exemplo a manose; A segunda descoberta foi feita por Joseph C. Aub (1963, 1965) que estabeleceu que a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) tinha habilidade de aglutinar preferencialmente células malignas (SHARON; LIS, 2004). Tais investigações propuseram evidências iniciais que alterações nos açúcares de superfície celular são associadas com o desenvolvimento do câncer e levam a suposição que a alta suscetibilidade a aglutinação por lectinas era uma propriedade compartilhada por todas as células malignas (SHARON, LIS, 2004).

O termo lectina foi redefinido com base em critérios funcionais e estruturais, sendo hoje definida como todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Por causa dessa nova definição as lectinas têm sido subdivididas em três classes: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas (Figura 1). As merolectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos e por isso são incapazes de aglutinar células por causa de sua natureza monovalente. As hololectinas são exclusivamente formadas por domínios de ligação a carboidratos, porém contém dois ou mais desses domínios, idênticos ou homólogos, elas compreendem a maioria das lectinas de plantas e se comportam como verdadeiras aglutininas. As quimerolectinas são proteínas de fusão que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado com uma atividade catalítica bem definida ou outras atividades biológicas e agem independentemente do domínio de ligação a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

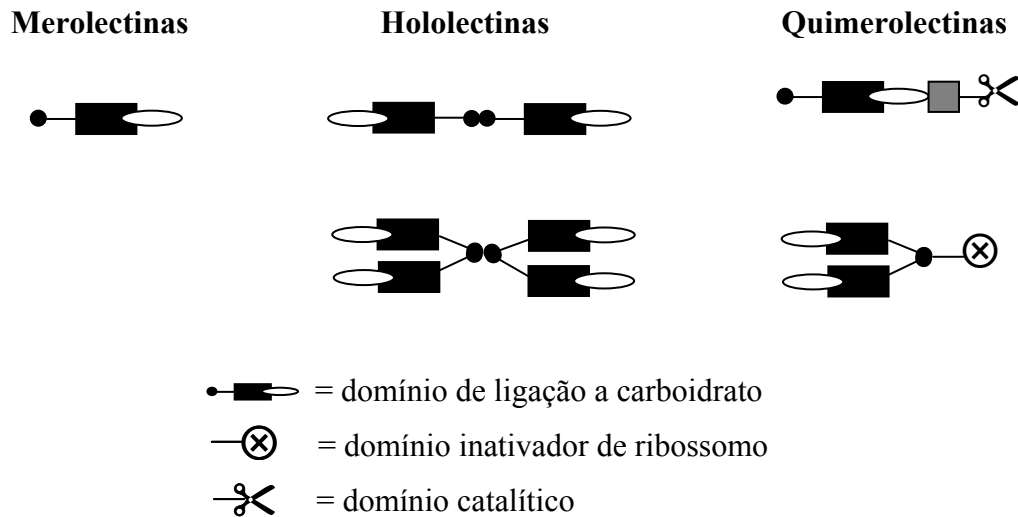


Figura 1: Representação esquemática dos três tipos de lectinas de plantas: merolectinas, hololectinas, e quimerolectinas. **Fonte:** Adaptado de PEUMANS & VAN DAMME, 1995.

A grande maioria das lectinas de plantas estão presentes em cotilédones de sementes, aonde podem ser encontradas no citoplasma ou estabelecidas em corpos protéicos, embora elas também tenha sido encontradas em raiz, caule, e folhas (MOREIRA et al., 1991). Já foi demonstrado que lectinas encontradas nas folhas tem propriedades similares daquelas obtidas de sementes da mesma planta (SPILATRO, et al., 1996).

Apesar da grande quantidade de informação sobre seqüência e especificidade de lectinas, a função fisiológica das lectinas de plantas tem sido amplamente interrogada e nem sempre respondida definitivamente (SHARON; LIS, 2004). Lectinas encontradas em raízes de leguminosas podem estar envolvidas no reconhecimento e/ou ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rizhobium spp.*, desempenhando papel no estabelecimento da simbiose (DÍAZ et al., 1989; KIJNE et al., 1992; VAN EIJDEN et al., 1995). Várias evidências indicam que as lectinas desempenham um papel de defesa na planta protegendo estas de microorganismos fitopatogênicos como bactérias e fungos, animais predadores e ainda a infecção por fungos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON; GOLDSTEIN, 1998). Lectinas obtidas de trigo, batata, sementes de amendoim, maçã e laranja têm demonstrado efeito inibitório no desenvolvimento larval de alguns insetos, no entanto somente a lectina WGA obtida de trigo, foi ativa em concentrações fisiológicas para os insetos (MURDOCK et al., 1990). Outras lectinas têm demonstrado alta toxicidade para insetos tanto em testes que adicionam a lectina em uma dieta artificial, quanto em experimentos com plantas transgênicas, que possuem genes específicos de certas lectinas sabidamente citotóxicas

(HILDER et al., 1995). Estes resultados têm incentivado nas últimas décadas triagens que avaliem a ação de lectinas como potenciais pesticidas biológicos, principalmente usando a lectina GNA ligante de manose que tem uma ampla atividade inseticida (RÜDIGER; GABIUS, 2001) para produzir plantas transgênicas contendo o gene de GNA, como batata (GATEHOUSE et al., 1997), arroz (RAO et al., 1998; TINJUANGJUN et al., 2000; MAQBOOL et al., 2001) e trigo (STOGER, et al., 1999), as quais têm apresentado uma maior resistência a pragas de insetos. Outra possível função das lectinas é a interação com enzimas e possível modificação e ativação destas enzimas, como fosfatases endógenas da própria planta (WIERZBA-ARABSKA; MORAWIECKA, 1987). Estudo com a lectina de *Cratylia floribunda* (CFL) evidenciou a presença de receptores endógenos na semente de onde é extraída a lectina e a interação lectina-receptor sendo mediada pelo sítio de ligação ao carboidrato (RAMOS et al., 2002).

1.4.1.1 Lectinas de leguminosas

Lectinas de leguminosas constituem uma grande família de proteínas homólogas, estruturalmente similares e com distintas especificidades por carboidratos. Elas são o grupo de lectinas vegetais mais bem estudado e caracterizado (SHARON, 2007). Em torno de 210 sequências de lectinas de leguminosas são conhecidas atualmente, sendo todas homólogas (CHANDRA et al., 2006). A lectina de *Canavalia ensiformis* ou concanavalina (ConA), foi a primeira lectina que teve sua estrutura tridimensional resolvida (REEKE et al., 1975) e é até agora a melhor caracterizada dentre as lectinas de leguminosa (SANZ-APARÍCIO, et al., 1997). Apesar de terem essencialmente a mesma estrutura terciária, as lectinas de leguminosas exibem uma considerável diversidade no modo que seus monômeros se oligomerizam em dímeros e tetrâmeros com pequenas alterações na sequência de aminoácidos (CHANDRA et al., 2001; SRINIVAS et al., 2001). A reunião tetramérica de lectinas obtidas de sementes da subtribo Diocleinae, gênero *Cratylia* e *Canavalia* envolve associações cruzadas de lados posteriores de dois dímeros por alinhamento antiparalelo de suas folhas-beta planas (DEL SOL, et al., 2007) (Figura 2). Diferentemente das similaridades nas sequências destas moléculas, o modo como essas subunidades se associam para formar os dímeros e tetrâmeros é bastante diverso. Cada monômero contém sítios de ligação íons

metálicos bivalentes que são essenciais para o correto dobramento do arranjo interno do sítio de ligação a carboidrato (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

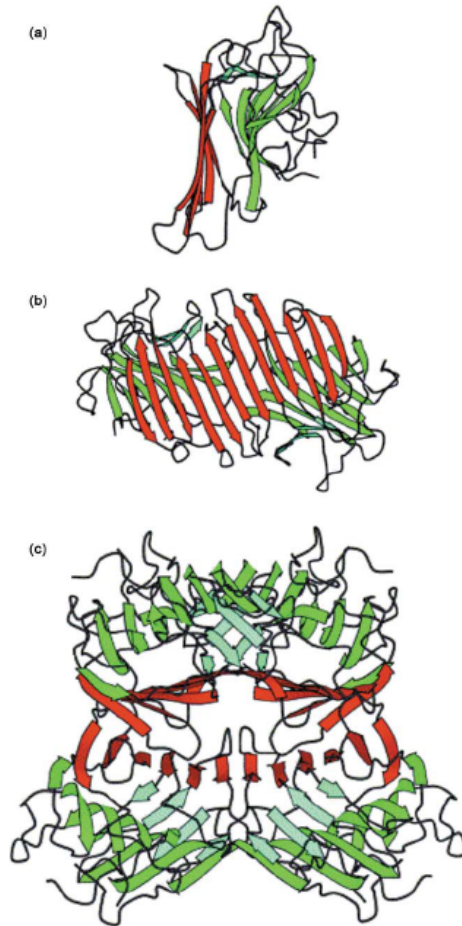


Figura 2: Estrutura terciária representativa de um monômero de uma lectina de leguminosa (a); Dimerização em ConA (b); Tetramerização em ConA. **Fonte:** SRINIVAS et al., 2001.

As estruturas quaternárias de lectinas Diocleinae sofrem influência do pH e exibem equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al., 1999), no entanto, somente a forma tetravalente é capaz de interagir com receptores na membrana celular induzindo uma variedade de processos de transdução de sinal. A taxa entre espécies divalentes e tetravalentes junto com alterações na orientação relativa dos sítios de ligação a carboidratos na estrutura quaternária de lectinas homólogas tem sido uma hipótese que contribui para as diferentes atividades biológicas e potências das lectinas Diocleinae de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* (SANS-APARÍCIO et al., 1997; CALVETE et al., 1999).

1.2.2 Atividade antitumoral de lectinas vegetais

Como dito anteriormente as lectinas têm sido consideradas substâncias tóxicas para células e animais, principalmente por causa do seu potencial aglutinante em eritrócitos e outras células. No entanto as lectinas vegetais também têm mostrado possuir atividade antitumoral e atividade anticarcinogênica (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). Os primeiros estudos da atividade antitumoral de lectinas vegetais foram publicadas em 1970 por Shoham e colaboradores, que mostraram que ConA tinha um efeito inibitório no crescimento de diferentes linhagens de células transformadas e não tinham efeito no crescimento de células normais 3T3 de hamster (ABDULLAEV; DE MEJÍA, 1997). Subseqüentes estudos foram realizados por muitos pesquisadores que também demonstraram que as lectinas vegetais inibiam o crescimento de diferentes células tumorais *in vitro*, mas não tinham efeito significativo no crescimento de células normais (ROBINSON; MEKORI, 1971; REFSNES et al., 1974; NACHBAR et al., 1976; FODSTAD; PIHL, 1978, 1980). Esses autores sugeriram que a diferença na estrutura da superfície de membrana entre células normais e transformadas é responsável pelos diferentes efeitos tóxicos de lectinas vegetais em células malignas e não em células normais (ABDULLAEV; DE MEJÍA, 1997).

Foi mostrado que animais injetados intraperitonealmente com células tumorais ascíticas de Krebs II e submetidos a uma dieta com a fitohemaglutinina (PHA), desenvolveram tumores mais lentamente do que os animais com a dieta controle (PRYME et al., 1994a,b). Mukhopadhyay e colaboradores (1994) examinaram que animais submetidos primeiramente a uma dieta restrita e infectados com células de linfoma ascítico murino, tinham os níveis de vitamina A e E reduzidos, e que a aglutinina de soja SBA adicionada posteriormente na dieta desses animais restaurava os níveis normais de vitaminas, sugerindo que a lectinas podiam estar atuando ativando o sistema imune dos hospedeiro (ABDULLAEV; DE MEJÍA, 1997).

Efeitos tumorais de lectinas de plantas contra diferentes células malignas foram também demonstrados usando algumas técnicas tais como, o ensaio colorimétrico com MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio), microscopia óptica e citometria de fluxo. A aglutinina de *Griffonia simplicifolia* (GSA) e WGA induzem apoptose em várias células tumorais murinas (KIM et al., 1993). ConA, PHA e PA-I (lectina de *Pseudomonas aeruginosa*) tiveram um efeito inibitório no crescimento de células de linfoma de baço murino (LEIBOVICI et al., 1986), PHA e lectinas mistetloe (ML-I, -II e -III) tiveram efeitos tóxicos

em células cancerígenas humanas (MOLT-4, U937) (GABIUS et al., 1992; JANSSEN et al., 1993; SCHUMACHER et al., 1994, 1995a,b].

As lectinas ML-I, -II, III, têm sido amplamente estudadas, demonstrando atividade tóxica em várias linhagens cancerígenas (JANSSEN et al., 1993; BÜSSING et al., 1996; BÜSSING et al., 1999; KIM et al., 2000; KIM et al., 2001; LYU et al., 2001), e extratos desta planta tem sido frequentemente usado no tratamento complementar do câncer na Europa há mais de 80 anos (KIENLE et al., 2003). Estudos de fase I com a lectina ML-I indicam uma boa tolerabilidade desta lectina em altas concentrações administradas intravenosamente (SCHOFFSKI et al., 2004). Outros ensaios feitos com suplementação da lectina ML-I na dieta de animais transplantados com tumor subcutâneo NHL, demonstraram diminuição da massa tumoral, e aumento da resposta imune nos animais (PRYME et al., 2004). Dados recentes obtidos com extratos de *viscum album* (HELIXOR[®]-P) e (HELIXOR[®]-A) ricos em lectinas, em animais inoculados com tumor, demonstraram que houve um aumento significativo no tempo de sobrevida destes animais (SEIFERT et al., 2008).

Lectinas de leguminosas, *Canavalia brasiliensis* (Conbr), *Dioclea grandiflora* (Dga), *Pisum arvense* (PAA) e ConA induzem a produção de óxido nítrico que pode estar envolvido no efeito antitumoral destas moléculas (ANDRADE et al., 1999). A lectina ConA, umas das mais estudadas dentre as leguminosas, é bastante conhecida pela sua atividade mitogênica de células-T e por serem citotóxicas para as células de fibroblasto FGH (LEIST; WENDEL, 1996). O principal mecanismo de ação de ConA é indução de apoptose nas células tumorais (KULKARNI et al., 1998; SUEN et al., 2000; LIU et al., 2009) No entanto, estudos recentes realizados por Chang e colaboradores (2007) com ConA em linhagens celulares de hepatoma (ML-1_{4a}, CT-26, Huh-7 e HepG2) demonstraram que o principal mecanismo de morte nestas células foi indução de autofagia, com CI₅₀ variando em torno de 20µg/mL. O mesmo grupo estudou ainda o efeito de ConA no tumor de fígado, em animais inoculados com tumor, e observaram que em doses de 7,5mg/kg administradas intravenosamente, houve inibição da formação de nódulos tumorais, a sobrevivência dos animais foi aumentada de 40 a 70 dias, 30% dos animais foram completamente curados (CHANG et al., 2007).

Estudos realizados com a lectina de *Cratylia mollis* (Cra) encapsulada em lipossomos, e administrada intraperitonealmente em doses de 7mg/kg por dia, em camundongos SWISS, demonstrou um aumento da atividade antitumoral destas moléculas contra Sarcoma 180, e preveniram a citotoxicidade destas moléculas no fígado e rins (ANDRADE et al., 2004).

Ensaio de citotoxicidade basal com outras lectinas do grupo das leguminosas como Conbr, CFL (lectina de *Cratylia floribunda*) e EVL (lectina de *Eythrina velutina*), realizados

em nosso laboratório, mostraram que essas lectinas foram tóxicas para linhagem de células tumorais J774 murina sem, no entanto, ter efeito sobre células macrofágicas peritoneais de camundongos SWISS, demonstrando que estas moléculas foram mais efetivas para linhagens cancerígenas (FAHEINA, 2006).

As lectinas têm um grande potencial no tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças crônicas como o câncer. Pesquisas adicionais, incluindo triagens clínicas, mecanismo de ação em nível molecular, e relação estrutura-função, podem ajudar a elucidar os efeitos terapêuticos, benefícios nutricionais e conseqüências tóxicas ocasionadas pelo tratamento com estas moléculas.

1.3 Citotoxicidade

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo* em diversas espécies animais. Essas técnicas de bioensaio vão avaliar e definir a concentração de uma substância que seja capaz de produzir uma resposta biológica. Um dos tipos de medida de toxicidade é a DL₅₀ (dose letal para 50% do grupo de animais), outro tipo de avaliação de toxicidade é a CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), cuja substância é adicionada *in vitro*, num amplo espectro de concentrações que forneça uma faixa de inibição de 0 a 100%. Assim, a ligação das substâncias aos seus receptores em células e tecidos pode ser medida diretamente e exposta como uma curva concentração-resposta (RANG et al., 2004).

Citotoxicidade é considerada primariamente ser o potencial de um composto a induzir morte celular. Testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto a causar morte celular como conseqüência de danos às funções básicas celulares (EISENBRAND, 2002).

A citotoxicidade tem duas principais aplicabilidades, aonde uma delas tem uma vertente negativa, como por exemplo, a análise da poluição de uma água doméstica, ou a qualidade de cosméticos e fármacos, e outra aonde a toxicidade tem uma implicação positiva, por exemplo, no desenvolvimento de drogas anticancerígenas (FRESHNEY, 2001).

O uso de métodos toxicológicos *in vitro* na farmacologia tem sido muito abrangente, por exemplo, para obter dados preliminares da potencialidade de agentes anticancerígenos

contra várias células tumorais e estabelecer o perfil de ligação de diversas moléculas a receptores. No entanto dados complementares *in vivo* são frequentemente necessários para obter um entendimento mais completo do perfil farmacológico da substância (SNODIN, 2002).

Os efeitos tóxicos nem sempre resultam em morte celular, ao menos não imediatamente, e as células podem ter alterações metabólicas, ou alterações no ciclo celular sem nenhuma diminuição da viabilidade celular aparente. Este tipo de resposta é denominada citostática e usualmente reversível, resultando de deprivação de nutrientes ou fator de crescimento, ou presença de um regulador negativo de crescimento. Mas pode ser também irreversível, por exemplo, quando as células entram em apoptose (FRESHNEY, 2001).

A cultura de células foi introduzida como um método para estudar o comportamento de células animais sem a interferência de variações sistêmicas, como homeostase normal e estresse experimental, que poderia surgir no animal. A cultura pode ser adaptada para determinar efeitos de curto e longo prazo, além de propiciar condições laboratoriais específicas, além de ser reproduzível de forma rápida, barata e sem limitações éticas (FRESHNEY, 2001; OYAMA, 2003). Ultimamente, um dos principais objetivos dos sistemas *in vitro* tem sido a reprodução das características originais do tecido, e sua interação célula-célula, a fim de simular, tanto quando possível, o ambiente real *in vivo*. Tal objetivo caracteriza uma vantagem bem conhecida dos modelos *in vitro*, que consiste na possibilidade de manter em cultura, células derivadas de tecidos humanos, auxiliando, portanto, na geração de dados compreensíveis e confiáveis para uma avaliação toxicológica (ZUCCO et al., 2004).

Os sistemas celulares mais empregados na toxicologia *in vitro* incluem: culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células tronco, células em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas de diferentes tipos celulares, culturas tridimensionais, fatias de tecido e sistemas de barreira (ZUCCO et al., 2004).

Muitos métodos de análise podem ser usados para medir o nível de citotoxicidade celular. As análises por exclusão e captação de corantes em células, atividade enzimática liberada de células e uma redução colorimétrica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em células têm sido amplamente utilizados para avaliar a citotoxicidade. O azul de Tripán e corantes fluorescentes, incluindo iodeto de propídeo, são úteis porque são excluídos de células viáveis com membrana celular funcional, mas penetra em membranas danificadas por apoptose, sugerindo que tais análises são apropriadas para coloração de células apoptóticas (ERDAL et al., 2005; KIM et al., 2009; RAYMOND et al., 2003). Ao contrário, o corante vermelho neutro cora os lisossomos de células viáveis

(FREUND et al., 1988). MTT entra nas células via endocitose e a redução do MTT para um formazan insolúvel colorido ocorre na mitocôndria ativa em células viáveis, assim como fora da mitocôndria em certos casos (BURDON et al., 1993; LIU et al., 1997). Esta análise tem sido usada com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade (KIM et al., 2009). A análise do conteúdo macromolecular total também é uma técnica bem empregada para testes de citotoxicidade (FORTUNATI; BIANCHI, 1990; MELO et al, 2003; SILVEIRA, 2007).

Estudos de mecanismos de morte celular realizados com moléculas-teste são usualmente realizados pelo citômetro de fluxo, um equipamento que permite separar células ativadas por fluorescência, oferecendo a possibilidade de análise de multiparâmetros de um alto número de células dentro de um curto período de tempo (ALBERTS et al., 2004; TUSCHL, et al., 2004). Vários protocolos podem ser utilizados em técnicas de citometria de fluxo, como por exemplo, análise do ciclo celular e apoptose por coloração com iodeto de propídeo, apoptose por ligação de Anexina V, para detecção de externalização de fosfatidilserina, alteração do potencial de membrana mitocondrial com o marcador fluorescente Rodamina-123 ou JC-1 (TUSCHL et al., 2004).

A base principal para demonstração da aplicabilidade de testes *in vitro* é a modelagem *in vitro-in vivo*, pelo uso de uma correlação estatística entre os valores de CI_{50} molar e concentrações molares sanguíneas humanas CL_{50} (50% da concentração letal). Os resultados obtidos demonstraram utilidade dos valores de CL_{50} humanos para avaliação *in vitro-in vivo* da predição de análises de citotoxicidade basal para determinação da toxicidade sistêmica aguda humana. Existe um projeto nos Estados Unidos (desenvolvido desde janeiro de 2005), denominado ACuteTox, cujo objetivo é desenvolver uma simples e robusta estratégia em testes *in vitro* para predição da toxicidade sistêmica aguda humana, a qual pode substituir os testes em animais. (SJÖSTRÖM et al., 2008).

1.4 Morte celular

Morte celular é agora conhecida por uma variedade de mecanismos bioquímicos. De acordo com Galluzi e colaboradores (2007), a morte celular pode ser classificada em quatro diferentes tipos, baseado nas características morfológicas: apoptose (Tipo I), autofagia (Tipo II), necrose (oncoses, Tipo III), e catástrofe mitótica (GREEN; EVAN, 2002; DANIAL;

KORSMEYE, 2004; REED, 2006). As alterações morfológicas acompanhada da apoptose tem sido descrita em detalhes. A apoptose é manifestada por redução do volume do núcleo e citoplasma (encolhimento celular), a necrose é evidenciada por aumento citoplasmático, ruptura da membrana plasmática, inchaço das organelas citoplasmáticas (particularmente mitocôndria), e alguma condensação da cromatina nuclear (GALLUZZI et al., 2007; TAATJES, et al., 2008). Autofagia é distinguida pelo acúmulo de vacúolos citoplasmáticos e membranas, e a catástrofe mitótica por micronucleação e multinucleação, gerada por falhas nos pontos de checagem no ciclo celular, levando a uma segregação cromossômica aberrante (KROEMER et al., 2007; TAATJES, et al., 2008).

A apoptose, conhecida como uma das formas de morte celular programada, ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento e como um mecanismo homeostático para manter a população de células e tecidos. A apoptose também ocorre como um mecanismo de defesa durante as reações imunes ou quando células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (NORBURY; HICKSON, 2001). Embora exista uma ampla variedade de estímulos e condições, ambas fisiológicas e patológicas, que podem desencadear a apoptose, nem todas as células necessariamente morrem em resposta ao mesmo estímulo. Irradiação ou drogas usadas para quimioterapia do câncer resultam em dano ao DNA em algumas células, as quais podem levar a morte apoptótica por uma via p53-dependente (KROEMER et al., 2007).

Kerr e colaboradores (1972) foram os primeiros pesquisadores que descreveram a apoptose, que foi definida pela aparência morfológica das células, incluindo enrugamento da membrana (“blebbing”), condensação da cromatina, fragmentação nuclear e diminuição do tamanho celular. As características bioquímicas, associadas com a apoptose, incluem clivagem do DNA internucleossomal, externalização da fosfatidilserina e clivagem proteolítica de substratos intracelulares (MARTIN et al., 1995). Como resultado das mudanças na membrana plasmática, as células apoptóticas são rapidamente fagocitadas antes do extravasamento do conteúdo intracelular e sem indução de uma resposta inflamatória.

A apoptose é um mecanismo predeterminado geneticamente que pode ser promovida por muitas vias moleculares. O componente central da maquinaria apoptótica é uma família de proteases denominadas caspases organizada em uma cascata proteolítica ramificada (HIRATA et al., 1998; KOLENKO ET AL., 2000). As caspases são sintetizadas como zimogênios, ou pró-enzimas inativas, e são ativadas por outras pró-caspases: encontradas solúveis no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células (ELMORE, 2007). Esta cascata proteolítica na qual uma caspase pode ativar outra

caspase amplifica a via de sinalização e isto leva a rápida morte celular (ELMORE, 2007). Dez principais caspases têm sido identificadas e amplamente categorizadas em iniciadoras (caspase-2,-8,-9,-10), efetoras ou executoras (caspase-3,-6,-7) e caspases inflamatórias (caspase-1,-4,-5) (COHEN, 1997; RAI et al., 2005).

