

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS**

MONIQUE MARTINS JORDÃO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÁLCOOL E
ÁCIDO PERÍLICO EM CÉLULAS DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

Orientadora: Lídia M^a. da Fonte de Amorim



NITERÓI
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MONIQUE MARTINS JORDÃO DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÁLCOOL E
ÁCIDO PERÍLICO EM CÉLULAS DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Oncologia Molecular
do Departamento de Biologia Celular e Molecular,
Instituto de Biologia – UFF

Dissertação submetida à
Universidade Federal
Fluminense como requisito
parcial para a obtenção do
grau de Mestre em
Neurociências.

Orientadora: Lídia M^a. da Fonte de Amorim

Niterói
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

De Oliveira, Monique Martins Jordão.

Avaliação antitumoral do álcool perílico e ácido perílico em células de leucemia mielóide crônica e glioblastoma multiforme. Monique Martins Jordão de Oliveira – Niterói, RJ: [s.n.], 2010. xv, 77p.

Dissertação – Mestrado em Neurociências – Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Álcool Perílico 2. Ácido Perílico 3. Glioblastoma Multiforme
4. Leucemia Mielóide Crônica I. Título.

MONIQUE MARTINS JORDÃO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO ANTITUMORAL DO ÁLCOOL E
ÁCIDO PERÍLICO EM CÉLULAS DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E
GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Dissertação submetida à
Universidade Federal Fluminense
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Neurociências.

Niterói, 11 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Mauro Velho de Castro Faria – UERJ (Membro 1)

Dr. Maurício Afonso Verícimo – UFF (Membro 2)

Dr^a. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – UFF (Membro 3)

Dr^a. Patricia Burth – UFF (Revisora e suplente)

Dr^a. Lídia M^a. da F. de Amorim – UFF (Presidente)

**NITERÓI
2010**

*Dedico este trabalho a todos que,
assim como eu, cuidaram de alguém
vítima do câncer e precisaram
enfrentar todo o mal que ele pode
causar... E por isso sentem que
precisam e podem fazer algo mais.*

AGRADECIMENTOS

À Dr. Lídia Maria da Fonte de Amorim, por todos os ensinamentos desde a graduação, dedicação e esforço durante esses anos de orientação e encaminhamento no mundo científico.

À Professora Thereza Quírico e Dr. Clovis Orlando, pela colaboração que tornou possível a realização deste trabalho. Ao Professor Mauricio Verícimo, pela incansável ajuda nos experimentos. À Professora Helena Carla e seu aluno Plínio Sathler, também pela colaboração.

À banca desta dissertação, por ter aceitado o convite.

À Professora Patrícia Burth, por toda ajuda e pela excelente revisão deste trabalho.

Aos alunos do laboratório da Prof. Thereza Quírico, por suportarem minha constante presença lá. Em especial ao Paulo Emílio, pela enorme contribuição e ajuda nos experimentos, sem contar pela companhia até altas horas durante a semana e feriados. Muito obrigada mesmo!

Aos meus pais, por serem os melhores pais do mundo! Creio não ser necessário dizer o porquê. Amo vocês! Em especial à minha mãe por demonstrar perseverança e me lembrar sempre da importância de estudar e entender o câncer.

Ao meu marido Diogo (como é bom poder chamá-lo assim!), meu grande amor, pela simples presença, apoio incondicional, dedicação e paciência nas minhas diversas horas de *stress*. Não tenho palavras... Lindo, te amo além da conta!!!!

À minha avó Lucy (in memoriam). Por ter sido um exemplo de luta, garra e força.

À minha família e amigos, pelo incentivo e confiança depositados durante toda minha vida acadêmica.

Aos meus amigos de laboratório, Diogo, Elaine, Daniel, Bruno, Fabyane, Maria, Priscila, Talíria, Prof. Francisco Abreu (Chicão) e todos os estagiários, por terem agüentado minhas reclamações, loucuras, crises de mal-humor, pela ajuda prestada e por toda descontração e gargalhadas, nos momentos tensos ou não.

Às meninas do laboratório de Virologia Molecular, por toda companhia até tarde, finais de semana e feriados (não é, Juliana?!).

E a todas as pessoas que, embora não nomeadas, participaram e me deram apoio durante a realização deste trabalho. Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente. Todos vocês são co-autores deste trabalho.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!

“Podemos dizer que o cientista vive em dois mundos. De um lado, o mundo ordinário, o mundo público, que ele divide com os outros seres humanos. De outro, um mundo privado onde a pesquisa transcorre; um mundo com paixões, exaltações, desesperos; mundo onde se pode subir aos céus ou descer aos infernos”.