As principais vias apoptóticas são as denominadas: via extrínseca e via intrínseca. Na via extrínseca (também conhecida como via receptor de morte), a apoptose é induzida pela ativação de um ligante de receptor de morte a superfície celular. Os receptores de morte incluem o receptor-1 de fator de necrose tumoral (TNF), CD95/Fas, assim como os receptores 1 e 2 do ligante indutor de apoptose TRAIL. A ativação destes receptores de morte causa o recrutamento e oligomerização das moléculas adaptadoras FADD (Fas-associating death domain-containing protein) (KRUEGER et al., 2003). FADD oligomerizado se liga as caspases iniciadoras 8 e 10, causando sua dimerização e ativação por clivagem nos resíduos de aspartato (Figura 3) (DEBATIN; KRAMMER, 2004; KROEMER et al., 2007). A caspase 8 ativada pode ativar diretamente a procaspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, um membro da família Bcl-2, para formar Bid truncado ou tBid a qual subsequentemente se localiza na mitocôndria aonde promove oligomerização de outros membros da família Bcl-2, que são proteínas que regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial, como Bax, o qual resulta na liberação de citocromo *c* e da proteína Smac/DIABLO, da mitocôndria (VERHAGEN et al., 2000; ZIMMERNANN et al., 2001).

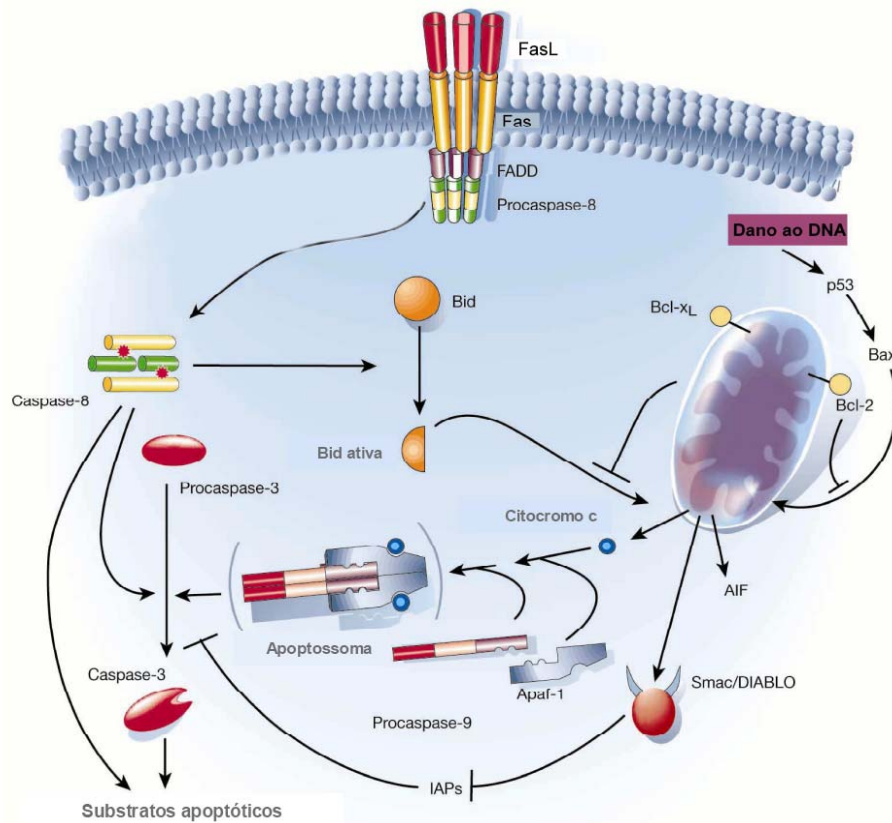


Figura 3: As duas principais vias apoptóticas. Na via mitocondrial o estresse celular induz a translocação de membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos do citosol para a mitocôndria, onde induzem a saída do citocromo c. O citocromo c no citosol promove a ativação do Apaf-1 e da pró-caspase 9, formando o apoptossoma, o qual ativa a pró-caspase 3, induzindo à apoptose. O citocromo c e o Smac/DIABLO são liberados da mitocôndria após estímulos apoptóticos. Enquanto o citocromo c ativa o Apaf-1, o Smac/DIABLO inibe a ligação das caspases as IAPs (Proteínas Inibidoras da Apoptose). A segunda via é dependente do receptor. A ativação da pró-caspase 8 pela ligação ao receptor de morte está ilustrada. O Fas-ligante (FasL) associa-se a FADD na região intracelular. Este complexo ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a pró-caspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c. Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000.

Já na via intrínseca, também chamada via mitocondrial, vários estímulos podem produzir sinais intracelulares que causam alterações no interior da mitocôndria e resultam na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MTP), diminuição do potencial transmembrana mitocondrial e liberação de duas proteínas pró-apoptóticas, citocromo *c* e Smac/DIABLO (SAELENs et al., 2004; GARRIDO et al., 2005; ELMORE, 2007). Estas proteínas ativam a via mitocondrial dependente de caspase. O citocromo *c* se liga e ativa a proteína pró-apoptótica, Apaf-1, assim como a pró-caspase 9, formando o “apoptossoma” (CHINNAIYAN, 1999; HILL et al., 2004). O apoptossoma vai então clivar a pró-caspase 3

ativando-a. A Smac/DIABLO promove a apoptose por inibição das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose).

Um segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas, AIF, endonuclease G e CAD (DNase ativada por caspase) são liberadas da mitocôndria durante a apoptose, mas este evento é tardio e ocorre quando a célula já está condicionada a morrer. AIF é translocada para o núcleo e causa fragmentação do DNA em 50-300kb e condensação da cromatina nuclear periférica (JOZA et al., 2001). A endonuclease G também é translocada para o núcleo e vai clivar acromatina para produzir fragmentos do DNA oligonucleossomal (LI et al., 2001). CAD é subsequentemente liberada da mitocôndria e translocada para o núcleo após clivagem de ICAD (inibidor de CAD) pela caspase-3 ativa, o que leva a fragmentação do DNA oligonucleossomal, sendo um processo mais avançado que aumenta a condensação da cromatina (Figura 4) (ENARI et al., 1998; NAGATA, 2000).

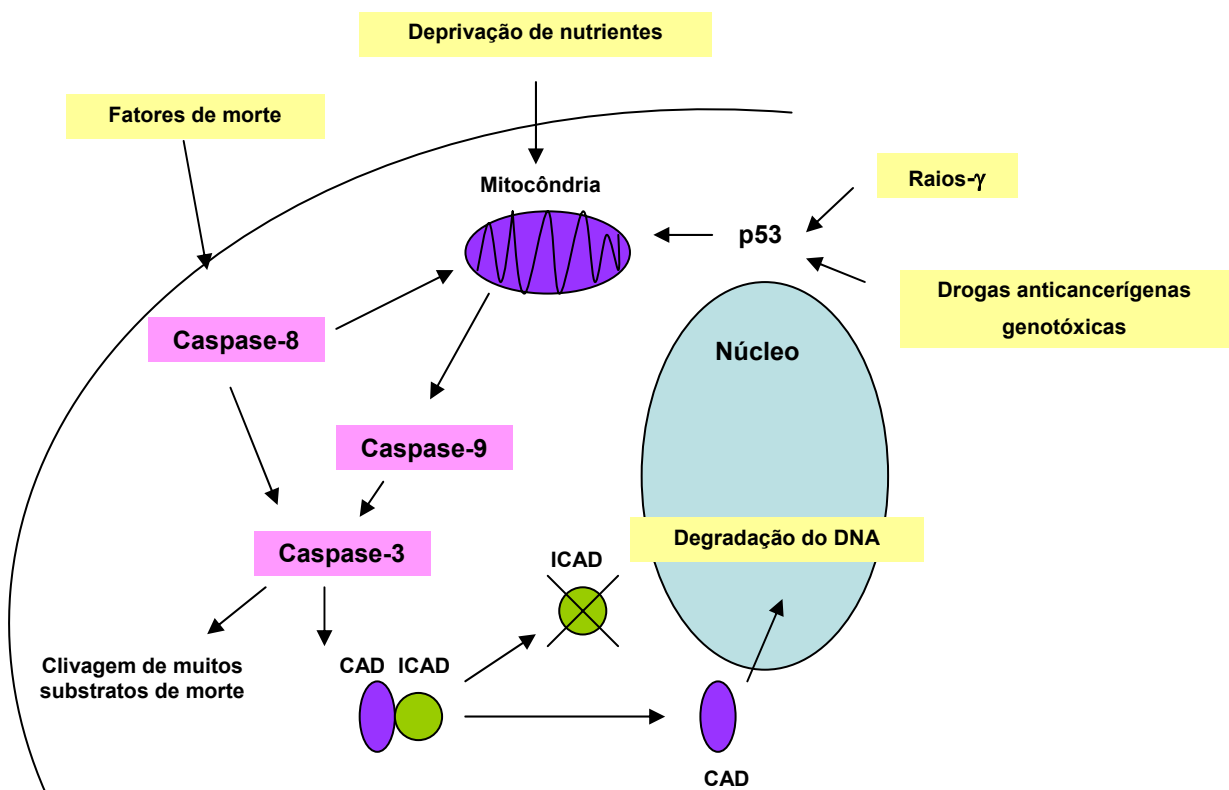


Figura 4: Fragmentação do DNA mediada por CAD. Quando CAD é sintetizado, ICAD ajuda no seu correto e produtivo dobramento. Por isto CAD existe como uma enzima inativa complexada com ICAD em células em proliferação. Vários sinais apoptóticos, como fatores de morte ou agentes genotóxicos ativam a cascata de caspases. A caspase 3 cliva ICAD em duas posições e inativa sua atividade inibitória de CAD. CAD liberado de ICAD degrada o DNA cromossomal. **Fonte:** Adaptado de NAGATA, 2000.

O controle e regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorrem por membros da família de proteínas Bcl-2 (CORY; ADAMS, 2002). A proteína supressora tumoral p53 tem uma função crítica na regulação das proteínas da família Bcl-2, embora o exato mecanismo ainda não tenha sido elucidado.

De fato a supressão da apoptose durante a carcinogênese é a idéia central no desenvolvimento e progressão de muitos cânceres (KERR et al., 1994), havendo uma variedade de mecanismos que as células tumorais usam para suprimir a apoptose (KROEMER et al., 2007). Muitas moléculas que criam barreiras para que ocorra a morte celular dentro de tumores têm sido identificadas e utilizadas como alvo para a descoberta de drogas, cujo objetivo é restaurar as vias naturais para a renovação celular e induzir a autodestruição das células cancerígenas (REED, 2003).

Considerando a importante função de compostos naturais com atividade antitumoral que atuam induzindo a apoptose do tumor, o presente trabalho visa investigar os mecanismos de morte celular, causados por algumas lectinas vegetais sobre cultura de células normais e tumorais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

❖ Avaliar a citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL frente a células normais e linhagens de células tumorais, bem como identificar o tipo de morte celular induzida por estas moléculas.

2.2 Específicos

❖ Determinar a atividade citotóxica das lectinas em macrófagos peritoneais e em linhagens tumorais murino, J774, e humanas, MCF-7, MOLT-4 e HL-60 usando as técnicas de MTT e CAN;

❖ Determinar o potencial genotóxico *in vitro* das lectinas nas linhagens MCF-7, MOLT-4 e HL-60;

❖ Avaliar as possíveis alterações morfológicas celulares induzidas pelas lectinas;

❖ Avaliar o efeito das lectinas sobre a integridade de membrana celular;

❖ Avaliar o efeito das lectinas sobre a fragmentação do DNA;

❖ Avaliar o efeito das lectinas sobre o potencial de membrana mitocondrial.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- ❖ Agitador de placa MS1 MINISHAKER, IKA
- ❖ Autoclave, FABBE modelo 103
- ❖ Balança analítica MODELO FA2104N, CELTAC
- ❖ Banho Maria com agitação, NOVA ÉTICA
- ❖ Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini System
- ❖ Centrífuga Excelsa Baby modelo 206, FANEM
- ❖ Centrífuga refrigerada MPW Méd Instrumens
- ❖ Espectrofotômetro DU[®] 640, Beckman
- ❖ Espectrofotômetro UV1101, BIOTECH
- ❖ Estufa de secagem, FABBE
- ❖ Fluxo laminar VECO
- ❖ Fonte para eletroforese EPS 250
- ❖ Freezer -20°C FE26, ELECTROLUX
- ❖ Freezer -80°C ULT390-3-D31 REVCO
- ❖ Image Master[®] VDS, PHARMACIA BIOTECH
- ❖ Incubadora de células modelo MCO-15A, SANYO
- ❖ Leitor de ELISA BIO-RAD 550
- ❖ Leitora de ELISA ELx800, BIOTEK
- ❖ Microondas Panasonic
- ❖ Microscópio óptico de inversão Hund Wetzlar modelo 6330
- ❖ Microscópio óptico de inversão XS201, TAIMIN
- ❖ Microscópio de fluorescência OLYMPUS
- ❖ pHmetro W3B
- ❖ Refrigerador, Electrolux
- ❖ Vortex KMC-1300V VISION

3.1.2 Soluções

Tabela 1: Reagentes e soluções

Nome	Constituição	Fabricante
Ácido clorídrico 0,01N	83 µL de HCL Água destilada q.s.p. 100 mL	VETEC
Ácido tricloroacético 5%	5 g Água destilada q.s.p. 5 mL	VETEC
Agarose 1,5%	1,05 g TBE q.s.p. 70 mL	PRONADISA
Álcool etílico 70%	*	TOSCANO
Álcool etílico 90%	90 mL de etanol absoluto 10 mL de água destilada	AMRESCO
Azul de tripan 4%	0,4 g de azul de tripan PBS q.s.p. 10 mL	SIGMA
Brometo de etídeo 10mg/mL	*	AMRESCO
EDTA 0,5 M	18,61 g de EDTA 5 mL de NaOH (10M)	SIGMA
Etoposide 5 mM	2,943 mg de etoposide 1,0 mL de DMSO	SIGMA
Iodeto de propídeo 50µg/mL	5 mg PBS q.s.p. 100mL	SIGMA
MTT	5 mg de MTT PBS q.s.p. 1mL	AMRESCO
NaCl 5M	14,61 g Água destilada q.s.p. 50 mL	VETEC
NaOH 10M	20 g de NaOH Água destilada q.s.p. 50 mL	VETEC
RNAse 100mg/mL		AMRESCO
Rodamina 123	5 mg de Rodamina 123 1ml de etanol	

SDS/HCL	10 g SDS 100 mL HCL 0,01 N	SIGMA
Solução de antibióticos (Penicilina + Estreptomicina)	*	SIGMA e CULTILAB
Solução fixadora	3 Metanol : 1 Ácido acético	
Solução de neutralização	0,4M de Tris pH 7,5	
Solução de eletroforese	0,001M EDTA 0,4M de NaOH pH>13	
Soro fetal bovino Inativado (SFB)	*	CULTILAB
Proteinase K	20 mg de proteinase K 1,0 mL de TE	AMRESCO

* Soluções que foram adquiridas já preparadas pelo fabricante

Tabela 2: Meios de cultura

Nome	Constituição	Fabricante
Caldo de Tioglicolato 3%	1,5 g de caldo de tioglicolato Água destilada q.s.p. 50 mL (Solução autoclavada por 15 min a 121°C, sob 1 atm)	SIGMA
RPMI 1640	10,4 g de meio RPMI em pó 2,0 g de bicarbonato de sódio 5,9 g de HEPES 0,3 g de glutamina 5 mL de solução de antibióticos penicilina/estreptomicina Água ultra-pura q.s.p. 1000 mL	HIMEDIA VETEC AMRESCO AMRESCO CULTILAB/SIGMA

Tabela 3: Tampões

Nome	Constituição	Fabricante
Tampão de extração de DNA	10 mM Tris-HCl 0,1 M EDTA 0,5% de SDS 20 µg/ml RNase A 100 µg/ml Proteinase K	SIGMA PROMEGA SIGMA AMRESCO AMRESCO
Tampão de lise (para análise do ciclo celular)	0,1g de citrato de sódio 0,1mL de Triton-X 0,2mg de iodeto de propídeo Água destilada q.s.p. 100mL	GRUPO QUÍMICA ISO FAR SIGMA
Tampão TE (pH 8,0)	10mM de Tris-HCl 1mM de EDTA Água destilada q.s.p. 200mL	SIGMA PROMEGA
Tampão TBE 10x (pH 8,2)	0,9M de Tris-HCl 0,02M de EDTA 0,9M Ácido bórico Água destilada q.s.p. 1000mL	SIGMA PROMEGA
Salina tamponada com sais de fosfato (PBS)	3,99 g de NaCl (136,88 mM) 0,1 g de KCl (2,7 mM) 0,061 g de KH ₂ PO ₄ (0,9 mM) 0,454 g de Na ₂ HPO ₄ (6,4 mM) Água destilada q.s.p. 500 ml (Solução autoclavada por 15 min a 121°C, sob 1 atm)	VETEC VETEC VETEC MERCK

3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, para obtenção de células da cavidade peritoneal, em especial macrófagos. Esses animais foram obtidos do Biotério do LTF- Dr. George Thomas, após aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa animal-CEPA, desta Instituição, sob o número: 0706/07.

3.1.4 Células

3.1.4.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os animais, camundongos SWISS, eram elicitados, injetando 1,0 mL de caldo de tioglicolato (3%) na cavidade peritoneal do animal para promover a inflamação. Após cinco dias era realizada a eutanásia dos animais por deslocamento cervical em seguida injetava-se 8 mL de meio RPMI 1640 refrigerado, sem soro bovino fetal (SBF). Posteriormente, realizava-se uma sucção para retirada das células da cavidade peritoneal. As células foram aliquotadas em tubos tipo falcon estéreis, centrifugadas a 500 x g/5min, sendo o sobrenadante descartado. A seguir as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF. Para ajustar o número de células para os testes citotóxicos, retirava-se uma alíquota da amostra e diluía-se 10 vezes em meio RPMI incompleto em tubos de 1,5 mL juntamente com o corante azul de tripan (4%) em tampão fosfato-salina (PBS) (v/v) sendo realizada a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. A contagem das células viáveis se baseia na habilidade de uma célula com a membrana íntegra excluir o corante azul de tripan, assim, o corante só penetra nas células com membrana rompida, identificando no caso as células não-viáveis. Somente as amostras com 90% de células viáveis, foram utilizadas nos ensaios. A percentagem de células viáveis foi feita conforme seguinte equação

$$\% \text{ viabilidade celular: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ de células totais}} \times 100$$

Após obtenção das células da cavidade peritoneal desses camundongos, estas foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços e foram colocadas para aderir por 2 horas. Em seguida as drogas eram adicionadas aos poços nas concentrações desejadas.

3.1.4.2 Linhagens celulares

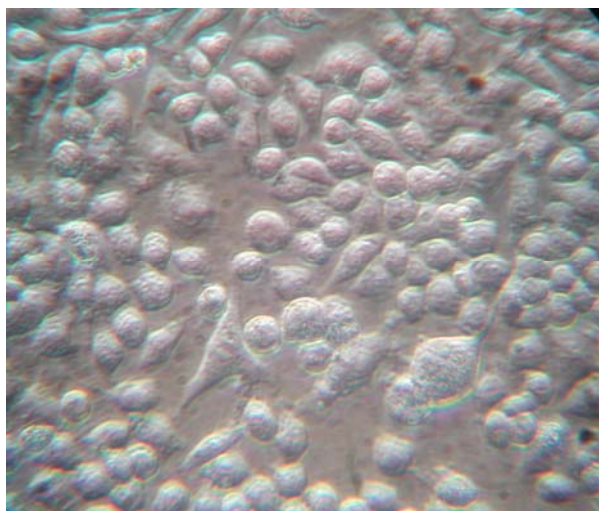
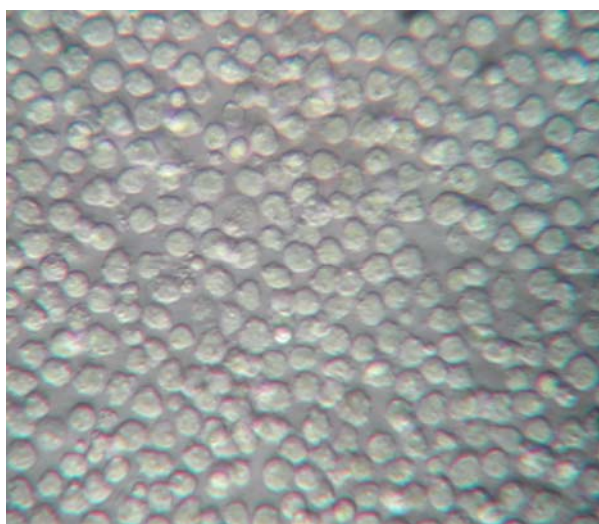
Foram utilizadas linhagens de células tumorais listadas na tabela 1, obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em frascos de cultura

utilizando meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos: penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL e suplementado com 10% de SBF nas linhagens J774 (Fig.5) e MCF-7 (Fig.6) e 20% de SBF para a linhagem HL-60 (Fig.7) e MOLT-4 (Fig.8). As células foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e em seguida incubadas com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, com auxílio de microscópio invertido, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Ao atingir 80% de confluência, era feita a tripsinização, no caso das células aderentes, retirando o sobrenadante e adicionando 1,5 mL de solução de tripsinização, por 5 min, ou até observar-se o descolamento da monocamada de células da parede do frasco. Após esse período era acrescentado 5 mL de meio RPMI com 10% de SBF para interromper a ação da tripsina. As células foram então centrifugadas a 500 x g/5min e ressuspensas em 2 mL de meio com SFB para contagem em câmara de Neubauer. Se a cultura apresentasse 90% de células viáveis eram então destinadas aos experimentos, e uma alíquota era colocada em novos frascos para cultivo. As células em suspensão, das culturas de HL-60 e MOLT-4 eram diretamente centrifugadas.

Para manter o estoque de células parte das culturas foram congeladas. As células foram removidas das garrafas por tripsinização, e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 2 mL de meio RPMI com 10% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que desidrata as células e impede que elas sejam criofraturadas pelo cristais de gelo formado. Em seguida as amostras foram adicionadas em tubos criogênicos de 1,0mL e levadas por meia hora a temperatura de -20°C, em seguida a -80°C por mais meia hora, e estocado em tambor de nitrogênio líquido.

Tabela 4 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagens	Tipo histológico do câncer	Origem
J774 (aderente)	Sarcoma macrofágico	murina
HL-60 (suspensão)	Leucemia promielocítica	humana
MCF-7 (aderente)	Carcinoma de mama	humana
MOLT-4 (suspensão)	Leucemia de células T	humana

**Figura 5:** Fotomicrografia da linhagem celular J774 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x**Figura 6:** Fotomicrografia da linhagem celular HL-60 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x

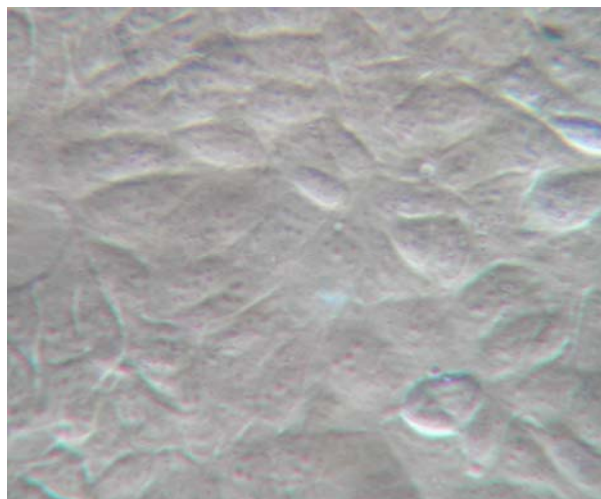


Figura 7: Fotomicrografia da linhagem celular MCF-7 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x

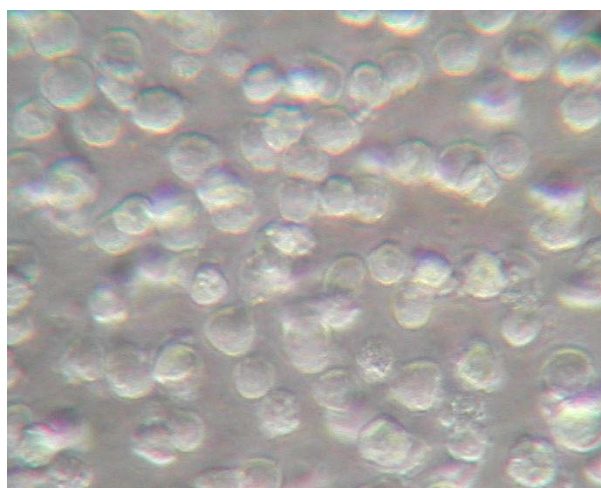


Figura 8: Fotomicrografia da linhagem celular MOLT-4 em objetiva com contraste de fase. Aumento: 400 x

3.2 Metodologia experimental

3.2.1 Lectinas

As proteínas alvo do presente estudo, Conbr e CFL foram purificadas a partir de sementes das plantas *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, todas estas pertencentes à família das leguminosas. As amostras foram cedidas, já purificadas, pelo prof^o Dr. Márcio

Viana Ramos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A lectina ConA foi obtida da Sigma, EUA.

3.2.1.1 Preparo das soluções

As lectinas foram pesadas e solubilizadas em meio RPMI sem SBF, sob agitação leve para não desnaturar as proteínas, em seguida as amostras foram filtradas em membrana (MILLIPORE, EUA) de 13mm com porosidade de 0,22µm, e aliquotadas em tubos estéreis. Para medir a concentração de proteínas da solução estoque após a filtração, retirava-se uma alíquota de 40µL de cada amostra e diluía-se 10 vezes em 360µl de água ultrapurificada estéril. Essa amostra diluída era levada para leitura em espectrofotômetro e a absorbância (A) era medida usando o comprimento de onda (λ) de 260 e 280 nm (AZEVEDO, 2003). O valor da concentração de proteínas foi dado em mg/ml pela fórmula:

$$[\text{mg/mL}] = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$$

3.2.2 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

3.2.2.1 Avaliação do efeito das lectinas sobre a morfologia celular

Células da linhagem J774, MCF-7 e MOLT-4 e foram incubadas por 24 horas com as lectinas. Após o período de incubação as placas foram levadas ao microscópio óptico invertido, utilizando objetiva com contraste de fase, observaram-se as alterações morfológicas provocadas pelas lectinas, comparadas com o controle negativo (células + meio RPMI) e com controle positivo (etoposide).

3.2.2.2 Técnica de MTT

O método MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) é um simples método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais (LIU et al., 1997). Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com os seus subprodutos, NADH e NADPH (LIU et al., 1997). Os cristais de formazan são solubilizados, formando assim um composto colorido cuja medição da densidade óptica é feita em espectrofotômetro, tipo leitora de ELISA ($\lambda = 570\text{nm}$). A intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presente na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (LIU et al., 1997; HEINRICH et al, 2005). Outros estudos têm examinado a correspondência entre os resultados obtidos durante contagem direta de células e confirmou-se que a análise com MTT é um indicador válido do número de células viáveis (KIM et al., 2009).

Procedimento experimental

As células foram incubadas após análise de viabilidade com azul de tripan ($\geq 90\%$) em placas de 96 poços por 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 numa densidade de 2×10^4 cél/poço, para as culturas aderentes (J774 e MCF-7), e 5×10^4 cél/poço para as culturas em suspensão (HL-60 e MOLT-4). Após 24 horas foram adicionadas as lectinas ConA, Conbr ou CFL, nas concentrações de 10 a $200\mu\text{g/mL}$. A análise da viabilidade foi realizada em 24 e 72 horas após adição das lectinas. Após esses períodos, o sobrenadante era parcialmente removido, seguido da adição do MTT (5mg/mL em PBS) (m/v), esperando de 3-4 horas para redução do sal e formação dos cristais de formazan que foram solubilizados com a adição de 10% de SDS/HCL $0,01\text{N}$ “overnight”, em seguida as placas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA a 570 nm .

Análise dos dados

As lectinas foram testadas em triplicata com um $n \geq 3$. Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração de lectina. Foi determinada a

CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.03. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.2.2.3 Contagem de ácidos nucleicos (CAN)

A citotoxicidade foi também avaliada usando um procedimento de contagem de ácidos nucleicos, baseado na determinação espectrofotométrica das macromoléculas totais das amostras de células em cultura. Essa técnica baseia-se na remoção da fração solúvel e solubilização da monocamada de células em uma solução básica de NaOH e leitura da densidade óptica do lisado celular a 260 nm, que é um comprimento de onda apropriado para absorvância para ácidos nucleicos e aminoácidos aromáticos (FORTUNATI; BIANCHI, 1990).

Procedimento experimental

As células foram incubadas após análise de viabilidade com azul de tripan ($\geq 90\%$) em placas de 96 poços por 24 horas na densidade de 2×10^4 cél/poço (100 μ l), para as culturas aderentes (J774 e MCF-7), e 5×10^4 cél/poço para as culturas em suspensão (HL-60 e MOLT-4). Após 24 horas foram adicionadas as lectinas ConA, Conbr ou CFL (100 μ l). A análise da viabilidade foi realizada em 24 e 72 horas após adição das lectinas. Após esse período as placas foram centrifugadas a $\times 500$ g por 5 min e retirou-se 150 μ l do sobrenadante, realizou-se lavagem com PBS, em seguida 1 lavagem com ácido tricloroacético 5% (m/v) para fixação das células, 2 lavagens com etanol gelado 90% e finalizando com a solubilização da monocamada celular com NaOH 0,5M overnight. Entre cada etapa de lavagem foram realizadas centrifugações a $\times 500$ g, por 5 min para remoção de 150 μ L do sobrenadante. Após a digestão com NaOH as amostras eram lidas em duplicata usando cubeta de quartzo e leitura da absorvância a 260 nm em espectrofotômetro. O branco da amostra foi a solução de NaOH 0,5M.

Análise dos dados

As lectinas foram testadas em triplicata com um $n \geq 3$. Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração de lectina. Foi determinada a CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) a partir de uma curva de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism, versão 4.03. Os dados foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.2.2.4 Avaliação do potencial genotóxico das lectinas - Teste do Cometa

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Olive (1989) e Singh e colaboradores (1988), o teste do cometa, também chamado de *Single-cell gel electrophoresis (SCGE)*, vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido as suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas (RIBEIRO et al., 2003), portanto, alcançou o status de um ensaio padrão em uma série de testes usados para avaliar a segurança de novos fármacos e outros compostos (COLLINS, 2001).

A análise do teste do cometa alcalino avalia a extensão de quebra ao DNA após exposição das células a substâncias com potencial genotóxico. Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa podem ser de correção ou levar a apoptose. Assim sendo, este teste pode ser utilizado em estudos de análise de reparo do DNA (RIBEIRO et al., 2003).

Procedimento experimental

Neste ensaio foram usadas células da linhagem MCF-7 de tumor de mama e células da linhagem MOLT-4. As células foram incubadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL, nas

concentrações 5, 25 e 50µg/mL por 24h a 37°C a 5% de CO₂. Ao término da incubação em cada cultura, foi retirada uma alíquota de 20µL de células, a qual foi adicionada a 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) para preparo das lâminas. Para estes testes as lâminas foram preparadas em duplicata, com dois experimentos independentes.

Preparação das lâminas e lise celular

As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão convencional (0,5%) a 60°C e mantidas a temperatura ambiente por 24h até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão, a qual foi preparada previamente. Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24x60mm) para uniformizar a distribuição das células e mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Após solidificação da agarose, a lamínula foi gentilmente removida e a lâmina mergulhada em solução de lise (5M NaCl, 100mM de EDTA, 10mM de Tris, 1% de Lauroyl sarcosine, 1% de Triton X-100, 10% de DMSO, pH 10) a 4°C e protegida da luz por no mínimo 1h antes da corrida de eletroforese.

Neutralização e Eletroforese

Depois de removidas da solução de lise, as lâminas foram neutralizadas por 15min em solução de neutralização (0,4M de Tris, pH 7,5) e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. A cuba foi mantida em “banho de gelo” para a manutenção da temperatura em torno de 4°C, tendo sido acrescentada a solução de eletroforese (1mM de EDTA, 300mM de NaOH, pH > 13) até completa imersão das lâminas.

Antes de iniciar a corrida de eletroforese, as lâminas ficaram em repouso por 20 min, para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade, usando 25V (Volts) e corrente de 300mA por 20min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 min, a fim de neutralizar a alcalinidade.

Fixação e Coloração

As lâminas foram fixadas em etanol 100%. Posteriormente, foi adicionado 50µL de solução de brometo de etídeo (20µg/mL), em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

Escore das lâminas

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 9). Foram contados 100 cometas por lâminas (LOVELL et al., 1999) e classificados dentre as cinco categorias (0,1,2,3 e 4) que representam a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula. 0 = sem danos (<5%); 1= baixo nível de danos (5-20%); 2 = moderado nível de danos (20-40%); 3= alto nível de danos (40-95%); 4= dano total (95%).

Para quantificação do dano no DNA, o escore total para 100 nucleóides analisados variou de 0 (dano mínimo=nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo= todas as células com dano 4) sendo estimada a partir da fórmula:

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

ID= índice de dano

ua= unidade arbitrária

N1, N2, N3, N4= cometas nas classes 1, 2, 3, 4, respectivamente

S= número de cometas analisados inclusive incluindo os da classe 0

Essa análise possibilitou o cálculo da frequência de dano (FD), que representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

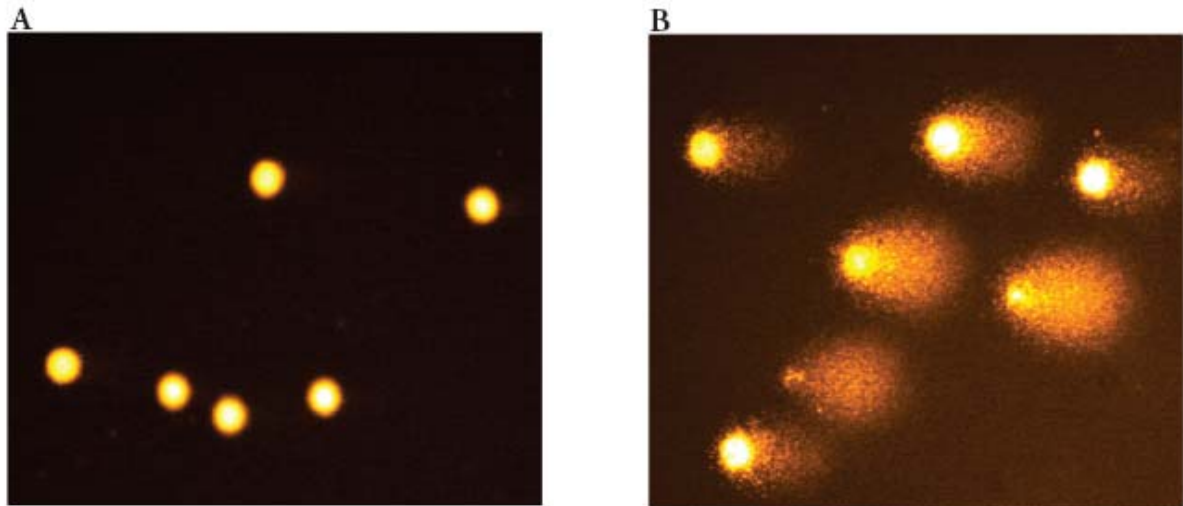


Figura 9: Imagens representativas do teste do cometa. Em A vemos células sem danos; e em B vemos os vários tipos de caudas visualizadas no teste do cometa. Fonte: WONG, 2005

3.2.2 *Análise morfológica - Coloração Diferencial por Brometo de etídeo (BE)/Laranja de acridina (LA)*

Esse método de coloração pelo brometo de etídeo e laranja de acridina permite diferenciar as células viáveis daquelas em processo de morte celular por apoptose ou necrose, por meio da coloração diferencial em análise de fluorescência (Figura 10) (McGAHON et al., 1995). O corante laranja de acridina é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA emitindo uma fluorescência verde no núcleo celular. Já o brometo de etídeo é incorporado principalmente por células não-viáveis (com perda da integridade da membrana) intercalando-se ao DNA e emitindo fluorescência laranja, além de ligar-se fracamente ao RNA, revelando coloração avermelhada.

As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo e citoplasma uniformemente corados de verde. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes presentes no núcleo (condensação de cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente é possível observar alterações de membrana e a formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme e não apresentam formação de corpúsculos apoptóticos. É possível que algumas células com morfologia de apoptose, estejam coradas em laranja por estarem em processo de apoptose tardia quando se tornam permeáveis ao brometo de etídeo anteriormente retidos pela membrana.

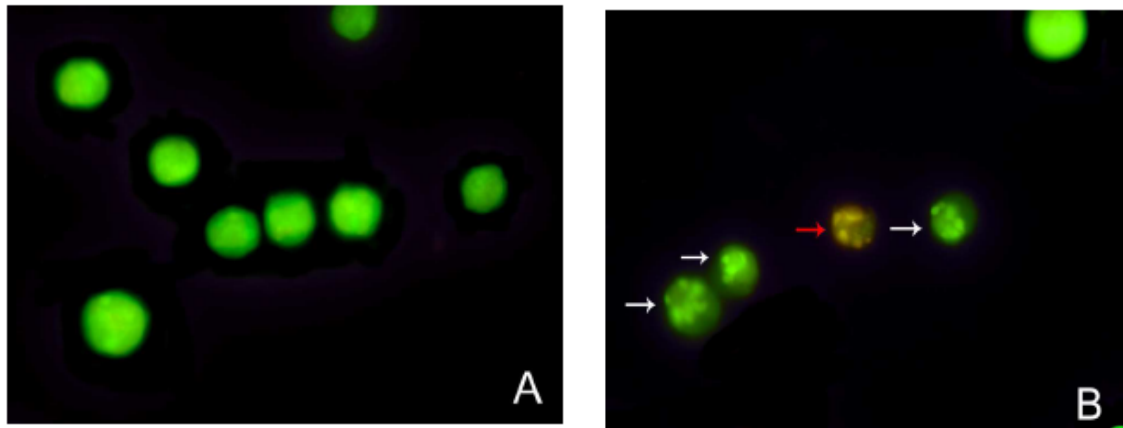


Figura 10: Células coradas com Brometo de etídeo e laranja de acridina. Em A observamos células viáveis coradas pela laranja de acridina. Em B visualizamos células apoptóticas (seta brancas) mostrando o núcleo fragmentado, e células necróticas coradas em laranja pelo brometo de etídeo (seta vermelha).

Procedimento experimental:

Inicialmente, 2×10^5 cél/poço para MCF-7 e 5×10^5 cél/poço para MOLT-4 foram tratadas com as lectinas, ConA, Conbr ou CFL por 24h, nas concentrações de 5, 25 e $50 \mu\text{g/mL}$. Após o tempo de incubação as células foram concentradas por centrifugação 2000 rpm por 5 min, o meio de cultura com as lectinas foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspenso em $50 \mu\text{L}$ de PBS. Em seguida $1 \mu\text{L}$ de uma solução de brometo de etídeo e laranja de acridina foram adicionados a cada tubo, sendo uma alíquota retirada e adicionada em lâmina coberta com lamínula. Em seguida as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência (OLYMPUS, Japão). Os eventos celulares foram observados num aumento de 400x.

Análise dos dados:

Foram contadas 300 células em campo aleatório, em duplicata, para quantificação do percentual de cada evento celular (viáveis, apoptóticas e necróticas) para cada concentração testada. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.2.4 Estudo do mecanismo de morte celular

3.2.4.1 Ensaios com citometria de fluxo

Foram realizados 3 ensaios no citômetro de fluxo: determinação da integridade de membrana, análise da fragmentação do DNA e avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Para realização dos testes, foram usadas as linhagens MCF-7 e MOLT-4, que foram semeadas nas concentrações de 2×10^5 cél/mL e 1×10^6 cél/mL, em placas de 24 poços utilizando meio RPMI suplementado com 1% de soro bovino fetal e antibióticos. As substâncias foram adicionadas em duplicata, no momento do plaqueamento para MOLT-4 e após 24 horas para MCF-7. Os testes foram realizados num citômetro de fluxo (Guava EasyCite Mini System[®]) (Figura 11). Para cada ensaio eram lidos 5000 mil eventos.

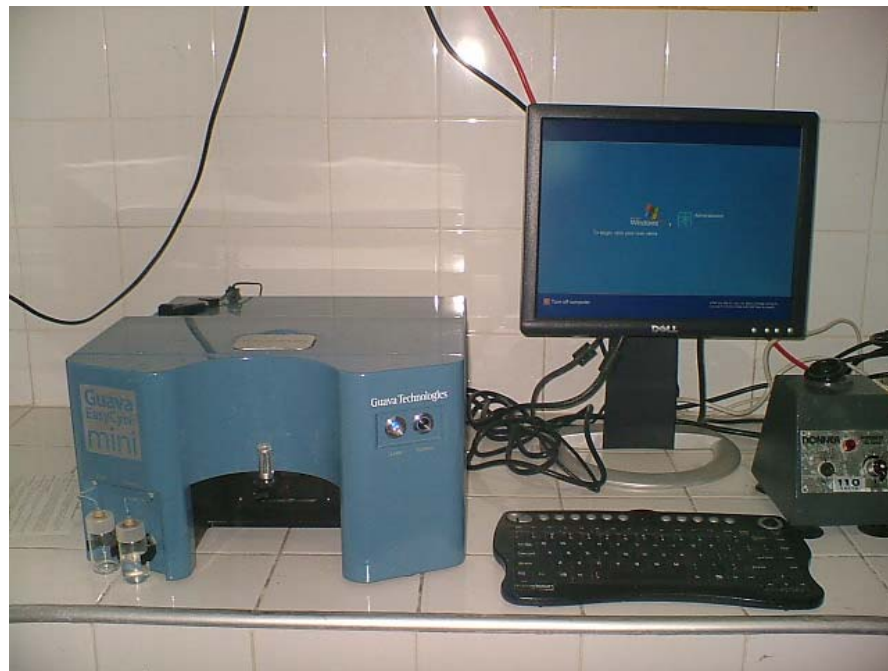


Figura 11: Fotografia do citômetro de fluxo utilizado nos ensaios de determinação da integridade de membrana, análise da fragmentação do DNA, e avaliação do potencial de membrana mitocondrial.

3.2.4.2 Análise da viabilidade celular - Determinação da integridade de membrana celular

Esse teste se baseia na capacidade do corante iodeto de propídeo se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, portanto as células viáveis apresentarão baixa fluorescência. No entanto, células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência.

Procedimento experimental

Após o período de incubação com as lectinas (5, 25 e 50µg/mL) as células foram coletadas, centrifugadas a 500 x *g* / 5min e o sobrenadante descartado, seguido da adição de 100µL de iodeto de propídeo (2µg/mL) em PBS. As amostras foram agitadas rapidamente no agitador de tubos, seguindo-se da leitura no citômetro.

3.2.4.3 Análise da fragmentação do DNA

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o iodeto de propídeo possa se ligar ao núcleo. Células com conteúdo de DNA duplicado (G₂M) emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação de cromatina e DNA fragmentado (DNA subdiploide) incorporam menor quantidade de iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, pedaços menores de DNA captam menos iodeto de propídeo, emitindo menor fluorescência (PERES; CURI, 2005).

Procedimento experimental

Após o período de incubação com as lectinas (5, 25 e 50µg/mL), as células foram recolhidas para análise do conteúdo de DNA (100µL) e colocadas em tubos tipo “eppendorf”, juntamente com 100µL da solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton-X,

50µg/mL de iodeto de propídeo) e incubadas por um período de 30 minutos, e em seguida as amostra foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCite Mini System®) usando o programa Cytosoft 4.1, para leitura e análise das amostras, onde o aparelho contava 5000 mil eventos.

3.2.4.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Essa técnica se baseia na capacidade de um corante fluorescente específico, se ligar diretamente a mitocôndria de células viáveis (JOHNSON et al., 1980). Alterações no potencial de membrana resultam em alterações na intensidade de fluorescência do corante. A Rodamina 123 (Figura 12) é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente sequestrado pela mitocôndria (dependendo do tipo celular) e tem sido amplamente usada como corante fluorescente de mitocôndria em células vivas (JOHNSON et al., 1980; RONOT et al., 1986) e em mitocôndria isolada (PETIT, 1992). Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina 123 de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência (PERES; CURI, 2005).

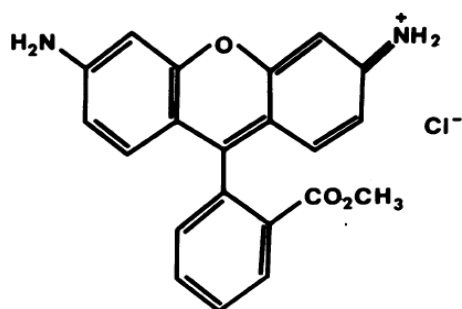


Figura 12: Estrutura da Rodamina 123. Fonte: Johnson, 1980.

Procedimento experimental

Após o período de incubação com as lectinas (5, 25 e 50µg/mL), as células foram recolhidas (300µL) para análise do potencial transmembrânico e colocadas em tubos tipo “ependorf”, centrifugadas a 500 x g / 5 min, e o precipitado ressuspensão em 200µL de Rodamina 123, por 15 min, protegidas da luz, em seguida centrifugadas a 500 x g / 5 min, e ressuspensas em 200µL PBS, e reincubadas por um período de 30 minutos, e em seguida as

amostra foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCite Mini System[®]) usando o programa Cytosoft 4.1 para leitura e análise das amostras. O aparelho contava 5000 mil eventos.

3.2.3.5 Análise dos dados de citometria de fluxo

Os dados foram obtidos de três ensaios em duplicata para cada concentração e expressos como média $\pm$ desvio padrão da média, em seguida comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada alguma diferença significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudos da atividade citotóxica *in vitro*

4.1.1 Análise morfológica do efeito das lectinas nas células tumorais

Durante os ensaios de citotoxicidade basal, a morfologia das culturas foram acompanhadas em microscópio de luz invertido para analisar possíveis alterações que estariam ocorrendo durante o tratamento com as moléculas.

A figura 13 mostra a morfologia das células J774 não tratadas (A, controle negativo), tratadas com Etoposídeo (B, controle positivo) e tratadas com as lectinas nativas ConA (D), CFL (F) e Conbr (H) ou as lectinas desnaturadas pelo calor ConA (C), CFL (E) e Conbr (G), por um período de incubação de 24 horas.

As observações tornaram evidentes que as células tratadas com as lectinas na conformação nativa tiveram algumas alterações morfológicas, sendo possível identificar o aumento de grânulos citoplasmáticos (seta vermelha), modificação no formato da célula (seta amarela), devido a alguma alteração nas proteínas do citoesqueleto, e leve aglutinação das células. As alterações causadas pelas lectinas foram semelhantes àquelas provocadas pelo Etoposídeo nestas células (Fig. 13B).

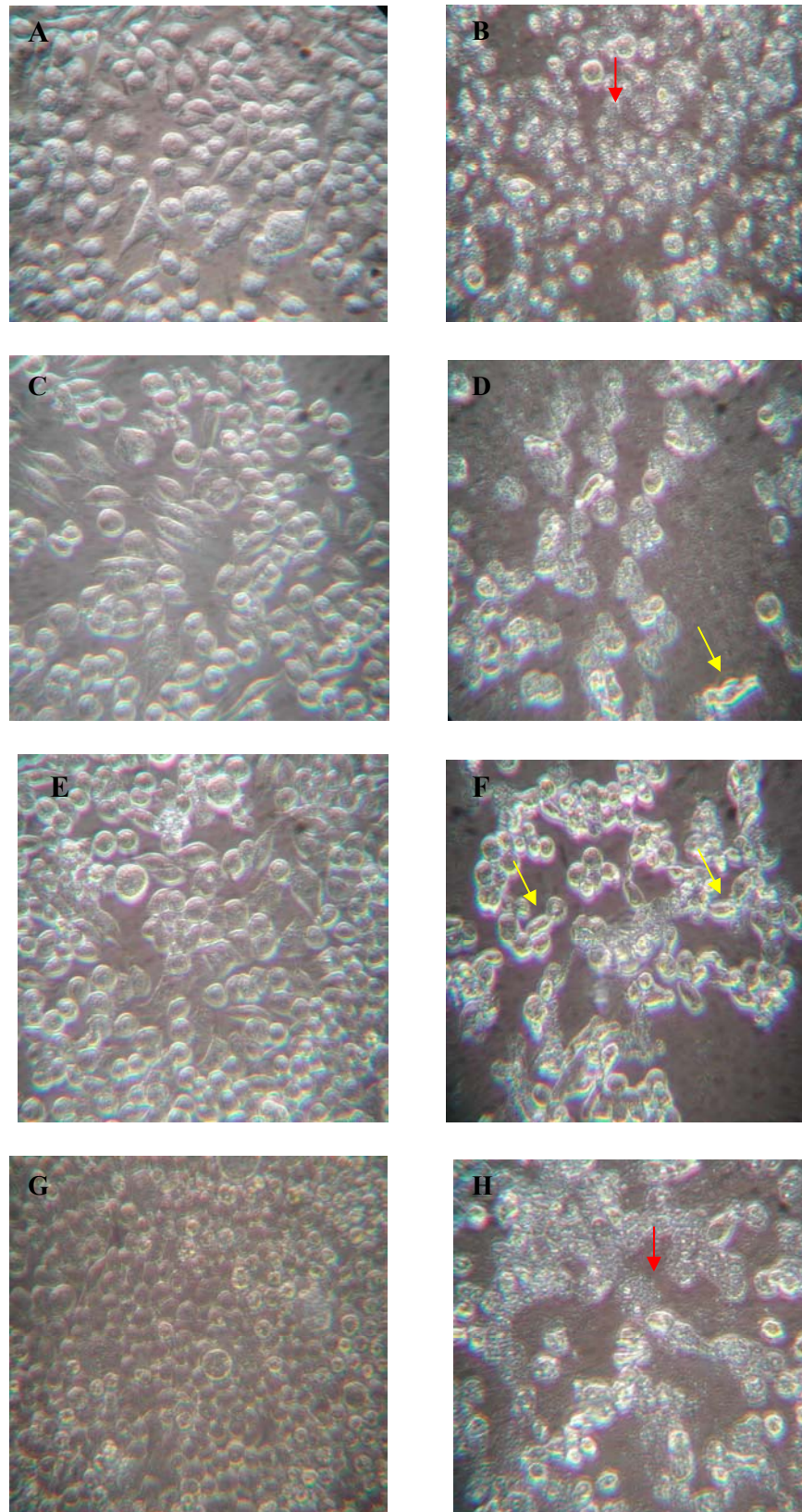


Figura 13: Fotomicrografia de células J774 tratadas com lectinas nativas ou desnaturadas pelo calor. Observação em microscópio óptico invertido com contraste de fase. Controle - não tratada (A), etoposide 200 $\mu\text{g/ml}$ (B), ConA, CFL e Conbr 200 $\mu\text{g/ml}$ desnaturada (C, E, G), ConA, CFL e Conbr 200 $\mu\text{g/ml}$ nativa (D, F, H). Aumento de 400x. As setas vermelhas indicam os grânulos citoplasmáticos e as amarelas alterações na morfologia.

A figura 14 mostra a morfologia das células MCF-7 não tratadas A (controle negativo) e tratadas com as lectinas ConA (B), Conbr (C) ou CFL (D), na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h de incubação. Observa-se que as células tratadas tiveram sua morfologia alterada, bem como sua disposição na cultura, pois estas células que crescem em monocamada se tornaram aglutinadas (setas), provocando diminuição do crescimento das linhagens, dificultando a proliferação celular.

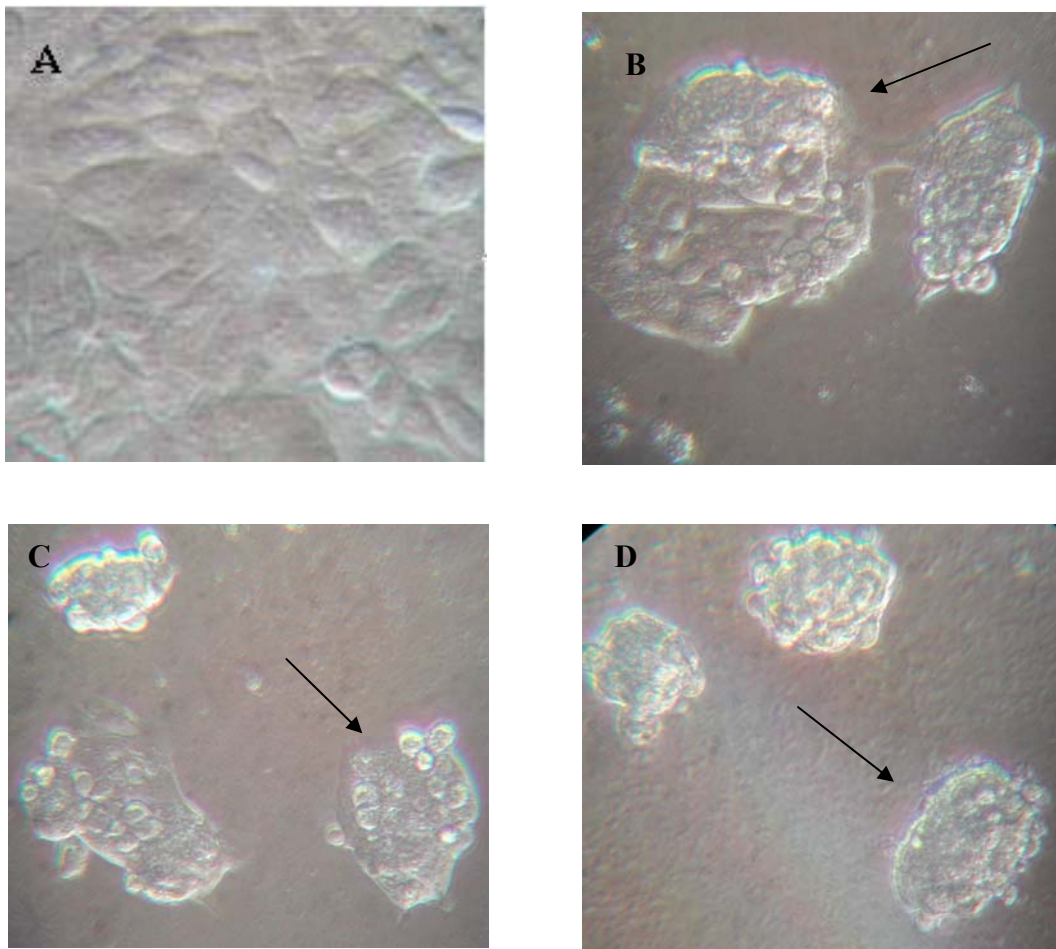


Figura 14: Fotomicrografia de células MCF-7 tratadas com lectinas. Observação em microscópio óptico invertido com contraste de fase. Controle não tratado (A), ConA 50 $\mu\text{g/ml}$ (B), Conbr 50 $\mu\text{g/ml}$ (C), CFL 50 $\mu\text{g/ml}$ (D). Aumento de 400x. Observa-se que as células após o tratamento com as lectinas ficam aglutinadas formando grumos (setas).

A figura 15 mostra a análise morfológica das células MOLT-4 não tratadas (A- controle negativo) e tratadas com Etoposídeo (B-controle positivo), ConA (C), Conbr (D) e CFL (E). Foi possível observar que as células tratadas com as lectinas apresentaram citoplasma cheio de grânulos.

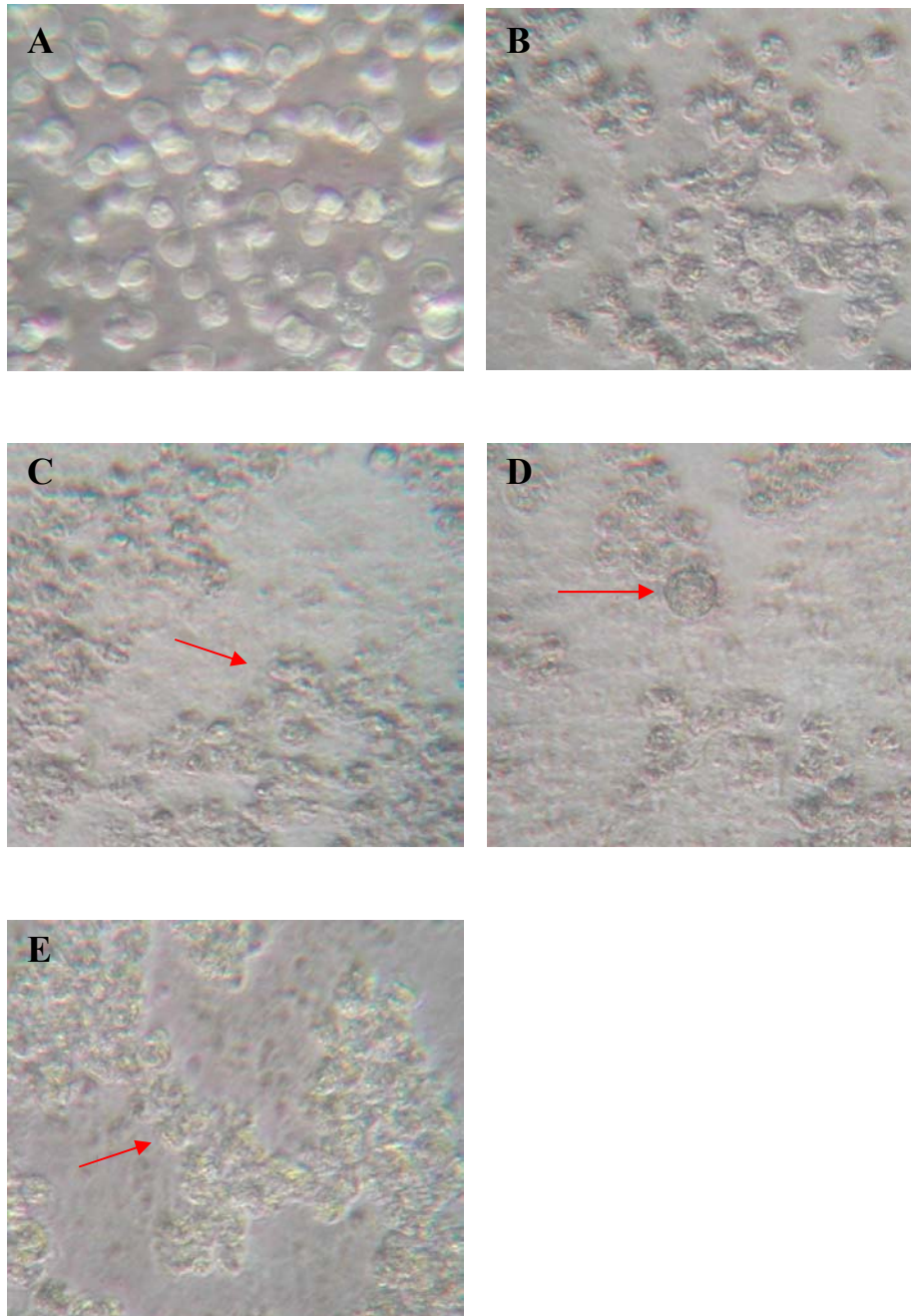


Figura 15: Fotomicrografia das células MOLT-4 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por 72h e observadas em microscópio óptico invertido com contraste de fase. Controle não tratado (A), Controle positivo - Etoposide 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (B), ConA 25 $\mu\text{g/mL}$ (C), Conbr 25 $\mu\text{g/mL}$ (D), CFL 25 $\mu\text{g/mL}$ (E).

4.1.2 Efeito das lectinas na viabilidade e proliferação celular (MTT e CAN)

O potencial citotóxico das lectinas ConA, Conbr e CFL foi avaliado em células de linhagens tumorais murina (J774) e humanas (MCF-7 HL-60 e MOLT-4), assim como em macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos *Mus musculus*. A avaliação da citotoxicidade foi feita nos tempos de 24 e 72 h de exposição para as linhagens e de 24 h para a cultura de macrófagos peritoneais. Essas células foram cultivadas e mantidas com pelo menos 10% de SFB. No entanto, durante nossos experimentos, foi observado que altas concentrações de soro interferem na ligação das lectinas as células (dados não mostrados) e, consequentemente, na atividade destas moléculas, corroborando com dados prévios existentes na literatura sobre a influência do soro em ensaios com lectinas (HEINRICH et al, 2005). No momento de incubação das células com as lectinas, os ensaios foram realizados usando 1% de SBF. As concentrações das substâncias utilizadas nos experimentos foram: 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. As figuras representam a percentagem da viabilidade celular ou proliferação celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%. Os dados de MTT e CAN são expressos como percentagem da absorbância dos poços controles, devido à variação das absorbâncias entre as placas obtidas de diferentes experimentos (HEINRICH et al, 2005).

4.1.2.1 Cultura de macrófagos peritoneais

A figura 13 mostra a citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre macrófagos peritoneais avaliada pelo método de MTT (Figura 16 A, C e E) e CAN (Figura 16 B, D e F) no período de 24 horas. No ensaio com MTT, foi possível observar que as lectinas ConA (Fig. 13A) e Conbr (Fig. 16B) diminuíram a viabilidade desta cultura a partir da concentração de 100 µg/mL, de maneira concentração-dependente e CFL (Fig. 16C) a partir da concentração de 10 µg/mL, mas não ocorreu dependência de concentração. Estes dados com MTT indicam que houve uma alteração no metabolismo da célula. O efeito inibitório sobre a viabilidade da cultura de macrófagos peritoneais na concentração de 200 µg/mL no ensaio de MTT foi de $69 \pm 6 \%$ para ConA, $37 \pm 11\%$ para Conbr e $45 \pm 17 \%$ para CFL. Pelo método de CAN este efeito citotóxico foi diferente, pois nenhuma das lectinas testadas causou alteração em nível de conteúdo macromolecular (ácidos nucleicos) (Fig. 13 B, D, F). Nesses

ensaios não foi possível determinar a CI_{50} das lectinas para esta cultura, pois os valores de inibição não atingiram 50% nas maiores concentrações testadas.

O Etoposídeo, droga antitumoral usada como controle positivo nos ensaios com as linhagens tumorais, foi testado na cultura de macrófagos peritoneais; no entanto, não causou alterações na viabilidade desta cultura e nem causou proliferação celular.

Esses dados sugerem que as lectinas apresentaram baixa citotoxicidade para a cultura de macrófagos peritoneais.

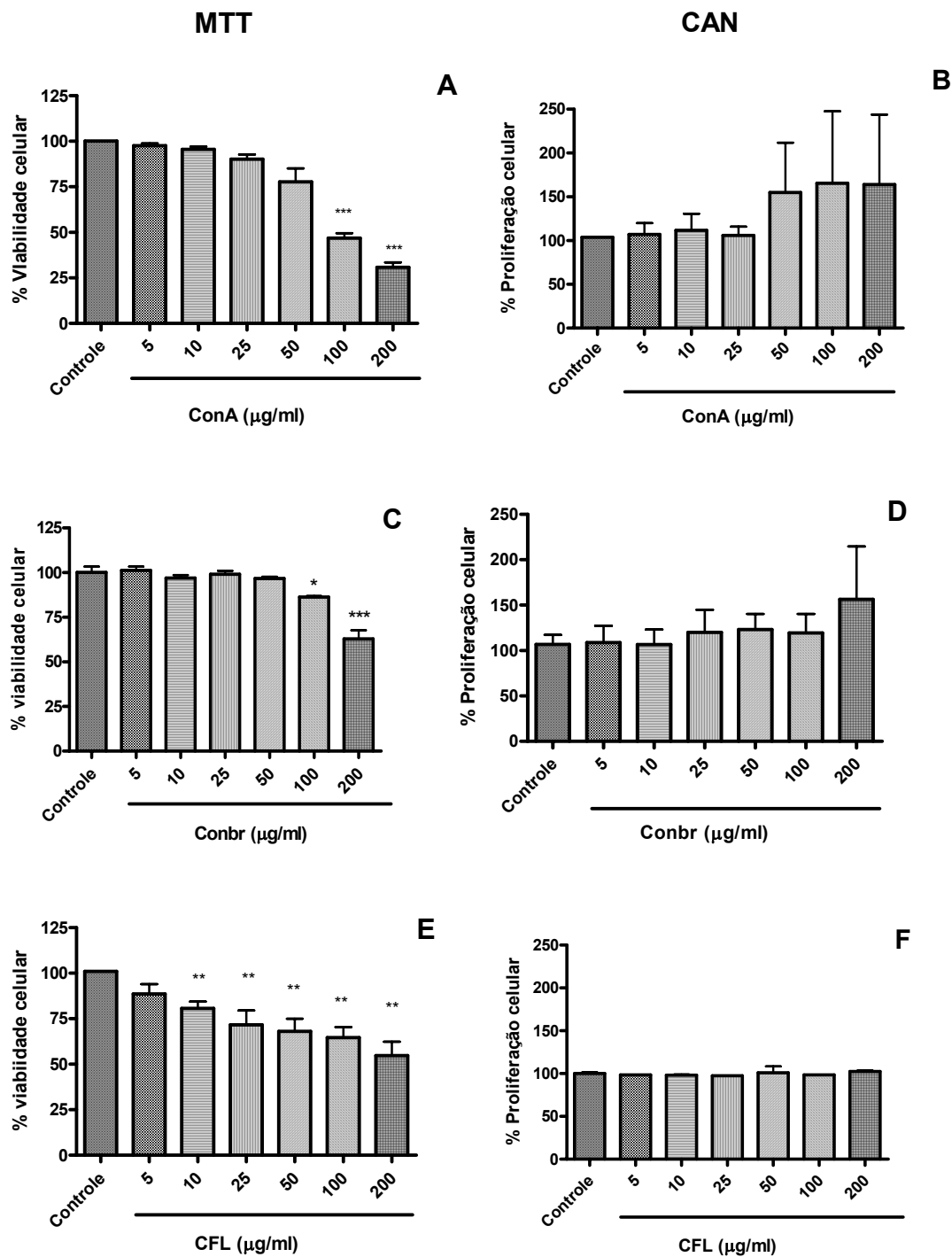


Figura 16: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C-D), CFL (E-F) sobre a viabilidade da cultura primária de macrófagos peritoneais de camundongos SWISS no período de 24 de incubação (n=2), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, D, F). Os dados representam à média de dois experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.1.2.2 Linhagens tumorais

Após análise da citotoxicidade na cultura de macrófagos peritoneais de camundongos SWISS, usando a técnica de MTT e CAN, analisamos a atividade das lectinas ConA, Conbr e CFL nas linhagens de células tumorais murina (J774) e humanas (MCF-7, HL-60 e MOLT-4). A droga antitumoral usada como controle positivo para os ensaios foi o Etoposídeo (SIGMA, EUA). Para a linhagem macrofágica tumoral J774, o período de incubação testado foi de 24 h, pois a cultura não permanecia viável no período de 72 h (dados não mostrados).

A figura 17 apresenta a citotoxicidade do Etoposídeo sobre a linhagem J774, usando a técnica de MTT (A) e CAN (B) no período de 24h. A CI_{50} do Etoposídeo obtida nos experimentos de MTT e CAN foi de 37 e 23 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O Etoposídeo provocou uma redução de 76 e 73% na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, nos ensaios de MTT e CAN respectivamente.

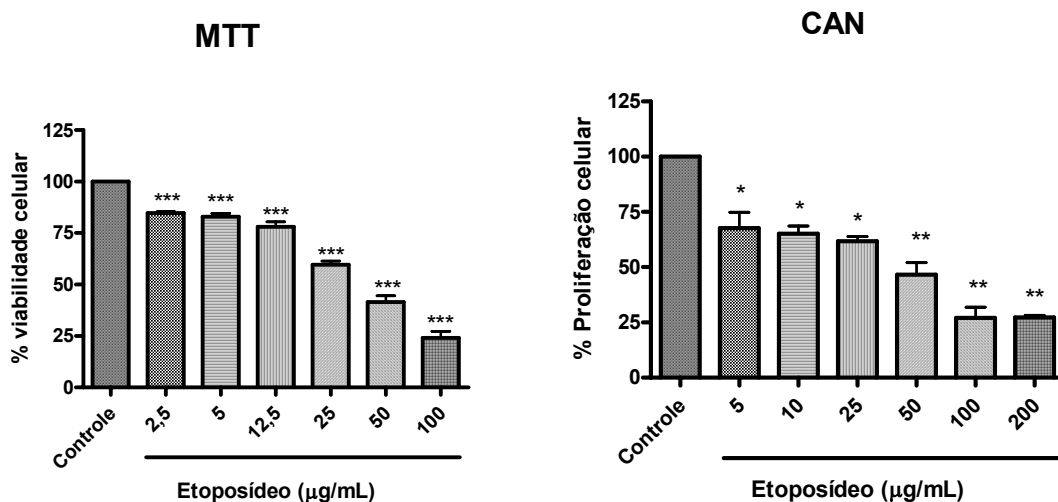


Figura 17: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem de macrófagos tumorais J774 em 24h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN. Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

O efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL foi avaliado na linhagem J774 usando os métodos de MTT e CAN por um período de 24 horas (Figura 18). As CI_{50} obtidas para ConA, Conbr e CFL na técnica de MTT foram de 10,2, 58 e 103 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As CI_{50} obtidas para ConA e CFL no ensaio do CAN foram de 25 e 80 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

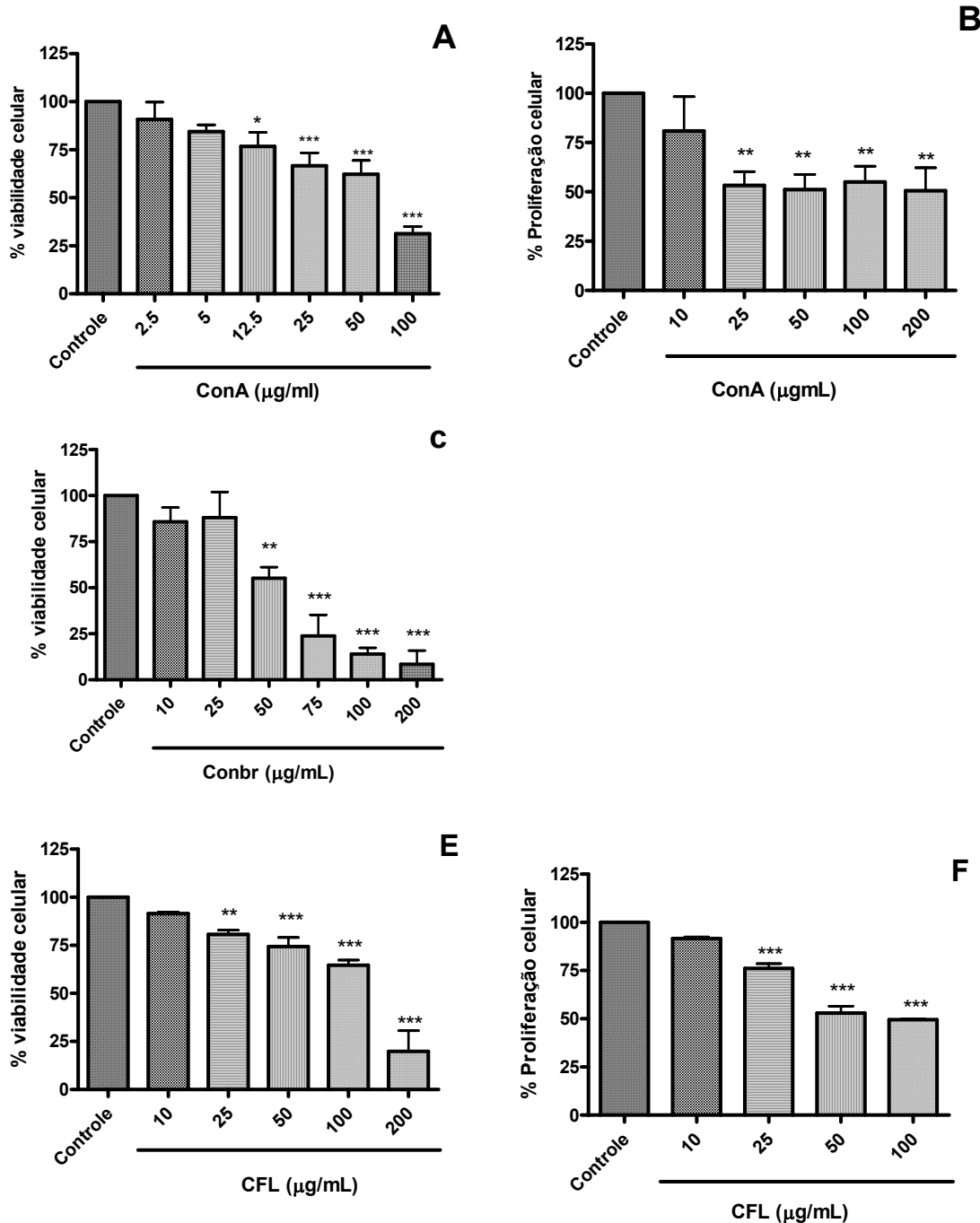


Figura 18: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C) e CFL (E-F) sobre a viabilidade da linhagem de macrófagos tumorais J774 em 24h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, F). Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 19 apresenta a citotoxicidade do Etoposídeo sobre as células MCF-7, usando a técnica de MTT e CAN. As CI_{50} obtidas foram de 7,4 e 21,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O etoposídeo causou uma redução de $73 \pm 5\%$ da viabilidade celular na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, quando analisado por MTT e de $80 \pm 0,14\%$ na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ quando analisado pelo CAN.

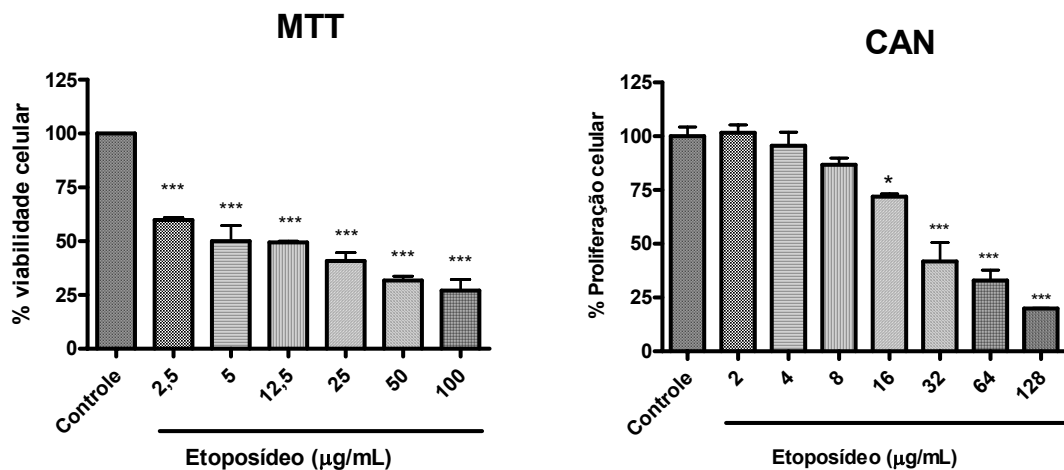


Figura 19: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral MCF-7 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN. Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 20 mostra a citotoxicidade de ConA (A-B), Conbr (C-D) e CFL (E-F) sobre as células MCF-7, usando a técnica de MTT e CAN, por um período de 72h. As CI_{50} obtidas foram de 14 e 22 $\mu\text{g/mL}$ para ConA, de 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$ para Conbr e de 60 e 90 $\mu\text{g/mL}$ para MTT e CAN, respectivamente. Os valores de CI_{50} foram menores quando a citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT. ConA causou uma redução na viabilidade de $78 \pm 6,7$ e $52 \pm 9,7$ % na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ nas técnicas de MTT e CAN, respectivamente. Conbr causou uma redução de 78 ± 6 e $60 \pm 11\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ nas técnicas de MTT e CAN, respectivamente. CFL causou uma redução de 75 ± 7 e $41 \pm 1\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ nas técnicas de MTT e CAN, respectivamente.

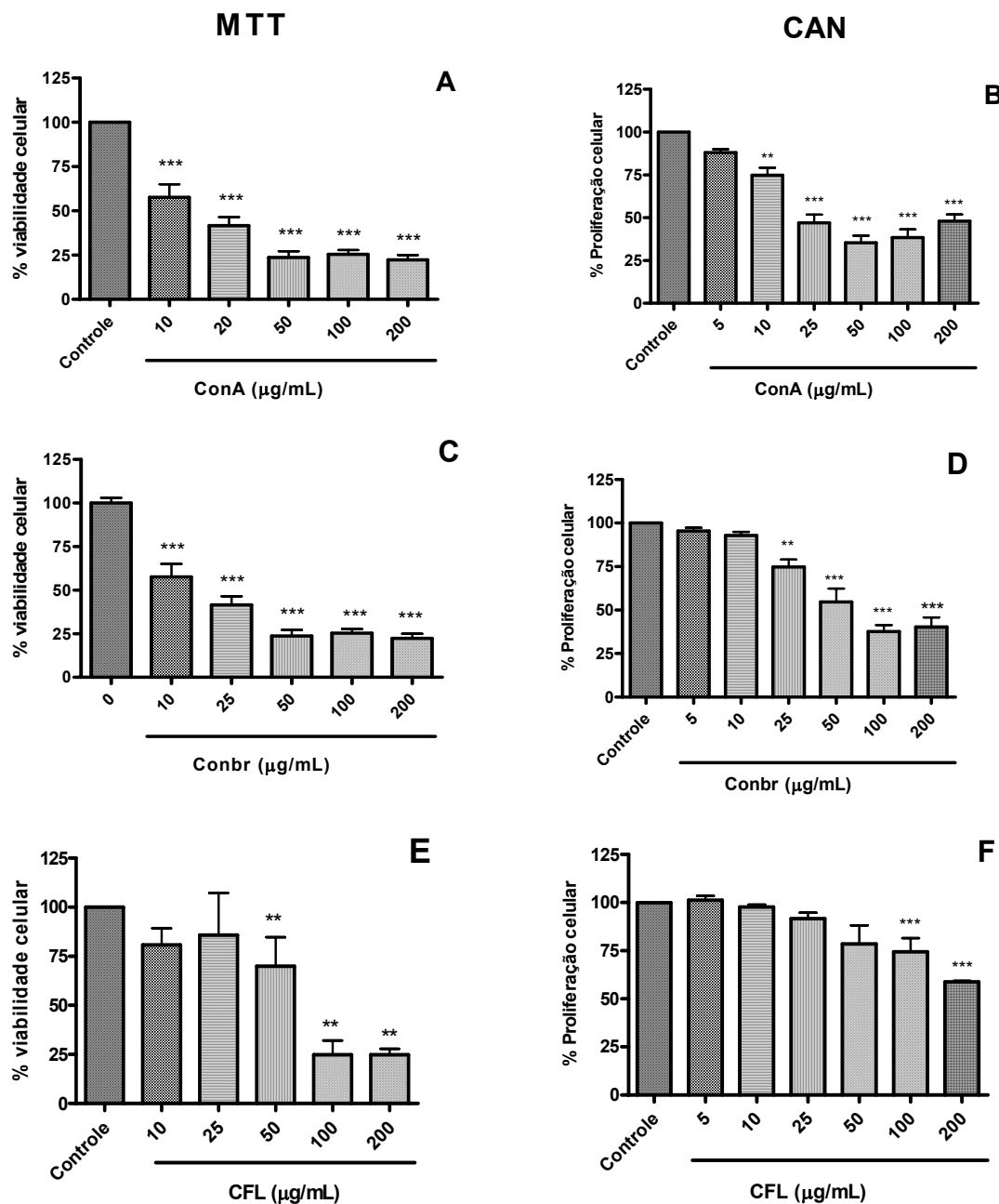


Figura 20: Efeito das lectinas ConA (A-B), Conbr (C-D) e CFL (E-F) sobre a viabilidade da linhagem tumoral MCF-7 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A,C,E) e CAN (B,D,F). Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, em relação ao controle.

A figura 21 apresenta a citotoxicidade do Etoposídeo avaliada sobre as células HL-60, usando a técnica de MTT, em 72h. A CI_{50} obtida foi de 2.6 $\mu\text{g/mL}$. O Etoposídeo causou uma redução na viabilidade de $86 \pm 1,8\%$ na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$.

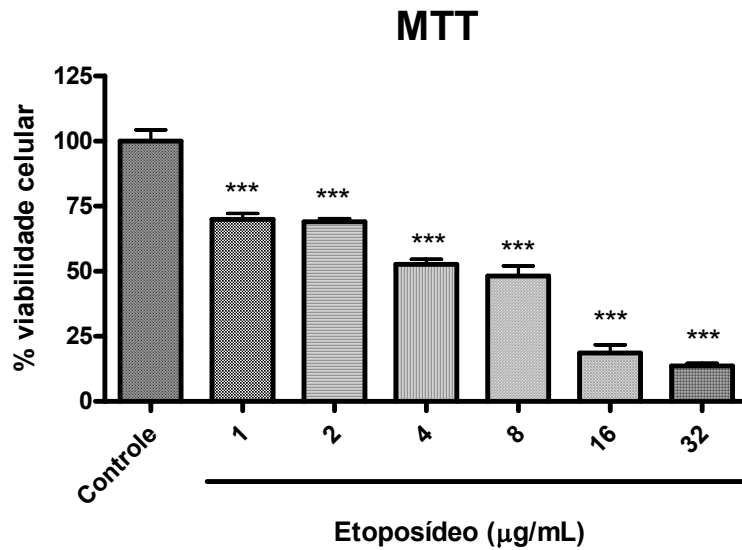


Figura 21: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT. Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 22 apresenta a citotoxicidade de ConA (A-B), Conbr (C-D) e CFL (E-F) avaliada sobre as células HL-60, usando a técnica de MTT e CAN, respectivamente. As CI_{50} obtidas foram de 14 e 10 $\mu\text{g/mL}$ para ConA, 81 e 12 $\mu\text{g/mL}$ para Conbr e de 55 e 42 $\mu\text{g/mL}$ para CFL. Os valores de CI_{50} foram menores quando a citotoxicidade foi determinada pelo método de CAN. ConA causou uma redução na viabilidade de $77 \pm 7\%$ e de $73 \pm 1\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, usando as técnicas de MTT e CAN respectivamente. Conbr causou uma redução na viabilidade de $59 \pm 9\%$ e de $70 \pm 6\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, usando as técnicas de MTT e CAN respectivamente. CFL causou uma redução na viabilidade de $72 \pm 2.7\%$ e de $64 \pm 9\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, usando as técnicas de MTT e CAN respectivamente.

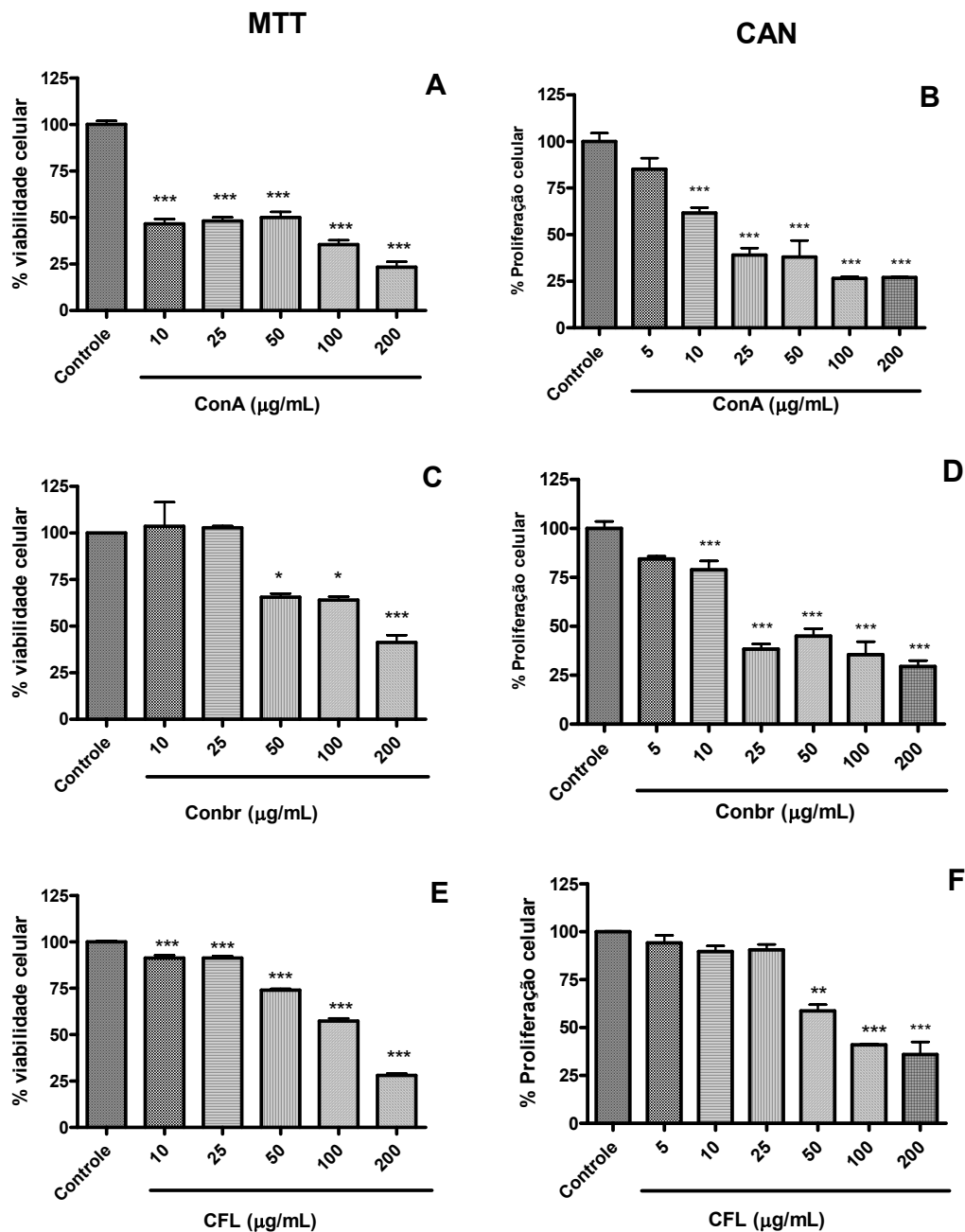


Figura 22: Efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a viabilidade da linhagem tumoral HL-60 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e CAN (B, D, F). Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 23 apresenta a citotoxicidade do Etoposídeo avaliada sobre as células MOLT-4, usando a técnica de MTT e CAN em 72h. A CI_{50} obtida foi de 0,05 e 0,07 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O Etoposídeo causou uma redução na viabilidade de $76 \pm 8\%$ e de $65 \pm 0,6\%$ na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$, usando as técnicas de MTT e CAN, respectivamente.

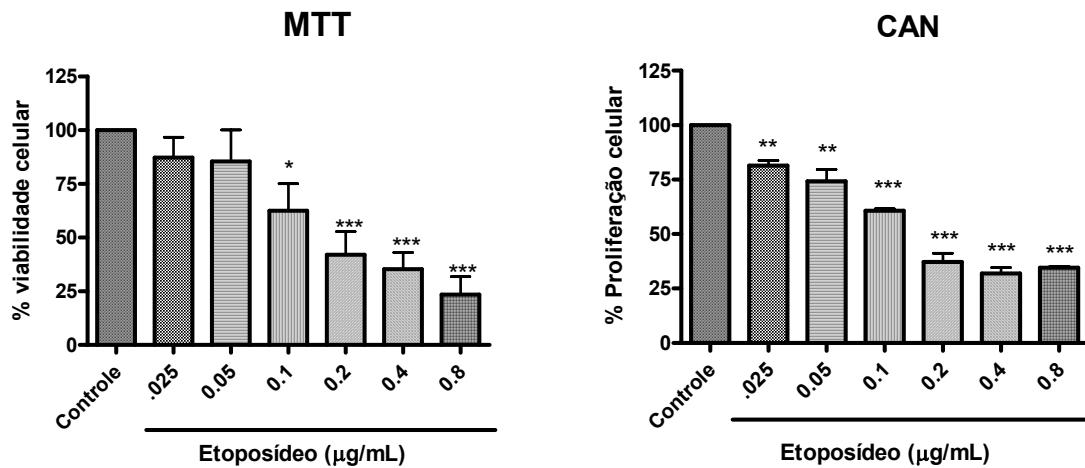


Figura 23: Efeito do Etoposídeo sobre a viabilidade da linhagem tumoral MOLT-4 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT e CAN. Os dados representam à média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 24 apresenta a citotoxicidade de ConA (A-B), Conbr (C-D) e CFL (E-F), avaliada sobre as células MOLT-4, usando a técnica de MTT e CAN, respectivamente. As CI_{50} obtidas foram de 3,6 e 3 $\mu\text{g/mL}$ para ConA, 21 e 39 $\mu\text{g/mL}$ para Conbr e de 29 e 37 $\mu\text{g/mL}$ para CFL. Para as lectinas Conbr e CFL, os valores de CI_{50} foram menores quando a citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT. A lectina ConA causou uma redução na viabilidade de $91,5 \pm 1,5\%$ e de $59 \pm 6,1\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, para MTT e CAN respectivamente. Conbr causou uma redução na viabilidade de $83 \pm 0,3\%$ e de $56 \pm 3\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, para MTT e CAN respectivamente. Já CFL causou uma redução na viabilidade de $82 \pm 3\%$ e de $62 \pm 2\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, para MTT e CAN respectivamente.

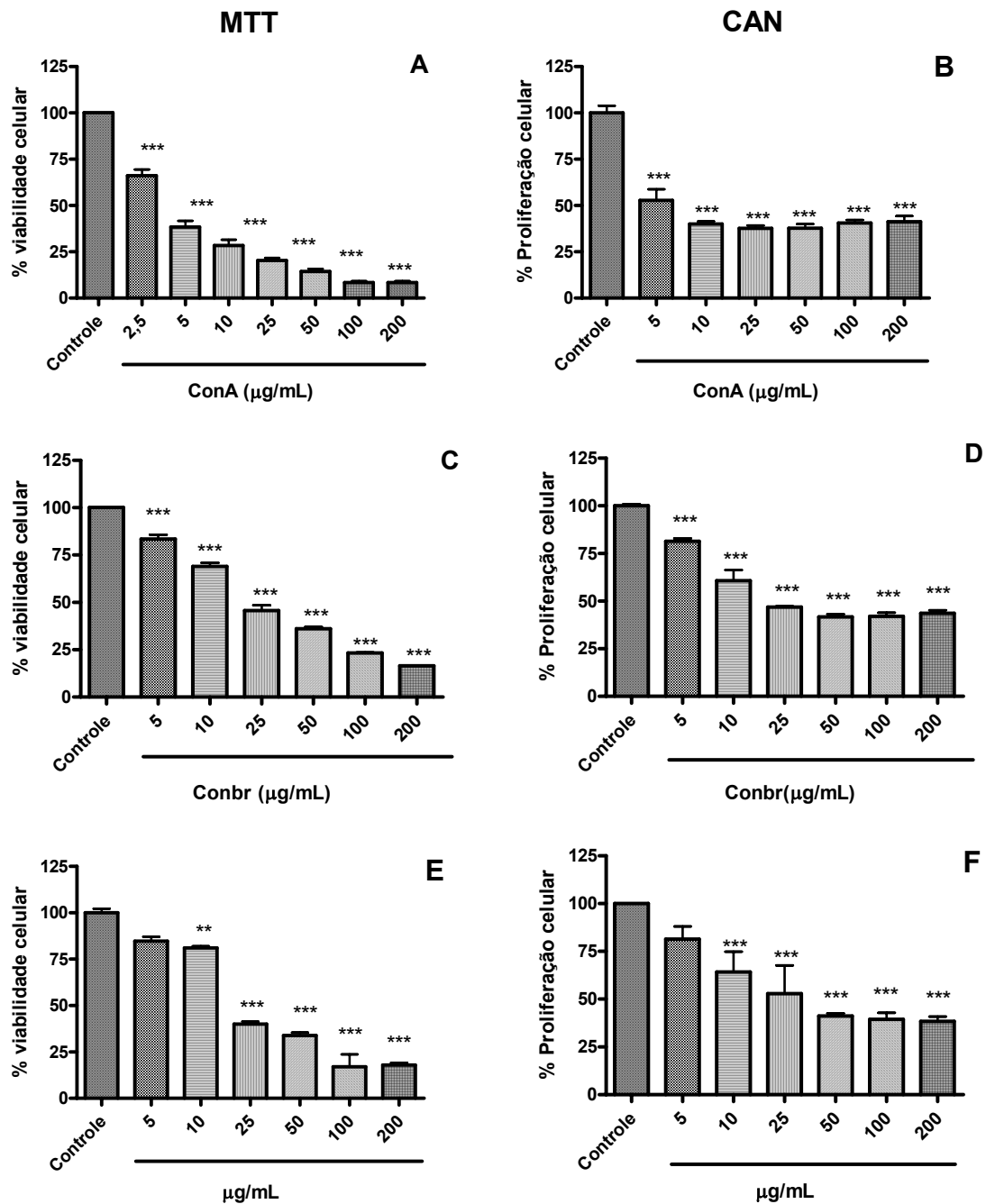


Figura 24: Efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a viabilidade da linhagem tumoral MOLT-4 em 72h (n=3), analisada pela técnica de MTT (A, C, E) e contagem de ácidos nucleicos (B, D, F). Os dados representam a média de três experimentos em triplicata, sendo expressos como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

As tabelas 5 e 6 sumarizam os resultados de CI_{50} obtidos nos ensaios de citotoxicidade com MTT e CAN. Em todas as linhagens, a lectina de ConA foi mais potente em causar morte celular, seguida de Conbr e CFL. A linhagem tumoral mais sensível às lectinas foi MOLT-4.

Tabela 5: Citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a cultura de macrófagos peritoneais (MØ) e a linhagem J774 no período de 24 horas de incubação, avaliada pelo método de MTT e CAN. Os resultados representam a CI_{50} em $\mu\text{g/ml}$ e o intervalo de confiança de 95%, obtidos por regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

Tratamento	MØ		J774	
	MTT	CAN	MTT	CAN
Etoposide ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	37 19-70	7 9-360
ConA ($\mu\text{g/mL}$)	105	>200	57 33-99	11 8-15
Conbr ($\mu\text{g/mL}$)	>200	>200	58 33-102	>200
CFL ($\mu\text{g/mL}$)	>200	>200	54 28-100	80 30-210

Tabela 6: Citotoxicidade das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre as linhagens, MCF-7, HL-60 e MOLT-4 no períodos de 72 horas de incubação, avaliada pelo método de MTT e CAN. Os resultados representam a CI_{50} em $\mu\text{g/ml}$, e o intervalo de confiança de 95%, obtidos por regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

Tratamento	MCF-7		HL-60		MOLT-4	
	MTT	CAN	MTT	CAN	MTT	CAN
Etoposide ($\mu\text{g/mL}$)	7,4 4,6 – 11,7	21 12 - 39	2,6 1,7 - 4	-	0,1 0,04 - 0,18	0,1 0,07 - 0,15
ConA ($\mu\text{g/mL}$)	14 8,6 - 22	10,8 6 - 18	14 7 - 27	10 6,6 - 15	3,6 2,8 - 4,5	3
Conbr ($\mu\text{g/mL}$)	25 7,4 - 84	30 21 - 44	90 75 - 109	12 5 - 28	21 20 - 23	7 6,2 - 7,8
CFL ($\mu\text{g/mL}$)	60 63,7 - 95,2	90 8 - 99	55 52-60	42 25 - 71	29 23 - 36	37 9 - 148

4.1.3 Avaliação do potencial genotóxico das lectinas

Para investigar o potencial genotóxico das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre as linhagens MCF-7, MOLT-4 e HL-60, foi utilizado o teste do cometa. Este ensaio analisa o dano causado diretamente no DNA. Para isso, foi usado o índice de dano (ID) ao DNA, que reflete a extensão de DNA lesionado. Os valores para o ID podem variar de 0 a 400 (unidades arbitrárias). Após o tratamento por 24 horas com as lectinas separadamente, houve um aumento significativo do ID, a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, para todas as lectinas testadas (Figura 25). Para MCF-7 (Figura 25-A), os maiores índices foram de 160, 142, 103, para ConA, Conbr e CFL, respectivamente, na maior concentração testada de 50 $\mu\text{g/mL}$. Já para MOLT-4 (Figura 25-B) os maiores índices de dano foram de $213 \pm 8,6$, $145 \pm 9,8$ e $114 \pm 9,7$, para ConA, Conbr e CFL respectivamente, na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$). Para HL-60 (Figura 25-C) os maiores índices de dano foram de $208 \pm 8,9$, $163 \pm 17,5$ e $133 \pm 2,5$, para ConA, Conbr e CFL respectivamente, na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$). O índice de dano causado pelas lectinas foi muito semelhante nas três linhagens testadas, sendo concentração-dependente, porém, a lectina ConA causou um maior índice de danos.

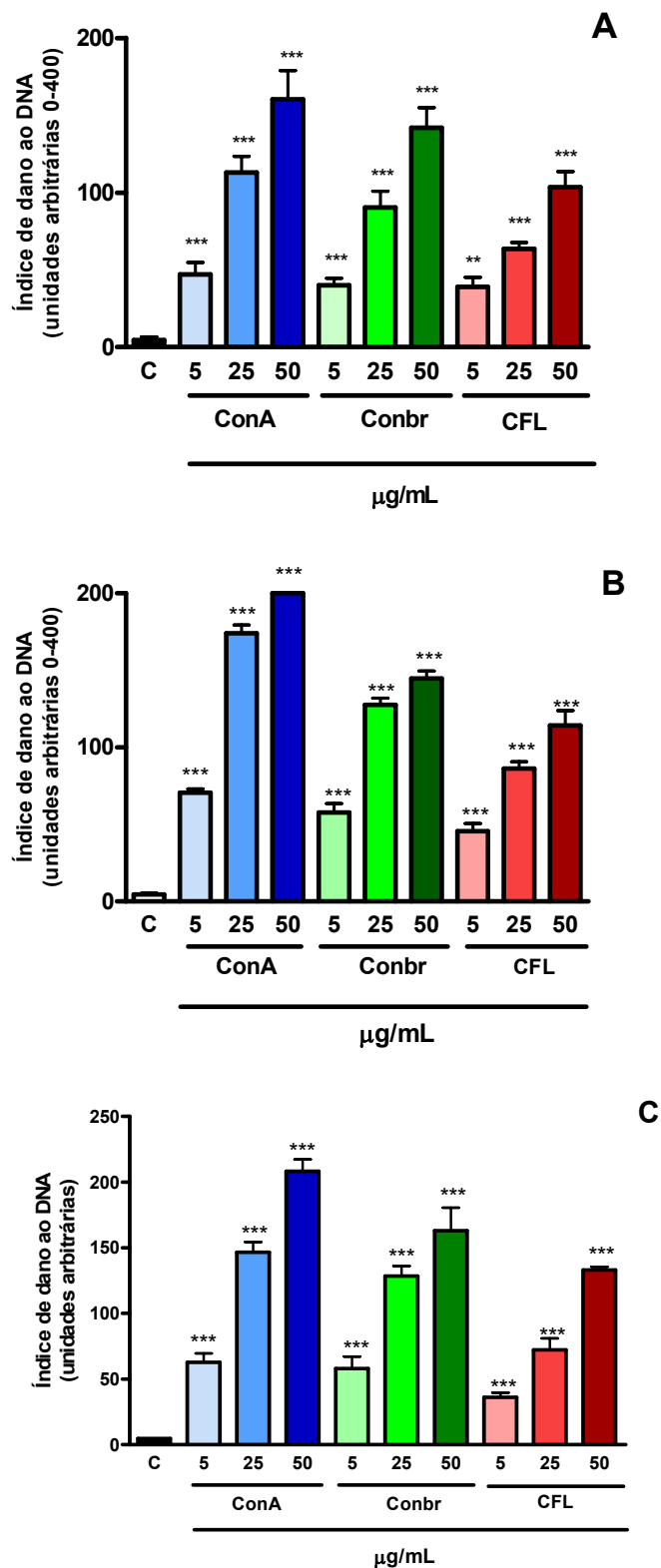


Figura 25: Índice de dano ao DNA de células MCF-7 (A) e MOLT-4 (B) e HL-60 (C) no controle (não-tratadas) ou tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL, por 24 horas, nas concentrações 5, 25 e 50 µg/mL, determinado pelo teste do cometa. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Todas as concentrações testadas induziram dano ao DNA de maneira concentração-dependente e os valores de índice e frequência foram estatisticamente diferentes quando comparados ao controle negativo.

Foi também calculada a frequência de dano (FD), que representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA. A frequência de dano causado na linhagem MCF-7 foi superior a 75% para ConA e Conbr na concentração de 50 µg/mL, sendo superior a 60% para CFL na mesma concentração (Tabela 7). Já na linhagem MOLT-4, a frequência de dano foi superior a 80% na maior concentração testada, para todas as lectinas analisadas (Tabela 8). Na linhagem HL-60 (Tabela 9) foi superior a 90% para ConA e Conbr na concentração de 50 µg/mL, porém CFL atingiu 87% de frequência de dano na mesma concentração de 50 µg/mL.

Tabela 7: Tabela de frequência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem MCF-7 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DP). *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	FD $\pm$ DP
Controle		4,5 $\pm$ 2,0
ConA	5	42,0 $\pm$ 4,6***
	25	62,25 $\pm$ 5,1***
	50	75,7 $\pm$ 3,7***
Conbr	5	33,75 $\pm$ 2,9***
	25	60,0 $\pm$ 2,9***
	50	78,0 $\pm$ 2,9***
CFL	5	33,25 $\pm$ 3,5***
	25	54,25 $\pm$ 3,7***
	50	62,5 $\pm$ 4,4***

Tabela 8: Tabela de freqüência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem MOLT-4 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL. Os dados são expressos como média ± desvio padrão da média (DP). *p<0,001 em relação ao controle.**

Tratamento	Concentração (µg/mL)	FD ± DP
Controle		4,5 ± 1,7
ConA	5	59,25 ± 2,5***
	25	78,75 ± 3,09***
	50	88,75 ± 2,2***
Conbr	5	48,75 ± 4,78***
	25	73,75 ± 2,9***
	50	84,25 ± 4,7***
CFL	5	41 ± 4,0***
	25	63 ± 4,9***
	50	80 ± 3,9***

Tabela 9: Tabela de freqüência de danos causados pelas lectinas ConA, Conbr e CFL na linhagem HL-60 obtidos pelo teste do cometa após 24 horas de tratamento nas concentrações de 5, 25 e 50 µg/mL. Os dados são expressos como média ± desvio padrão da média (DP). *p<0,001 em relação ao controle.**

Tratamento	Concentração (µg/mL)	FD ± DP
Controle		4,75 ± 1,7
ConA	5	55,2 ± 4,6***
	25	76,7 ± 3,5***
	50	91,7 ± 2,7***
Conbr	5	47,0 ± 3,1***
	25	73,7 ± 6,4***
	50	90,0 ± 2,4***
CFL	5	36,0 ± 3,5***
	25	56,5 ± 2,6***
	50	87,2 ± 2,2***

4.2 Estudo do mecanismo de morte celular

4.2.1 Efeito das lectinas no percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas

Após 24 horas de exposição das células MCF-7 (Figura 26), MOLT-4 (Figura 27) e HL-60 (Figura 28) com as lectinas ConA, Conbr e CFL, nas concentrações 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, foi observado uma significativa diminuição das células viáveis e um aumento de células apoptóticas ($p < 0,001$) em todas as concentrações testadas. Além disso, foi observado aumento no número de células necróticas com o aumento das concentrações ($p < 0,001$).

A lectina ConA foi a que induziu um aumento mais pronunciado do número de células necróticas na maior concentração (50 $\mu\text{g/mL}$) em todas as linhagens.

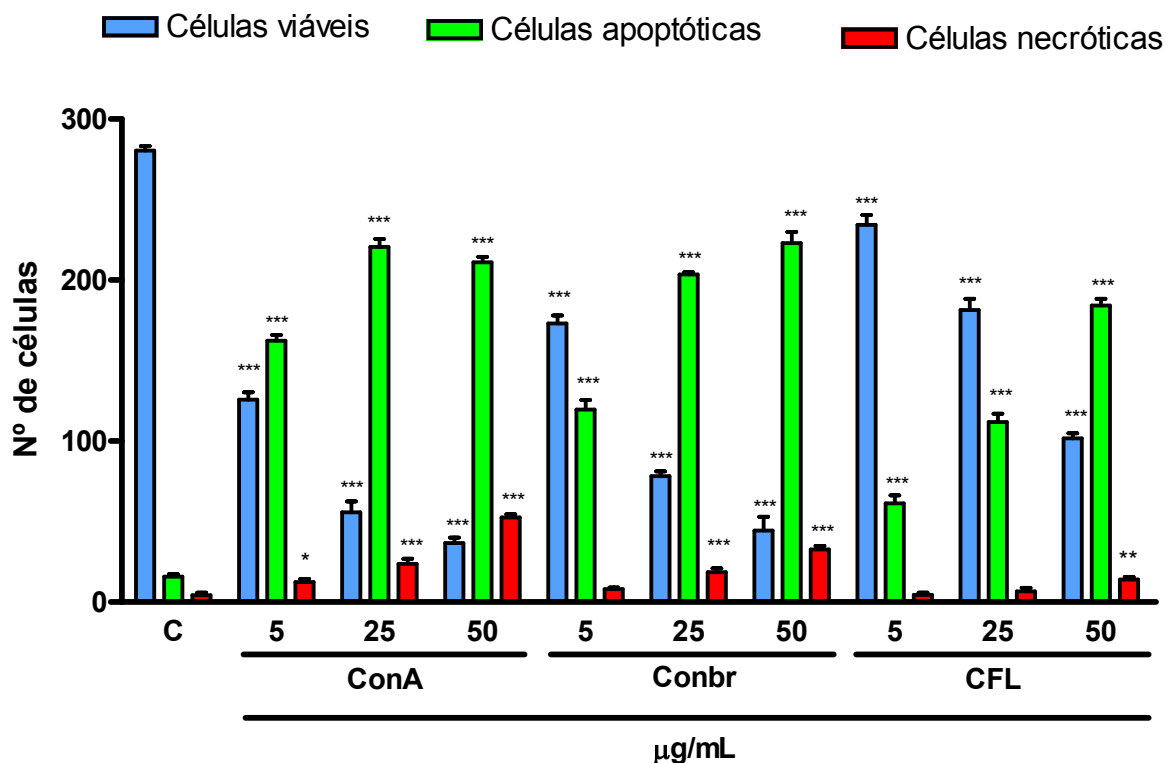


Figura 26: Efeito das lectinas na linhagem MCF-7 analisado pela coloração diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação aos respectivos dados do controle.

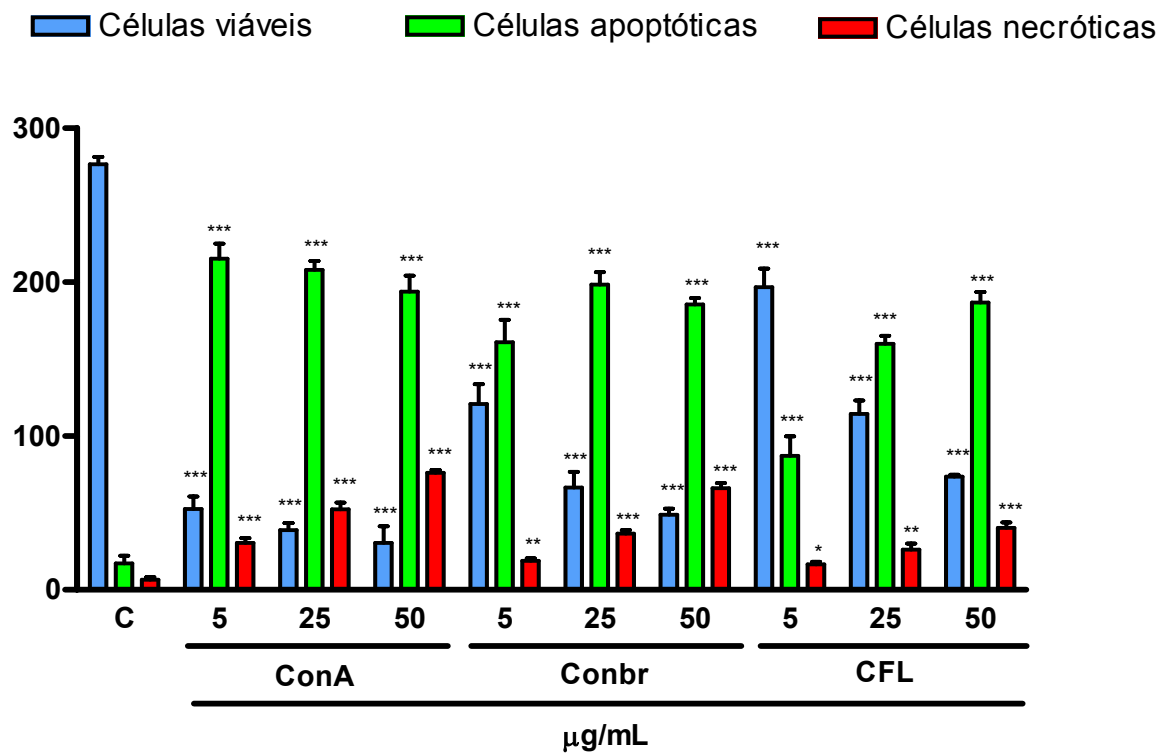


Figura 27: Efeito das lectinas na linhagem MOLT-4 analisado pela coloração diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação aos respectivos dados do controle.

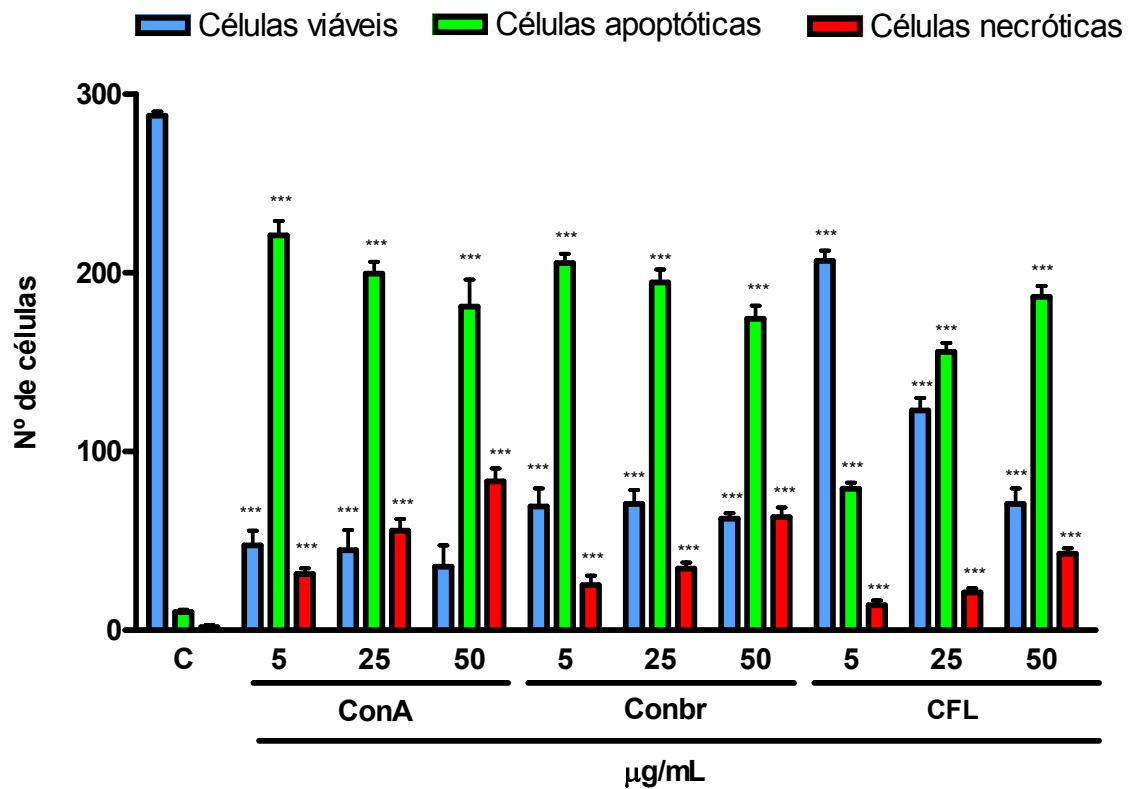


Figura 28: Efeito das lectinas na linhagem HL-60 analisado pela coloração diferencial com Brometo de etídeo/Laranja de acridina, após 24 horas de tratamento. Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata, analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ em relação aos respectivos dados do controle.

4.2.2 Efeito das lectinas na integridade da membrana plasmática

Nesse ensaio, as células não tratadas (controle) e tratadas com as lectinas foram incubadas com iodeto de propídeo, composto fluorescente que é capaz de se ligar ao DNA apenas quando a membrana plasmática da célula está danificada, permitindo a entrada do fluoróforo no citoplasma. Dessa forma, somente as células com dano na membrana podem emitir fluorescência, que é detectada numa faixa de comprimento de onda de 560-580 nm.

O efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL sobre a integridade da membrana celular de células MCF-7, MOLT-4 e HL-60 foi avaliado nas concentrações 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Verificou-se uma alteração significativa na integridade de membrana celular a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ para todas as lectinas testadas na linhagem MCF-7 (Figura 29), apresentando $55 \pm 3,2\%$, $61 \pm 2,5\%$, $65 \pm 1,9\%$ de viabilidade para ConA, Conbr e CFL, respectivamente, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). Todas as lectinas apresentaram a mesma potência, pois não houve diferença significativa entre elas. Já para a linhagem MOLT-4 foi observado um efeito significativo das lectinas na integridade da membrana celular a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ para Conbr e CFL e a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ para ConA (Figura 30). As lectinas tiveram menor efeito na viabilidade da linhagem MOLT-4 em relação à MCF-7, apresentando $82 \pm 1,3\%$, $91 \pm 1,9\%$, $94 \pm 0,7\%$ de células viáveis para ConA, Conbr e CFL, respectivamente, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). Semelhantemente aos efeitos encontrados em MOLT-4, as lectinas ConA, Conbr e CFL diminuíram a viabilidade de HL-60 para $82 \pm 1,4\%$, $91 \pm 3\%$ e $95 \pm 1,4\%$, respectivamente (Figura 31) ($p < 0,001$).

Como visto a integridade da membrana só foi alterada nas maiores concentrações, o que é característico de necrose. A alteração na integridade da membrana não foi tão pronunciada nas linhagens MOLT-4 e HL-60, sugerindo que a ação citotóxica das lectinas seja primariamente por apoptose. A linhagem MCF-7, apresentou um maior dano na integridade da membrana, provavelmente porque esta linhagem fica com a membrana um pouco instável após o tratamento com solução de tripsina, utilizada para dispersar esta linhagem que é aderente, antes da leitura com iodeto de propídeo.

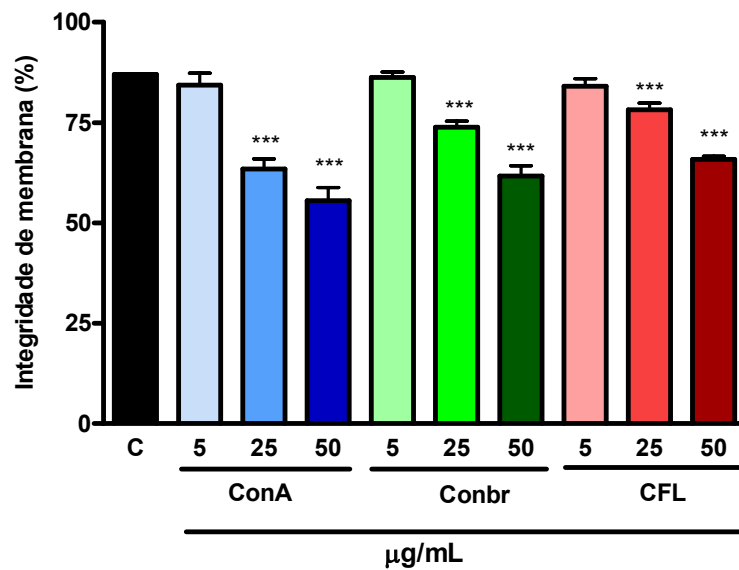


Figura 29: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células MCF-7. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

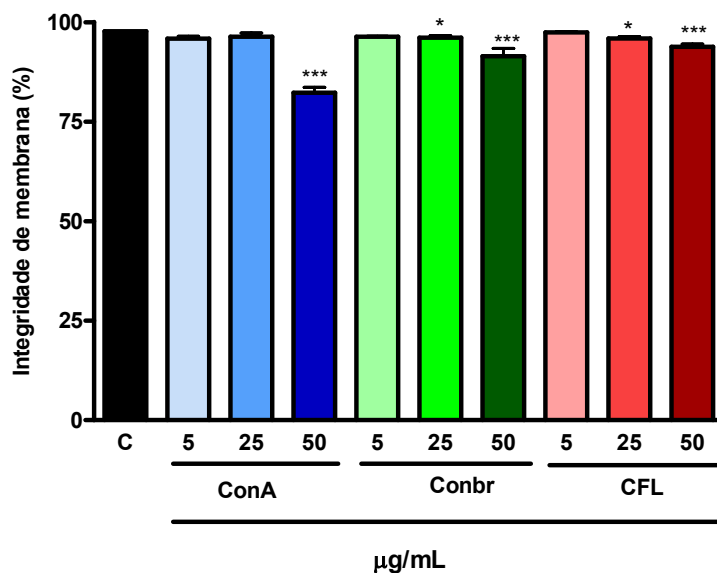


Figura 30: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células MOLT-4. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

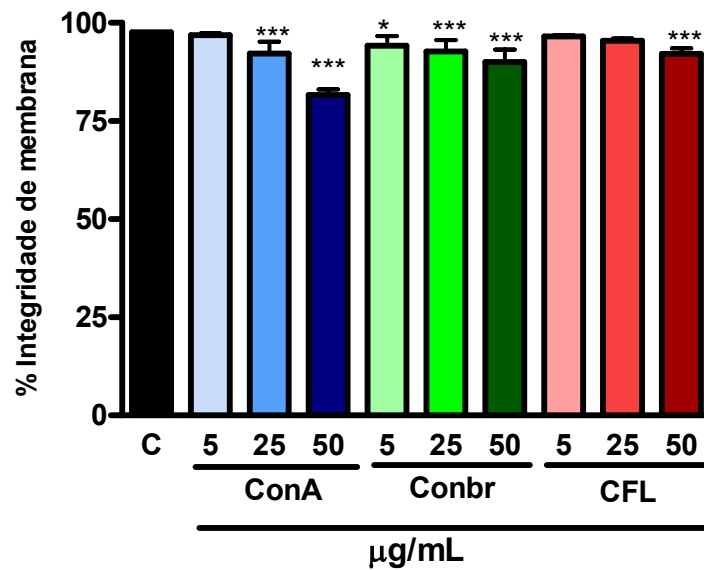


Figura 31: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células HL-60. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

4.2.3 Efeito das lectinas na fragmentação do DNA

As células não tratadas (controle) e tratadas com as lectinas foram incubadas com uma solução contendo o triton X-100 e iodeto de propídeo. O triton X-100 lisa a membrana celular e o iodeto de propídeo se liga ao DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células com condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. O efeito das lectinas ConA, Conbr e CFL foi analisado na fragmentação do DNA de células MCF-7, MOLT-4 e HL-60. As concentrações de lectinas testadas foram 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. As lectinas causaram fragmentação do DNA das células MCF-7 de forma significativa ($p < 0,05$) (Figura 32). O efeito máximo de fragmentação causado pelas lectinas ConA, Conbr e CFL sobre as células MCF-7 foi de $39 \pm 3,5$, $49 \pm 4,1$ e $47 \pm 6,5\%$, respectivamente, na maior concentração testada de $50\mu\text{g/mL}$. Esse efeito de fragmentação característico de apoptose confirma os dados observados com coloração diferencial que identificou apoptose causada pelas lectinas nesta linhagem. As lectinas que tiveram maior efeito na fragmentação foram Conbr e CFL.

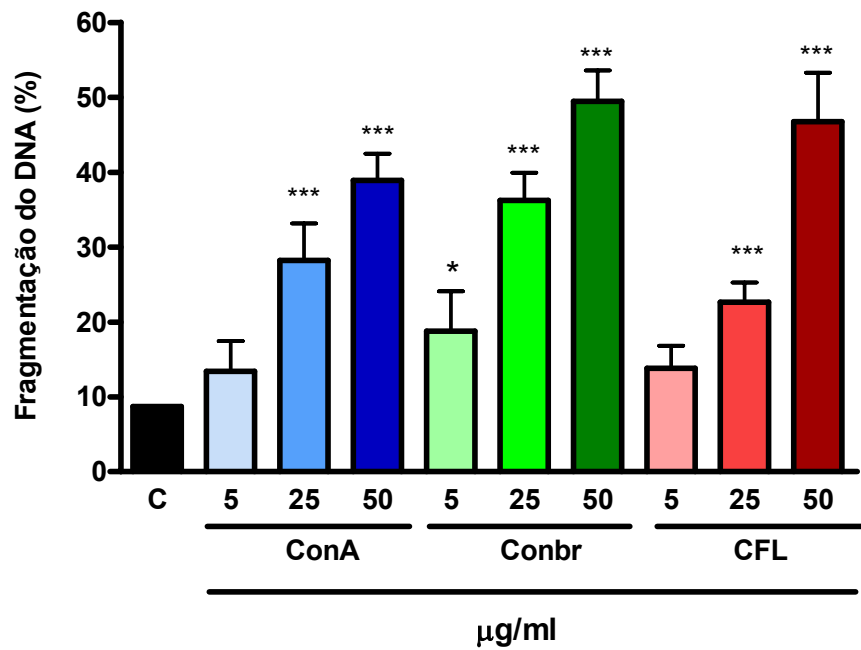


Figura 32: Análise da fragmentação do DNA de células MCF-7 por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$, $p < 0,001$ em relação ao controle.

As lectinas também causaram fragmentação do DNA nas células MOLT-4 de forma significativa ($p < 0,001$) (Figura 33) em relação ao controle. Nesta linhagem, a fragmentação foi observada a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ para todas as lectinas, e o efeito máximo de fragmentação observado para as lectinas ConA, Conbr e CFL nesta linhagem foi de $53 \pm 2,2$, $45 \pm 2,3$ e $33 \pm 1,9\%$, respectivamente, na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$).

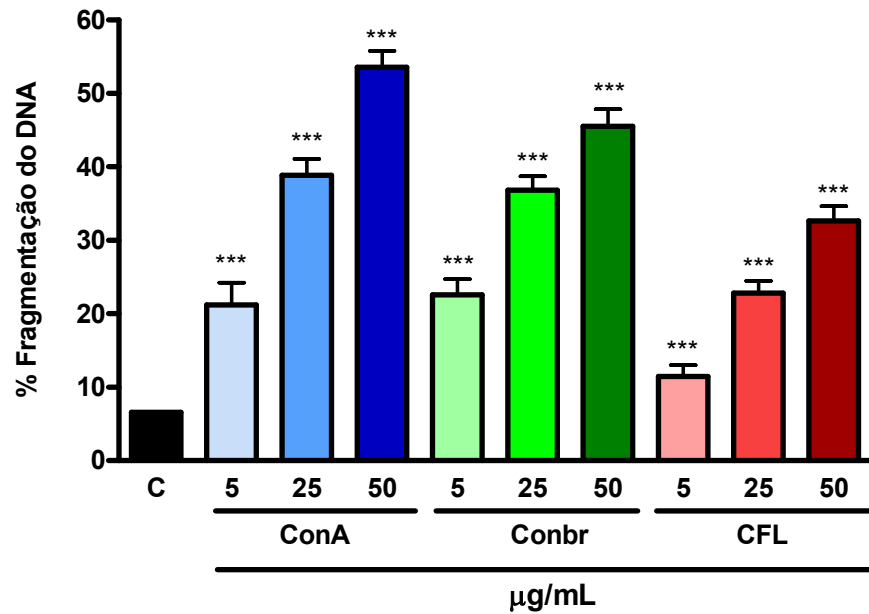


Figura 33: Análise da fragmentação do DNA de células MOLT-4 por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

As células HL-60 mostraram fragmentação do DNA após o tratamento das lectinas ($p < 0,001$) (Figura 34) em relação ao controle. Nesta linhagem, a fragmentação foi observada a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ para todas as lectinas, e o efeito máximo de fragmentação observado após o tratamento com as lectinas ConA, Conbr e CFL, foi de $46 \pm 2,3$, $43 \pm 2,1$ e $36 \pm 2,2\%$, respectivamente, na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$).

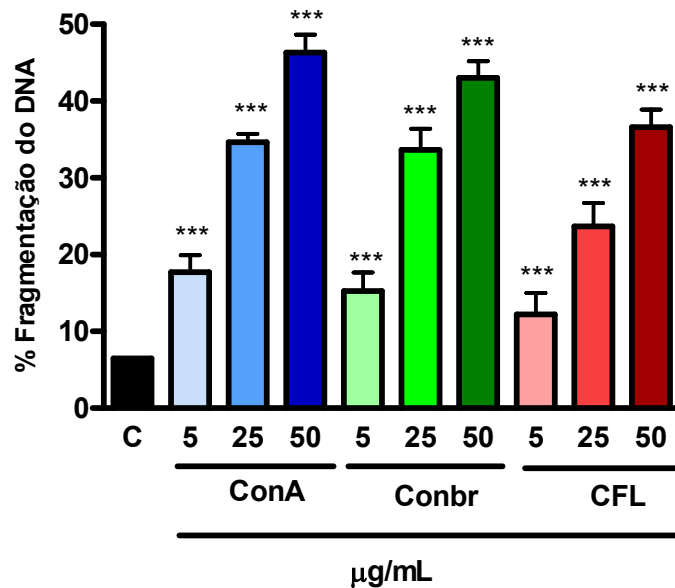


Figura 34: Análise da fragmentação do DNA de células HL-60 por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Esses dados sugerem que as lectinas estejam provocando a morte celular nas linhagens MCF-7, MOLT-4 e HL-60 por apoptose, devido a presença de DNA fragmentado encontrado nas amostras a partir das menores concentrações testadas de 5 $\mu\text{g/mL}$, ocorrendo aumento da fragmentação do DNA de maneira concentração-dependente.

4.2.4 Efeitos da lectinas no potencial transmembrânico mitocondrial

Nesse ensaio as células controle e tratadas foram incubadas com rodamina 123. Como a Rodamina é um corante catiônico e permeável a membrana celular, este é rapidamente sequestrado pela mitocôndria, emitindo alta fluorescência em células normais. Já em células que estejam em apoptose, especificamente pela via íntreca ou mitocondrial, a mitocôndria sofre alterações do potencial transmembrânico, ocorrendo efluxo da Rodamina 123 da mitocôndria, havendo uma emissão menor de fluorescência.

A análise do potencial transmembrânico mitocondrial foi realizada com as células MCF-7, MOLT-4 e HL-60, tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL. As concentrações utilizadas foram de 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

A figura 35 mostra o efeito das lectinas sobre a alteração no potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7. Foi observado que todas as lectinas promoveram despolarização da mitocôndria a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$, ($p < 0,001$). No entanto, ConA e Conbr mostraram-se mais ativas, pois promoveram $42 \pm 6,8$ e $42 \pm 2,6\%$ de despolarização na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e CFL apresentou $32 \pm 1,17\%$ de despolarização mitocondrial na mesma concentração.

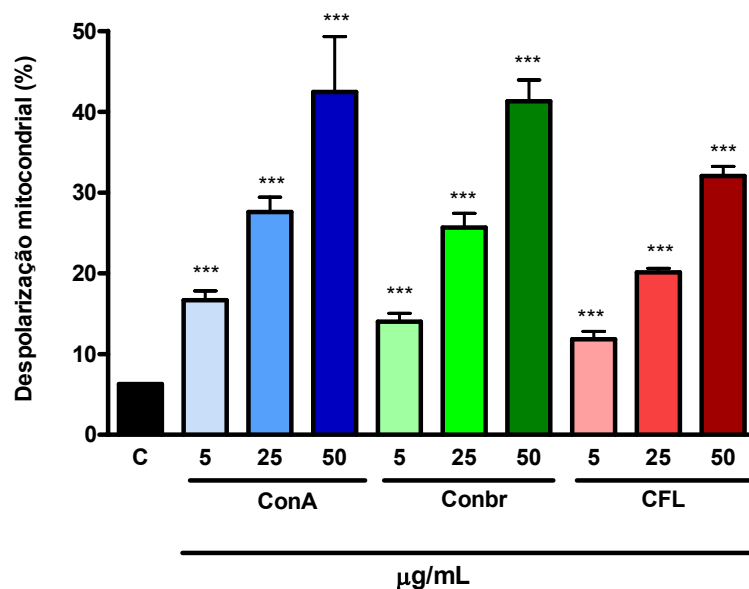


Figura 35: Avaliação da despolarização mitocondrial de células MCF-7 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

A figura 36 mostra o efeito das lectinas sobre a alteração no potencial de membrana mitocondrial das células MOLT-4. Foi observado que todas as lectinas promoveram despolarização da mitocôndria a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$, ($p < 0,001$). No entanto, para esta linhagem, ConA mostrou-se mais ativa em promover a despolarização, chegando a níveis de $42 \pm 1,9\%$ na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, diferente de Conbr e CFL que apresentaram $38 \pm 1,9\%$ e $26 \pm 1,6\%$ de despolarização respectivamente, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

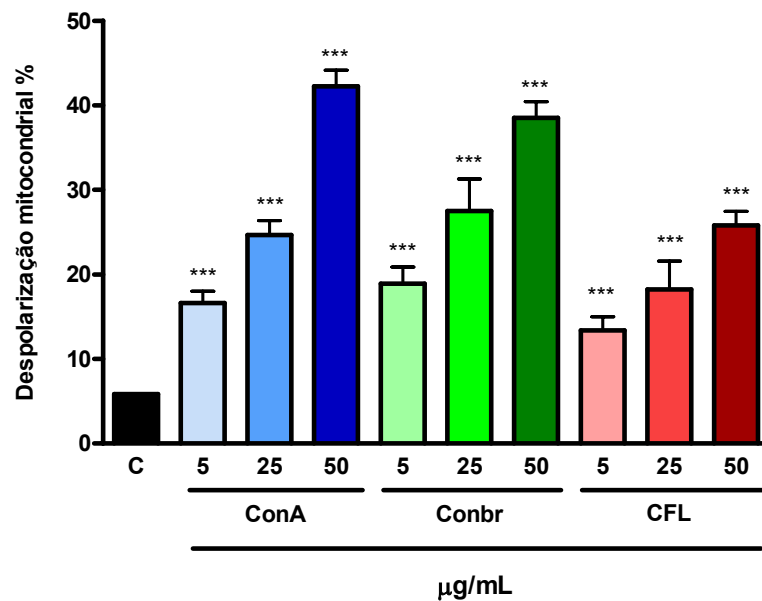


Figura 36: Avaliação da despolarização mitocondrial de células MOLT-4 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,001$ em relação ao controle.**

Na linhagem HL-60 (Figura 37), todas as lectinas promoveram despolarização da mitocôndria a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$), semelhantemente aos efeitos observados em MCF-7 e MOLT-4. ConA mostrou-se mais ativa em promover a despolarização chegando a níveis de $40 \pm 1,5\%$ na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, diferente de Conbr e CFL que apresentaram $38 \pm 1,7\%$ e $26 \pm 1,6\%$ de despolarização respectivamente, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

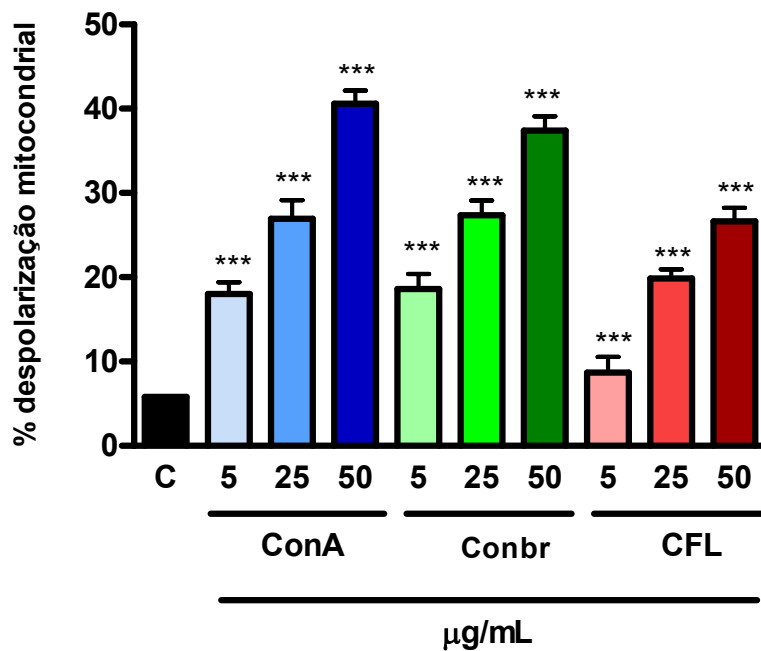


Figura 37: Avaliação da despolarização mitocondrial de células HL-60 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos em duplicata e foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

As plantas têm representado uma importante função como uma fonte de agentes anticancerígenos. Pelo menos 60% desses agentes usados são derivados de uma forma ou de outra de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Nos últimos anos, as lectinas vegetais, obtidas principalmente de sementes, têm despertado um grande interesse da comunidade científica por serem ferramentas úteis em métodos de identificação do câncer e do grau de metástase (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). Pesquisas recentes mostram os efeitos de indução de citotoxicidade, apoptose e necrose de certas lectinas contra células tumorais (KIM et al., 1993; KIM et al., 2000; SUEN et al., 2000; SEIFERT et al., 2008; LIU et al., 2009), o que as tornam potenciais agentes terapêuticos.

Gliconjugados na superfície de células tumorais são funcionalmente importantes para a interação da célula tumoral com o ambiente. A diferença na estrutura da superfície de membrana entre células normais e transformadas é responsável pela diferença dos efeitos tóxicos das lectinas de plantas nestas células, tornando-as mais específicas para células tumorais. A alteração nos carboidratos de superfície das células tumorais e o processo de adesão das mesmas é relacionado ao potencial metastático de tumores experimentais e possui uma função chave no câncer. Uma vez circulando na corrente sanguínea, as células cancerígenas podem se aderir a novas células em outras partes do corpo aonde podem se proliferar ou formar novas colônias tumorais. As lectinas podem inibir este processo de adesão, consequentemente inibindo a metástase (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005).

Considerando que várias lectinas vegetais têm sido utilizadas como agentes terapêuticos contra o câncer e que existem muitas lectinas cujo mecanismo de ação ainda não tem sido completamente elucidados, foi objetivo deste trabalho estudar a atividade das lectinas obtidas de leguminosas ConA, Conbr e CFL, que são lectinas estruturalmente relacionadas que possuem especificidade por resíduos de glicose/manose, utilizando modelo de células tumorais e não tumorais *in vitro*.

Inicialmente foi avaliado o potencial citotóxico das lectinas ConA, Conbr e CFL usando ensaios de citotoxicidade basal, MTT e CAN, sobre células normais (macrófagos peritoneais de camundongos SWISS) e linhagens de células tumorais murino (J774) e humanas (MCF-7, MOLT-4 e HL-60). A cultura de células *in vitro* tem sido uma importante

ferramenta para o estudo da atividade citotóxica de substâncias com possível atividade terapêutica (FRESHNEY, 2001).

As técnicas de MTT e CAN foram escolhidas por serem bastante utilizadas em ensaios de viabilidade celular, sendo capazes de detectar diferentes tipos de danos na célula. O MTT é endocitado, sendo convertido por células metabolicamente ativas em formazan, um composto azul insolúvel (LIU et al., 1997). Este sal tem sido usado com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade (MOSMANN, 1983; FAHEINA, 2006; KIM et al., 2009). A técnica de CAN é usada para determinar o conteúdo macromolecular total, sendo considerado um método direto, pois a quantidade de DNA é alterada proporcionalmente ao número de células (FORTUNATI; BIANCHI, 1990; MELO et al., 2003; SILVEIRA, 2007). Apesar desses testes não identificarem o mecanismo de ação dos compostos testados, elas revelam substâncias que tenham potencial antitumoral.

Todos os ensaios foram realizados com a cultura celular suplementada com 1% de SBF, pois foi verificado que as quantidades de soro que normalmente são usadas na cultura (10 e 20%) alteram os resultados de citotoxicidade realizados com lectinas, devido às glicoproteínas presentes no soro interagirem com as lectinas, impedindo estas de exercerem seu efeito sobre as células (RYBEREAU-GAYON et al., 1995; HEINRICH et al., 2005; FAHEINA et al., 2008).

Os resultados de citotoxicidade basal com macrófagos peritoneais demonstraram que as lectinas ConA, Conbr e CFL causaram baixo efeito citotóxico, detectado apenas pela técnica de MTT. Assim, as lectinas mostraram-se pouco tóxicas para essa cultura de células normais. Esses dados corroboram com ensaios de MTT feitos anteriormente no mesmo laboratório (FAHEINA, 2006), usando Conbr e CFL. O Etoposídeo, usado como controle positivo para as linhagens tumorais, também foi avaliado sobre os macrófagos peritoneais, mas não provocou efeito tóxico nestas células (dados não mostrados).

As lectinas foram citotóxicas para todas as linhagens tumorais testadas (Tabela 5 e 6). Para as células J774, MCF-7 e MOLT-4, o MTT foi o teste mais sensível, provavelmente porque ocorreu dano em nível de metabolismo anteriormente ao efeito ocorrido em nível macromolecular. No caso da linhagem leucêmica HL-60 as menores CI_{50} obtidas foram no ensaio de CAN, indicando que ocorreu um dano a nível macromolecular mais rápido do que as alterações no metabolismo (Tabela 6).

Com esses dados foi possível observar que as lectinas foram citotóxicas para as células tumorais testadas, havendo uma variação na ação das lectinas em cada linhagem, sendo ConA a mais tóxica para todas as linhagens, com valores de CI_{50} variando em torno de 10 μ g/mL. Já

Conbr mostrou valores de CI_{50} em torno de 20 μ g/mL e CFL em torno de 45 μ g/mL. ConA demonstrou ter uma ação mais tóxica sobre as linhagens, pelo fato desta encontrar-se completamente tetramérica em pH fisiológico, conseguindo exercer um efeito mais pronunciado que Conbr e CFL, que se apresentam num mistura de dímeros e tetrâmeros em pH fisiológico (SANS-APARÍCIO et al., 1997; CALVETE et al., 1999).

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de uma substância é um parâmetro importante quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica desta. Muitas drogas citotóxicas não tendem a ser seletivas em suas ações, agindo e danificando as células viáveis (ANAZETTI et al., 2003). As lectinas utilizadas neste trabalho mostraram-se mais ativas contra as linhagens tumorais, o que tornou estas moléculas interessantes para um estudo mais aprofundado do mecanismo de morte induzido nas linhagens.

Algumas drogas com potencial anticancerígeno agem causando dano no DNA de células tumorais, impedindo que estas continuem a se dividir e se multiplicarem, induzindo aberrações cromossômicas e quebras de fita de DNA destas células (ARAÚJO et al., 1998; PALITTI, 1998; SORTIBRÀN et al., 2006). Uma das técnicas bastante utilizada para testes de genotoxicidade é o teste do cometa, que consiste em um estudo microeletroforético do DNA danificado de células individuais, que foi primeiramente descrito por Ostling e Johanson (1984) e tem sido utilizado em vários trabalhos (COLLINS, 2004; WONG et al., 2005).

Os resultados de genotoxicidade mostraram que as lectinas ConA, Conbr e CFL promoveram uma elevação significativa no índice de dano no DNA (ID), a partir da menor concentração testada de 5 μ g/mL ($p < 0,001$), nas linhagens analisadas, MCF-7, MOLT-4 e HL-60. A frequência de danos causados pelas lectinas atingiu níveis superiores a 60% em MCF-7 (Tabela 7), 80% em MOLT-4 (Tabela 8) e 90% em HL-60 (Tabela 9) para todas as lectinas testadas. Observamos que a lectina ConA foi a que causou um maior índice de dano em todas as linhagens, sendo que a maior frequência de danos foi obtida em HL-60. Uma vez que as lesões genotóxicas podem perturbar a manutenção da integridade genômica e causar uma transformação maligna, o uso de drogas que causem lesões extensas ao DNA dessas células, pode induzir a morte celular programada e bloquear o desenvolvimento tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; HOANG et al., 2007; LEONETTI; ZUPI, 2007).

É importante ressaltar que essa técnica classifica os cometas de 0 a 4, e que cometas de nível 1 e 2 são passíveis de reparo pela expressão de genes envolvidos no mecanismo de reparo. No entanto, a presença de cometas de nível 3 e 4, mais especificamente o 4, tem sido descrito como o aspecto mais indicativo de células apoptóticas dentro dos parâmetros do teste

do cometa, pois a fragmentação do DNA durante a apoptose é caracterizada pela geração de quebras de fita-dupla do DNA, que são difíceis de ser reparadas (HARTMANN; SPEIT, 1997). Os resultados mostraram que os cometas de níveis 3 só apareciam a partir da concentração de 25 µg/mL e os de nível 4 só na última concentração de 50µg/mL para todas as lectinas e linhagens testadas (dados não mostrados).

Não foram encontrados na literatura estudos que relatem o efeito genotóxico de lectinas sobre células normais ou tumorais. No entanto, dados recentes mostraram que a lectina de *Bauhinia monandra* (BmoLL) não causou efeito genotóxico nem mutagênico sobre algumas cepas bacterianas de *S. typhimurium* and *E. coli* (SISENANDO et al., 2009).

A análise morfológica das células tratadas com as lectinas foi realizada usando microscopia de luz e objetiva com contraste de fase, que permite observar mudanças no padrão da cultura. Foi verificado que as lectinas ConA, Conbr e CFL causaram modificação da morfologia normal das culturas, havendo aparecimento de muitos grânulos citoplasmáticos, que foram vistos em todas as linhagens analisadas, e citoaglutinação, que foi observada mais claramente na linhagem MCF-7. Estudos prévios usando as lectinas de ConA e WGA sobre células normais e tumorais de hepatócito humanos, demonstraram que análises morfológicas ajudam na identificação de alterações no crescimento celular e aglutinação causada pelas lectinas (TAN et al., 2008). Essa aglutinação interfere no processo de adesão das células e também na sua capacidade proliferativa. Os efeitos citotóxicos foram revertidos quando as lectinas eram previamente desnaturadas pelo calor a 100°C por 1 hora, o que demonstra a necessidade da conformação nativa das lectinas para estas exercerem seus efeitos citotóxicos nas culturas.

Após análise da citotoxicidade e genotoxicidade das lectinas sobre as linhagens tumorais, foi objetivo do trabalho, identificar qual o mecanismo de morte celular causado pelas lectinas. Para isso, foram realizados os seguintes experimentos para avaliar se as lectinas promoveram morte por induzir apoptose ou necrose: análise morfológica por coloração diferencial com Brometo de Etídeo e Laranja de acridina (BE/LA), sendo a determinação da integridade de membrana celular, a análise da fragmentação do DNA e a alteração no potencial de membrana mitocondrial realizados por citometria de fluxo.

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento celular como um mecanismo homeostático para manter populações celulares em tecidos. Este tipo de morte também ocorre como um mecanismo de defesa como em reações imune ou quando células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (NORBURY; HICKSON, 2001). Existe uma ampla variedade de estímulos e condições, ambas fisiológicas e patológicas, que

podem desencadear a apoptose, mas nem todas as células morrem em resposta aos mesmos estímulos. Irradiação ou drogas usadas para a quimioterapia do câncer resultam em danos no DNA em algumas células, os quais podem levar a morte apoptótica (ELMORE, 2007). As principais alterações morfológicas observadas durante a apoptose são: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e alteração do potencial transmembrânico (GALLUZZI et al., 2007).

Diferentemente da apoptose, a necrose normalmente ocorre em consequência de uma lesão celular. Pesquisas recentes têm revelado que o início do processo necrótico pode depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim, eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer sequencialmente, onde numa concentração relativamente baixa do composto testado ocorre colapso no potencial de membrana mitocondrial e posteriormente, usando uma maior concentração, ocorre o rompimento da membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY, 2006).

A análise morfológica por coloração diferencial com BE/LA permite avaliar as características morfológicas das células, que distinguem apoptose ou necrose. Esse ensaio evidenciou que as células MCF-7, MOLT-4 e HL-60, tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL mostrou alterações características principalmente de apoptose já na concentração de 5µg/mL. No entanto, foi observada também uma quantidade crescente de células necróticas com o aumento das concentrações, pois no final da apoptose, denominada apoptose tardia, também ocorre lesões na membrana, o que leva a uma necrose secundária. Contudo, a apoptose parece ser o principal mecanismo de ação das lectinas em todas as linhagens estudadas (Figuras 26, 27 e 28). Esses resultados corroboram com os achados previamente reportados sobre os efeitos apoptóticos causados por lectinas (BARBOSA et al., 2001; GASTMAN et al., 2004; KULKARNI et al., 1998; LIU et al., 2009).

As lectinas ConA, Conbr e CFL diminuíram a viabilidade a partir de 25µg/mL, (Figura 29) na linhagem MCF-7. Esses dados corroboram com os ensaios realizados com BE/LA, aonde foi observado altos níveis de apoptose na concentração de 5µg/mL, e aparecimento de células necróticas a partir de 25µg/mL. Para as linhagens MOLT-4 e HL-60 houve uma leve diminuição da integridade da membrana para as todas as lectinas (Figuras 30 e 31). Como dito anteriormente, a perda da integridade de membrana celular é característico do mecanismo de morte celular por necrose, que pode se induzida secundariamente ao processo apoptótico causado por algumas substâncias.

Um importante marcador da morte celular por apoptose é a clivagem da cromatina internucleossomal e fragmentação do DNA por DNases, tais como AIF, Endonuclease G e CAD, que são liberadas da mitocôndria durante a apoptose e translocada para o núcleo, promovendo então a fragmentação do DNA (ELMORE, 2007; JOZA et al., 2001; NAGATA, 2000). O núcleo apoptótico pode ser distinguido pelo conteúdo de DNA hipodiplóide, comparado com o conteúdo diplóide do DNA de células normais (CURY-BOAVENTURA et al., 2003).

As lectinas ConA, Conbr e CFL induziram fragmentação do DNA nas células MCF-7 (Figura 32) a partir de 5µg/mL para Conbr e a partir de 25µg/mL para ConA e CFL. Já nas linhagens MOLT-4 (Figura 33) e HL-60 (Figura 34), as lectinas ConA, Conbr e CFL induziram a fragmentação do DNA a partir da menor concentração testada (5µg/m), ocorrendo um aumento dos níveis de fragmentação de maneira concentração-dependente. Esses dados coincidem com os resultados obtidos em nosso laboratório por extração do DNA e análise por eletrofores em gel de agarose, onde as linhagens MOLT-4 e HL-60 tratadas com as lectinas ConA, Conbr e CFL mostraram o padrão de DNA ladder característico de apoptose (dados não mostrados). Dados da literatura com a lectina de ConA mostram que essa lectina induziu apoptose de células macrofágicas PU5-1.8, onde foi observada a fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose a partir de 25 µg/mL e a liberação de citocromo *c* da mitocôndria (SUEN et al., 2000). Células de melanoma humano A375 tratadas com ConA a 25 µg/mL, apresentaram um aumento considerável de células em sub-G₁, com conteúdo hipodiplóide, característico de morte celular por apoptose (LIU et al., 2009).

Os resultados sugerem que o principal mecanismo de morte induzido pelas lectinas ConA, Conbr e CFL foi a apoptose; no entanto, em concentrações mais elevadas também ocorre necrose. De fato um agente citotóxico pode induzir apoptose ou necrose dependendo das concentrações testadas e do tempo de contato da substância com a célula (ROY, 2006).

Uma das vias de sinalização que iniciam o processo apoptótico é a via intrínseca, a qual envolve estímulos intracelulares que agem diretamente dentro da célula e causam alterações na mitocôndria, resultando em uma diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial e na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, levando a liberação de proteínas pró-apoptóticas normalmente seqüestradas do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol (SAELENs et al., 2004), como o citocromo *c*, Smac/DIABLO e HtrA2/Omi (DU et al., 2000; GARRIDO et al., 2006). Estas proteínas ativam a via mitocondrial dependente de caspase. O citocromo *c* se liga e ativa Apaf-1 e a pró-caspase 9,

formando o apoptossomo (CHINNAIYAN, 1999; HILL et al., 2004). O apoptossomo vai ativar as caspases 3 e 7, chamadas de caspases efetoras, que por sua vez vão clivar outros substratos protéicos da célula, resultando no processo apoptótico. No caso da via extrínseca da apoptose, iniciada por receptores de morte, ocorre ativação da caspase -8 que ativa diretamente a pró-caspase 3 ou cliva a proteína pró-apoptótica Bid, que migra para a mitocôndria, causando oligomerização de outros membros da família Bcl-2 e abertura do poro de membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas (VERHAGEN et al., 2000; ZIMMERNANN et al., 2001).

As lectinas ConA, Conbr e CFL promoveram despolarização mitocondrial de forma concentração-dependente nas células MCF-7 (Figura 35), MOLT-4 (Figura 36) e HL-60 (Figura 37), a partir de 5 µg/mL ($p < 0,001$). A lectina ConA foi quem produziu uma maior despolarização seguida de Conbr e CFL. Esses resultados corroboram com os dados existentes na literatura, onde Kulkarni e colaboradores (1998) mostraram que ConA (50 µg/mL) induz apoptose em fibroblastos FGH associada com diminuição do potencial transmembrânico, redução do níveis de cálcio intracelular e aumento da expressão de Bcl-2. Outros relatos com ConA (25µg/mL), sobre células de melanoma A375, demonstraram indução da disfunção mitocondrial devido a um aumento da despolarização causada pela lectina, liberação de citocromo *c* e aumento da atividade de caspases -8, -9 e -3, característicos de apoptose (LIU et al., 2009).

A literatura relata que a apoptose é o principal mecanismo de morte celular causado pelas lectinas. A lectina de farelo de arroz induz condensação da cromatina, externalização da fosfatidilserina, formação de DNA “ladder” em leucemia monoblástica humana U937 e também induz apoptose com parada do ciclo celular. Esse mecanismo é similar a aglutinina de germen de trigo (WGA), mas diferente da aglutinina de *Viscum álbum* (MIYOSHI, et al., 2001). O extrato de Mistetloe inibe a síntese de proteínas em células malignas e as lectinas extraídas desse extrato (ML-I, ML-II e ML-III) se dissociam em subunidades catalíticas antes de se translocar através da membrana e entrar no citoplasma (AGAPOV et al., 1999). O envolvimento da cascata de caspases e seus efeitos em substratos de células mieloleucêmicas U937, pela lectina ML-II, explica seu feito apoptótico (KIM et al., 2001), assim como da lectina ML-I (LYU et al., 2001).

Outro tipo de morte celular programada tipo II, a autofagia, é induzida em linhagens de hepatoma tratadas com 20µg/mL ConA, onde foi estabelecido que esta substância foi internalizada e preferencialmente localizada na mitocôndria, podendo então ativar uma série

de vias de sinalização (CHANG et al., 2007). Este trabalho identificou um novo tipo de mecanismo de ação para lectinas, a autofagia, demonstrando que a lectina de ConA causava redução do tumor hepático *in vivo*, e ainda ativou as células do sistema imune.

Corroborando com os dados pré-existentes para ConA, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as lectinas de leguminosas ConA, Conbr e CFL também promoveram apoptose. Mesmo apresentando estruturas diferentes, elas possuem afinidade pelo mesmo tipo de carboidratos (glicose/manose) e apresentaram um efeito bastante semelhante sobre as linhagens tumorais MCF-7, MOLT-4 e HL-60. No entanto, foi perceptível que, em todos os ensaios, a lectina ConA foi mais potente em seus efeitos

Os resultados deste trabalho confirmam a idéia que a atividade citotóxica causada pelas lectinas ConA, Conbr e CFL, sobre as células tumorais estudadas, ocorre principalmente por indução de morte celular por apoptose; no entanto, não foi possível identificar qual via apoptótica foi ativada por estas moléculas. Para isso seria necessário realizar ensaios de liberação de caspases específicas de cada via, como a caspase-8 (via extrínseca) e caspase-9 (via intrínseca). A liberação de citocromo *c* da mitocôndria também confirmaria se o efeito desta lectinas estaria ocorrendo por ativação da via intrínseca.

Provavelmente, as lectinas podem estar promovendo apoptose por dois mecanismos: 1- interagindo com gliconjugados de superfície celular, sendo endocitadas e atingindo a mitocôndria, atuando assim diretamente por via intrínseca, como acontece com ConA em outras linhagens celulares e com outras lectinas, como WGA (CHANG et al., 2007; GASTMAN et al., 2004; SUEN et al., 2000); 2- ligando-se a porções glicosiladas de receptores de morte, levando a sua ativação e transdução da sinalização apoptótica, por via extrínseca.

Desta forma, os dados obtidos neste trabalho demonstram um potencial antitumoral *in vitro* das lectinas de leguminosas ConA, Conbr e CFL *in vitro*, concordando com os dados existentes na literatura para ConA e também para outras lectinas conhecidas por seu potencial citotóxico, como as obtidas de Mistetloe. As lectinas ConA, Conbr e CFL demonstram ser potenciais drogas candidatas para o tratamento do câncer, sendo necessário ainda elucidar o mecanismo de morte apoptótica e realizar testes pré-clínicos *in vivo*.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ❖ As lectinas ConA, Conbr e CFL apresentaram baixa citotoxicidade para células normais de macrófagos peritoneais de camundongos SWISS, de acordo com as técnicas de MTT e CAN;
- ❖ As lectinas induziram citotoxicidade para as células tumorais utilizadas
- ❖ As lectinas provocaram alto índice de dano ao DNA nas linhagens tumorais MCF-7, MOLT-4 e HL-60;
- ❖ As lectinas causaram diminuição da viabilidade das células tumorais, com perda da integridade da membrana apenas nas concentrações mais elevadas;
- ❖ As lectinas causaram fragmentação do DNA nas linhagens tumorais MCF-7, MOLT-4 e HL-60;
- ❖ As lectinas causaram diminuição do potencial transmembrânico nas linhagens tumorais MCF-7, MOLT-4 e HL-60;
- ❖ Os testes de mecanismo de morte celular demonstraram que o principal tipo de morte causada pelas lectinas nas células tumorais foi apoptose;
- ❖ ConA mostrou-se a lectina mais ativa seguida de Conbr e CFL.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDULLAEV, F.I.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. Antitumor effect of plant lectins. **Natural Toxins**. v. 5, p.157–163. 1997.

AGAPOV, I.I.; TONEVITSKY, A.G.; MOYSENOVICH, M.M.; MALUCHENKO, N.V.; WEYHENMEYER, R.; KIRPICHNIKOV, M.P. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. **FEBS Letters**. v. 452, p.211–214. 1999.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**. v. 188, p.261-274, 2003.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S., AND BARRAL-NETTO, M. 1999. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**. v. 194, p.98–102, 1999.

ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, p. 435-445, 2004.

ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; CECCHI, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; TAKANASHI, C.S. Chromosome damage induced by DNA topoisomerase II inhibitors combined with γ -radiation *in vitro*. **Genet. Mol. Biol.** v.21, p. 407-413, 1998.

AUB, J.C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. **PNAS**. v. 50, p.613-619, 1963.

AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **PNAS**. v. 54, p. 39-399, 1965.

AZEVEDO, MARISTELA DE OLIVEIRA et al. **Técnicas de Biologia Molecular**. 212p. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003.

BANERJEE, S.; WANG, Z.; MOHAMMAD, M.; SARKAR, F.H.; MOHAMMAD, M. Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 492-496, 2008.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, p.673-678, 2001.

BIES, C.; LEHR, C-H.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.56, p. 425-435, 2004.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutri Cancer**. v. 18, p.1-29, 1992.

BOLAND, C.R.; MARTIN, M.A.; GOLDSTEIN, I.J. Lectin reactivities as intermediate biomarkers in premalignant colorectal epithelium. **Journal of Cellular Biochemistry**. Supplement 16G, p 173-180, 1992.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**. v. 119, p. 419, 1954.

BURDON, R.H.; GILL, V.; RICE-EVANS, C. Reduction of a tetrazolium salt and super oxide generation in human tumoe cells (Hela). *Free Radic Res Commun*. v. 18, p. 369-380, 1993.

BUSSING, A.; SUZART, K.; BERGMANN, J.; PFÜLLER, U.; SCHIETZEL, M.; SCHWEIZER, K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistetloe lectins. **Cancer Letters**. v. 99, p. 50-72, 1996.

BUSSING, A.; VERVECKEN, W.; WAGNER, M.; WAGNER, U.; PFULLER, M.; SCHIETZEL, M. Expression of mithocondrial Apo27 molecules and caspase-3 activation in human lyphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistetloe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. **Citometry**. v.37, p. 133-139, 1999.

CALVETE,J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA , M.; URBANKE, C.; ROMERO , A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS , M.V.; ROCHA , I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1430, p. 367-375, 1999.

CASSADY, J.M.; DOUROS, J.D. **Anticancer agents base don natural products models.** Academic Press, New York, 1980.

CHANDRA, N.; PRABU, M.M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Prot. Engineering.** v. 14, p. 857–866, 2001.

CHANDRA , N.R.; KUMAR, N.; JEYAKANI, J.; SINGH, D.D.; GOWDA, S.B.; PRATHIMA, M.N. Lectinb: a plant lectin database. **Glycobiology.** v. 16, p.938-946, 2006.

CHANG, C-P.; YANG, M-C.; LIU, H-S.; LIN, Y-S.; LEI, H-Y. Concanavalin A Induces Autophagy in Hepatoma Cells and Has a Therapeutic Effect in a Murine *In Situ* Hepatoma Model. **Hepatology.** v. 45, p. 286-296, 2007

CHINNAIYAN, A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. **Neoplasia.** v. 1, p.5-15, 1999.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal.** v. 326, p.1-16, 1997.

COLLINS, A.R.; HORVÁTHOVÁ, E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. **Biochemical Society Transactions.** v.29, p. 249-261, 2001.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology.** v.26, p. 249-261, 2004.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Review Cancer.** v. 2, p. 647-656, 2002.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products.** v. 60, p.52-60, 1997.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation.** v. 17, p. 153-163, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 100, p. 72-79, 2005.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical Nutrition**. v.23, p.721-732, 2003.

DANIAL, N.N.; KORSMEYE, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**. v. 116, p. 205–219, 2004.

DEBATIN, K.M.; KRAMMER, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. **Oncogene**. v. 23, p. 2950–2966, 2004.

DEL SOL, F.G.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. Crystal structures of *Cratylia Floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transition. **Journal of Structural Biology**. v. 158, p. 1–9, 2007.

DE MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V.I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 45, p. 425-445, 2005.

DÍAZ, C.L.; MELCHERS, L.S.; HOOYKASS, P.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.; KINJNE, J.W. Root lectins a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. **Nature**. v.338, p.579-581, 1989.

DOLL, R.; PETO, R. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute Advance Access**. v. 66, p. 1192– 1308, 1981.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c- dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**. v. 102, p.33-42, 2000.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BLAAUBOER, M.B.; BOOBIS, A.; CARERE, S.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, 193-236, 2002.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**. v. 35, p. 495-516, 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, 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.

ERDAL, H.; BERNDTSSON, M.; CASTRO, J.; BRUNK, U.; SHOSHAN, M.C.; LINDER, S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. **PNAS**. v. 102, p.192-197, 2005.

FAHEINA, G.V. **Avaliação do efeito citotóxico das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Erythrina velutina* sobre culturas macrofágicas**. 62p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

FAHEINA, G.V.; FREITAS, B.C.; SILVEIRA, A.L.; RAMOS, M.V.; ARAÚJO, D.A.M. **CYTOTOXICITY OF LECTINS IN BREAST CANCER CELLS: INFLUENCE OF FETAL BOVINE SERUM CONCENTRATION**. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008.

FAMSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal Plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**. v.63, p. 965-981, 1985.

FODSTAD, O.; PIHL, A. Effect of ricin and abrin on survival of L1210 leukemic mice and on leukemic and normal bone-marrow cells. **International Journal of Cancer**. v. 22, p.558-563, 1978.

FODSTAD, O.; PIHL, A. Synergistic effects of adriamycin and ricin on L1210 leukemic cells in mice. **Cancer Research**. v. 40, p.3735-3739, 1980.

FORTUNATI, E.; BIANCHI, V. Spectrophotometric Determination of Total Macromolecules for the Evaluation of Cellular Density in Cytotoxicity Tests. **Italian Tissue Culture Meeting**, v. 1, p. 18-25, 1990.

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

FRESHNEY, I. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**. v.17, p.213-230, 2001.

FREUND, D.A.; STEIN, J.; HURLEY, R.; ENGEL, W.; WOOMERT, A.; LEE, B. The kansas City Asthma Care Project: speciality differences in the cost of treating asthma. **Ann Allergy**. v. 60, p. 3-7, 1988.

GABIUS, H.J.; WALZEL, H.; JOSHI, S.S.; KRUIP, J.; KOJIMA, S.; GERKE, V.; KRATZIN, H.; GABIUS, S. The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from

mistletoe: Partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling on monocytic leukemia cells. **Anticancer Research**. v. 12, p.669–675, 1992.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classifications and pathophysiological implications. **Cell Death DiVer**. v 14, p.1237–1243, 2007.

GARRIDO, C.; GALLUZZI, L.; BRUNET, M. PUIG, P.E. DIDELOT, C.; KROEMER, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death Differetiation**. v. 13, p. 1423-1433, 2006.

GASTMAN, B.; WANG, K.; HAN, J.; ZHU, Z.; HUANG, X.; WANG, G.Q.; RABINOVICH, H.; GORELIK, E. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.316, p.263-271, 2004.

GATEHOUSE, A.M.R.; DAVISON, G.M.; NEWELL, C.A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, .D.O.; BURGESS, E.P.J.; GILBERT, R.J.C.; GATEHOUSE, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleracea*: Growth room trials. **Molecular Breeding**. v.3, p.49-63, 1997.

GREEN, D.R; EVAN, G. A matter of life and death. **Cancer Cell**. v, 1, p. 19–30, 2002.

HARTLEY, M.R.; LORD, J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1701, p.1-14, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A.; The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p.57-70, 2000.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**. v. 90, p. 183-188, 1997.

HARTWELL, J.L. **Plants Used Against Cancer**. Quarterman, Lawrence, MA. 1982.

HEINRICH, E.L.; WELTY, L.A.Y.; BANNER, L.R. OPPENHEIMER, S.B. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica**. v.107, p.335-344, 2005.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 407, p. 770-776, 2000.

HILDER, V.A.; POWELL, K.S.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, L.N.; SHI, Y.; HAMILTON, W.D.O.; MERRYWEATHER, A.; NEWLL, C.; TIMANS, J.C.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BOULTER, D. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. **Transgenic Research**. v.4, p.18-25, 1995.

HILL, M.M.; ADRAIN, C.; DURIEZ, P.J.; CREAGH, E.M.; MARTIN, S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **Embo Journal**. v. 23, p. 34-45, 2004.

HIRATA, H.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**. v. 187, p. 587–600, 1998.

HOANG, B.X.; LEVINE, S.A.; PHAM, P.; SHAW, D.G. Hypothesis of the cause e development of neoplasms. *European journal Cancer Preview*. v.16, p.55-61, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2007.

JANSSEN, O.; SCHEFFLER, A.; KABELITZ, D. In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells to the induction of programmed cell death (apoptosis). **Arzneimittelforschung**. v. 43, p.1221–1227, 1993.

JOHNSON, L.V.; WALSH, M.L.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **PNAS**. v. 77, p. 990-994,1980.

JOZA, N.; SUSIN, .S.A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W.L.; CHO, S.K.; LI, C.Y.; SASAKI, T.; ELIA, A.J.; CHENG, H.Y.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K.F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y.Y.; MAK, T.W.; ZUNIGA-PFLUCKER, J.C.; KROMER, G.; PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**. v. 410, p. 549-554, 2001.

KERR, J.F.; WINTERFORD, C.M.; HARMON, B.V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**. v. 73, p. 2013–2026, 1994.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H. CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26, p.239-257, 1972.

KIENLE, G.S. BERRINO, F.; BUSSING, A.; PORTALUPI, E.; OSENZWEIG, S.; KIENE, H. Mistletoe in cancer – a systematic review on controlled clinical trials. **European Journal of Medical Research**. v.8, p.109-119, 2003.

KIJNE, J. DÍAZ, C. DE PATER, S. LUGTENBERG, B. Lectins in the symbiosis between Rhizobia and leguminous plants. **Advance Lectin Research**. v. 5, p. 15-50, 1992.

KIM, H. YONN, S.C. LEE, T.Y. JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters**. v. 184, p.13-17, 2009.

KIM, M.; RAO, M.V.; TWEARDY, D.J.; PRAKASH, M.; GALILI, U.; GORELIK, E. Lectin-induced apoptosis of tumour cells. **Glycobiology**. v. 3, p.447–453, 1993.

KIM, M.S.; LEE, J.; SO, H.S.; LEE, et al., Activation of caspases cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Gen Pharmacology**. v. 34, p. 349-355, 2000.

KIM, M.S.; LEE, J.; SO, H.S.; LEE, K.M.; JUNG, B.H.; CHUNG, S.Y.; MOON, S.R.; KIM, N.S.; KO, C.B.; KIM, H. J.; KIM, Y.K.; PARK, R. Gamma interferon (IFN-gamma) augments apoptotic response to mistletoe lectin-II via upregulation of Fas/Fas L expression and caspase activation in human myeloid U937 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v. 23, p.55–66, 2001.

KIMURA, Y.; OKUDA, H. Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine on tumor growth and lung carcinoma-bearing mice. *J. Pharm Pharmacology*. v.52. p. 1287-1295, 2000.

KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: *The Practice of Medicinal Chemistry*. Ed. by Wermuth CG. **Academic Press Limited**. p. 102-114, 1996.

KOLENKO, V.M.; UZZO, R.G.; BUKOWSKI, R.; FINKE, J.H. Caspase-dependent and – independent death pathways in cancer therapy. **Apoptosis**. v. 5, p. 17–20, 2000.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L., BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiology Reviews**. v. 87, p. 99–163, 2007.

KRUEGER, A.; FAS, S.C.; BAUMANN, S.; KRAMMER, P.H. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. **Immunological Reviews**. v.193, p.58–69, 2003.

KULKARNI, G.V.; LEE, W.; SETH, A.; MCCULLOCH, C.A. G. Role of Mitochondrial Membrane Potential in Concanavalin A-Induced Apoptosis in Human Fibroblasts. **Experimental Cell Research**. v. 245, p. 170–178, 1998.

LEE, K.H. Novel Agents from Higher Plants. **Medicinal Research Reviews**. v.19, p.569-596, 1999.

LEIBOVICI, J.; AVICHEZER, D.; GILBOS-GARBER, N. Effect of lectins on tumorigenicity of AKR lymphoma cells of varying malignancy. **Anticancer Research**. v. 6, p. 1411–1415, 1986.

LEIST, M.; WENDEL, A. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by concanavalin A. **Journal of Hepatology**. v.25, p.948-959, 1996

LEONETTI, C.; ZUPI, G. Targeting different signaling pathways with antisense oligonucleotides combination for cancer therapy. *Current Phar. Des.* v.13, p.463-470, 2007.

LI, C.; SIMEONE, D.M.; BRENNER, D.E.; ANDERSON, M.A.; SHEDDEN, K.A.; RUFFIN, M.T.; LUBMAN, D.M. Pancreatic Cancer Serum Detection Using a Lectin/Glyco-Antibody Array Method. **Journal of Proteome Research**. v. 8, p.483-492, 2009.

LI, L.Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**. v. 412, p. 95-99, 2001.

LIS, H; SHARON, N. The Biochemistry of Plant Lectins (PHYTOHEMAGGLUTININS). **Annals Review of Biochemistry**, v. 42, p. 541-574, 1973.

LIU, B.; LI, C-Y.; BIAN, H-J.; MIN, M-W.; CHEN, L-F.; BAO J-K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 482, p. 1–6, 2009.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUVERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, p 581-592, 1997.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBROW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. **Teratog. Carcinog. Mutag.** v.19, p. 109-119, 1999.

LYU, S.Y.; PARK, W.B.; CHOI, K.H.; KIM, W.H. Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album var coloratum* agglutinin in HL-60 cells. **Bioscience. Biotechnology and Biochemistry**. v.65, p. 534-541, 2001.

MCGAHON, A.J.; MARTIN, S.M.; BISSONNETE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**. v.46, p. 153-185, 1995.

MAQBOOL, S.B.; RIAZUDDIN, S.; LOC, N.T.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; CHRISTOU, P. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. **Molecular Breeding**. v.7, p. 85-93, 2001.

MELO, P.S.; CAVALCANTE, H.M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**. v. 142, p. 143-151, 2003.

MIYOSHI, N.; KOYAMA, Y.; KATSUNO, Y.; HAYAKAWA, S.; MITA, T.; OHTA, T.; KAJI, K.; AND ISEMURA, M. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. **Journal of Biochemistry**. v.130, p.799–805, 2001.

MOREIRA, R.A.; AINOUEZ, I.L.; DE OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86, p. 211–218, 1991.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**. v. 26, p.113-120, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MURDOCK, L.L.; HUESING, J.E.; NIELSEN, S.S.; PRATT R.C.; SHADE R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**. v. 29, p.85-89, 1990.

NACHBAR, M.S.; OPPENHEIM, J.D.; AULL, F. Interaction of lectins with plasma membrane glycoproteins of the Ehrlich ascites carcinoma cells. **Biochimica and Biophysica Acta**. v. 419, p.512–529, 1976.

NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. **Experimental Cell Research**. v.256, p.12-18, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of New Drugs over the Last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p.461-477, 2007.

NORBURY, C.J.; HICKSON, I.D. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review Pharmacology Toxicology**. v.41, p.367-401, 2001.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Research**. v. 20, p. 462-466, 1960.

OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. MOREIRA, R.A. Isolation and Partial Characterization of a Lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Revista Brasileira de Botânica**. v.14, p. 61-66, 1991.

ORTHOLAND, J.Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opininn Chemical Biology B**. v. 271, p.280, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation – induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 123, p.291-298, 1984.

OYAMA, K.O.N. **Avaliação comparativa da citotoxicidade *in vitro* dos solvents utilizados no retratamento endodôntico**. 2003. 111f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PALITTI, F. Mechanisms of origin of chromosomal aberrations. **Mutation Research**. v. 404, p. 133-137, 1998.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.I.; DEVESA, S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**. v.37, Suppl 8, p.S4-66, 2001.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PETIT, P.X. Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane Potential in Plant Mitochondria. **Plant Physiology**. v.98, p. 279-286, 1992.

PEUMANS W.J.; VAN DAMME, E.J. The role of lectins in plant defense. **Histochemical Journal**. v. 27, p.253-271, 1995.

PEUMANS W.J.; VAN DAMME, E.J. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p.132-138, 1996.

PRYME, I.F.; PUSZTAI, A.J.; BARDOCZ, S. A diet containing the lectin phytohaemagglutinin (PHA) slows down the proliferation of Krebs II cell tumours in mice. **Cancer Letters**. v. 76, p.133–137, 1994a.

PRYME, I.F.; PUSZTAI, A.J.; BARDOCZ, S. The initial growth rate of Krebs II ascites cell tumours in mice is slowed down by the inclusion of phytohaemagglutinin in the diet. **International Journal Oncology**. v. 5, p.1105–1107, 1994b.

PRYME, I.F.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A.; EWEN, S.W.; PFÜLLER, U. A mistetloe lectin (ML-I)-containing diet reduces the viability of a murine non-Hodgkin lymphoma tumor. **Cancer Detecion and Prevention**. v. 28, p.52-56, 2004.

RAI, N.K.; TRIPATHI, K.; SHAMA, D.; SHUKLA V.K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **The International journal Lower Extremity Wounds**. v. 4, p.138-144, 2005.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, L.R.; BANDEIRA, G.P.; DEBRAY, H. Evidence of an endogenous lectin receptor in seeds of the legume *Cratylia floribunda*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 14, p. 195-202, 2002.

RANG, H.P. DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAO, K.V.; RATHORE, K.S.; HODGES, T.K.; FU, X.; STOGER, E.; SUDHAKAR, D.; WLIAMS, S.; CHRISTOU, P.; BHARATI, M.; BOWN D.P.; POWELL, K.S.; SPENCE, J.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Expression, of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **Plant Journal**. v. 15, p. 469 477, 1998.

RAYMOND, M.A.; MOLLIKA, L.; VIGNEAULT, N.; DESORMEAUX, A.; CHAN, J.S.; FILEP, J.G.; HEBERT, M.J. Blockade of the apoptotic machinery by ciclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. **FASEB J**. v. 17, p.515-517, 2003.

REDDY L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 99, p. 1– 13, 2003.

REED J.C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. **Cancer Cell**. v. 3, p. 17–22, 2003.

REED, J.C. Drug Insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. **Nature Clinical Practice Oncology**. v. 3, p. 388 – 398, 2006.

REEKE, G.N.; JR.; BECKER, J.M.; EDELMAN, G.M. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry*. v. 250, p. 1525-1547, 1975.

REFSNES, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. On the toxic proteins abrin and ricin. Studies of their binding to and entry into Ehrlich ascites cells. **Journal of Biological Chemical**. v.249, p.3557–3562, 1974.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, p.356, 2003.

ROBINSON, E.; MEKORI, T. Studies on the effect of phytohemagglutinin on ascites tumor in mice. **Israel Journal of Medical Sciences**. v. 7, p.83–89, 1971.

ROCHA, A.B. LOPES, R.M. SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 1, p. 364-369, 2001.

RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J.C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biol Cell**. v. 5, p. 1-8, 1986.

ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and Proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U937(a human monocytic cell line). **Pharmacological Research**. v. 53, p.293-302, 2006.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**. v.18, p.589-613, 2001.

RYBEREAU-GAYON, G.; JUNG, M.L.; BECK, J.P.; ANTON, R. Effect of Fetal Calf Serum on the Cytotoxic Activity of mistetloe (*Viscum album L.*) Lectins in Cell Culture. **Phytotherapy Research**. v.9, p. 336-339, 1995.

RYBEREAU-GAYON, G.; JUNG, M.L.; FRANTZ, M.; ANTON, R. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L extracts or mistletoe lectins. **Anticancer Drugs**. v.8, p.3-8, 1997.

SAELEN, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEEL P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**. v. 23, p. 2861-2874, 2004.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**. v. 405, p. 114-118, 1997.

SCHOFFSKI, P.; RIGGERT, S.; FUMOLEAU, P. et al., Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. **Annual Oncology**. v. 15, 1816-1824, 2004.

SCHUMACHER, U.; HIGGS, D.; LOIZIDOU, M.; PICKERING, R.; LEATHEM, A.; TAYLOR, I. *Helix pomatia* agglutinin binding is a useful prognostic indicator in colorectal carcinoma. **Cancer**. v. 74, p.3104-3107, 1994.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; BROOKS, S.A.; LEATHEM, A.J. Lectin-binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. **Journal Histochemical and Cytochemical**. v. 43, p.275-281, 1995a.

SCHUMACHER, U.; STAMOULI, A.; ADAM E.; PEDDIE, M.; PFULLER, U. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines. **Glycoconjugates Journal**. v. 12, p.250-257, 1995b.

SEIFERT, G.; JESSE, P.; LAENGLER, A.; REINDL, T. LÜTH, M.; LOBITZ, S. HENZE, G.; PROKOP, A.; LODE, H. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. **Cancer Letters**. v. 264, p.218-228, 2008.

SHARON, N.; GOLDSTEIN I.J. Lectins: More than insecticides. **Science**. v. 282, p.1049, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N. lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**. v.282, p.2753-2763, 2007.

SILVEIRA, A.L. **Toxicidade Pré-Clínica dos Análogos das Riparinas I, II, III utilizando modelos *in vitro***. 68p. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2007.

SINGH, M.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

SISENANDO, H.A.A.A.C.N.; MACEDO, M.F.S.; SATURNINO, A.C.R.D.; COELHO, L.C.B.B.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of the genotoxic potential of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, p.303-308, 2009

SJÖSTRÖM, M.; KOLMAN, A.; CLEMEDSON, C.; CLOTHIER, R. Estimation of human blood LC50 values for use in modeling of in vitro-in vivo data of the ACuteTox project. **Toxicology in Vitro**. v. 22, p. 1405-1411, 2008.

SRINIVAS, V.R.; REDDY, G.B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C.P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochemical et Biophysica Acta**. v. 1527, p.102–111, 2001.

SNODIN, D.J. An EU perspective on use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. **Toxicology Letters**. v. 127, p.161-168, 2002.

SORTIBRÁN, A.N.C.; TÉLLEZ, M.G.O.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R.R. Genotoxic profile of inhibitors of topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) in a mitotic recombination and sex-chromosome loss eye assay drosophila melanogaster. **Mutation research**. v. 604, p. 83-90, 2006.

SPILATRO, S.R.; COCHRAN, G.R.; WALKER, R.E.; CABLISH, K.L.; BITTNER, C.C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissue. **Plant Physiology**. v.110, p.825–834, 1996.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 10, p. 1027–1039, 1996.

STILLMARK, R. **Über, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen anderen Euphorbiaceen**, Thesis, University o Dopart, Dopart, 1888.

STOGER, E.; WILLIAMS, S.; CHRISTOU, P.; DOWN, R.E.; GATEHOUSE, J.A. Expression of the insecticidal lectin from the snowdrop (*galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: Effect on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. **Molecular Breeding**. v.5, p.65-73, 1999.

SUEN, Y.K.; FUNG, K.P.; CHOY, Y.M; LEE, C.Y.; CHAN, C.W.; KONG, S.K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**. v. 5, p.369–377, 2000.

TAATJES, D.J.; SOBEL, B.E.; BUDD, R.C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochemical Cell Biology**. v. 129, p.33–43, 2008.

TAN, L.; JIA, X.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; TANG, H.; YAO,S.; XIE, Q. Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**. v. 383, p.130-136, 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, .C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 35, p. 206-221, 2000.

TINJUANGJUN, P.; LOC, N.T.; GATEHOUSE, A.M.R. GATEHOUSE, J.A. CHRISTOU, P. Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. **Molecular Breeding**. v. 6, p.391-399, 2000.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals. **Toxicology in Vitro**. v. 18, p. 483-491, 2004.

VAN EIJSSEN, R.R.; DÍAZ, C.L.; DE PATER B.S.; KIJNE, J.W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Plant Molecular Biology**. v. 29, p. 431-439, 1995.

VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**. v.102, p.43–53, 2000.

VERMEULEN K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N.; The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**. v. 36, p. 131-149, 2003.

WONG, V.W.C.; SZETO, Y.T.; COLLINS, R. A.; I.F.F. BENZIE. THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Current Topics in Nutraceutical Research**. v. 3, p. 1-14, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Ficha de informação nº 297. Fevereiro de 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>> Acessado em: 16 de abril de 2009.

WIERZBA-ARABSKA, E.; MORAWIECKA, B. Purification and properties of lectin from potato tubers and leaves; interaction with acid phosphatase from potato tubers. **Acta Biochimica Polonica**. v. 34, p. 407-420, 1987.

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**. v. 284, p. 555-556, 1980.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology Therapy**. v. 92, p. 57-70, 2001.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.D. TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**. v.18, p.153-163, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)