François Jacob

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer	01
1.1.2 Leucemia Mielóide Crônica	02
1.1.3 Glioblastoma Multiforme	06
1.2 Produtos Naturais e Fármacos Anticancerígenos	09
1.2.1 POH	11
1.2.2 PA	15
1.3 Triagem de Novos Fármacos	16
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Substâncias testadas	21
3.2 Células e cultura celular	21
3.2.1 K562	21
3.2.2 A172	21
3.3 Ensaio para avaliação de citotoxicidade celular	22
3.3.1 Células e compostos	22
3.3.2 Incorporação do corante vital Vermelho Neutro	23
3.3.3 Ensaio de redução do MTT	23
3.4 Análise <i>in silico</i> dos parâmetros ADMET	24
3.5 Avaliação da apoptose por eletroforese de DNA	25
3.5.1 Extração do DNA	25
3.5.2 Eletroforese em gel de agarose	26
3.6 Análise morfológica da apoptose	26
3.7 Dosagem de proteínas	27
3.8 Avaliação da apoptose por Western Blot	28
3.8.1 Tratamento das células	28
3.8.2 Western Blot	28
3.9 Zimografia	30
3.10 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Citotoxicidade do POH e PA	32

4.1.1	Análise pela redução do MTT	32
4.1.2	Incorporação do Vermelho Neutro	33
4.2	Análise do potencial teórico do POH e PA como drogas de mercado	35
4.3	Análise das características morfológicas das células tratadas com POH e PA	37
4.4	Análise da apoptose	39
4.4.1	Análise pela fragmentação do DNA	39
4.4.2	Análise morfológica da apoptose	41
4.4.3	Análise da expressão de caspase-3	45
4.5	Análise da expressão de NFκB	48
4.6	Análise da expressão de metaloproteases	51
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL - Abelson Leukemia Vírus

ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ATP - Adenosina trifosfato

BCR - Breakpoint Cluster Region

cLogP - Coeficiente de partição octanol/água calculado

DHPA – Ácido dihidroperílico

DMEM F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium – com mistura de nutrientes F12

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra acético

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

ERK: Quinase Regulada por Sinais Extracelulares (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)

GBM – Glioblastoma Multiforme

GTPases – Família de enzimas que hidrolisam GTP

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática

IL-2 – Interleucina-2

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LDH – Lactato Desidrogenase

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

LogS - Solubilidade em água

MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MMP-2 – Metaloprotease-2

MMP-9 – Metaloprotease-9

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide

NFκB – Fator Nuclear Kappa B

NGF - Fator de Crescimento Neuronal (*Neuronal Growth Factor*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Ácido perílico

PCO - Aldeído perílico

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PDGF – Fator de Crescimento de Derivação Plaquetária (*Platelet-derived Growth Factor*)

PI3 – Fosfatidilinositol 3

POH – Álcool Perílico

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

Raf – Proteína Raf

Ras – Proteína Ras

SDS – Duodecilsulfato de Sódio

TAE - Tampão Tris-acetato EDTA

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

TBS – Tampão Tris-salino

TBST - Tampão Tris-salino + Tween

TE - Tris-HCl EDTA

TGF-β - Fator de Transformação do Crescimento Beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral-α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

Tris – Tri (hidroximetil)-amino-metano

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Classificação dos tumores astrocíticos, estabelecida pela OMS	6
Tabela 2: Anticorpos usados na técnica de western blot	29
Quadro 1: Descrição das atividades do POH	13
Quadro 2: Descrição das atividades do PA	16
Quadro 3: Comparação estatística dos valores de IC ₅₀ do POH e do PA e entre as diferentes células	35
Figura 1: A formação do cromossomo Philadelphia	3
Figura 2: Vias envolvidas na sinalização do oncogene BCR-ABL	4
Figura 3: Imatinibe (Gleevec)	5
Figura 4: Representação simplificada das vias de tradução de sinal e alvos terapêuticos relevantes em células de glioma e células endoteliais associadas a tumor	8
Figura 5: Estrutura química dos monoterpenos limoneno, POH e PA	11
Figura 6: Transformação do limoneno em álcool perílico pela ação da enzima limoneno-7 monooxigenase	12
Figura 7: Transformação do álcool perílico em aldeído perílico e deste em ácido perílico	15
Figura 8: Avaliação da viabilidade de células K562 pelo ensaio de redução do MTT	32
Figura 9: Avaliação da viabilidade de células A172 pelo ensaio de redução do MTT	33
Figura 10: Comparação da viabilidade celular entre as linhagens K562 e A172	33
Figura 11: Avaliação da viabilidade de células K562 pelo ensaio de incorporação do corante vital Vermelho Neutro	34
Figura 12: Avaliação da viabilidade de células A172, pelo ensaio de incorporação do corante vital Vermelho Neutro	34
Figura 13: Comparação da viabilidade celular entre as linhagens K562 e A172 pela técnica de incorporação do vermelho neutro	35
Figura 14: Comparação dos valores de “ <i>druglikeness</i> ” e “ <i>drug score</i> ” do POH, PA e etoposídeo	36
Figura 15: Risco de toxicidade para POH, PA e etoposídeo	37
Figura 16: Efeito do POH e PA na morfologia de células K562	38

Figura 17: Efeito do POH e PA na morfologia de células A172	39
Figura 18: Eletroforese do DNA das células tratadas	40
Figura 19: Morfologia das células K562 após tratamento com POH e PA por 24 horas	41
Figura 20: Gráfico representativo da contagem de células K562 com características viáveis, mortas e apoptóticas	42
Figura 21: Morfologia das células A172 após tratamento com POH e PA por 24 horas	43
Figura 22: Morfologia das células A172 após tratamento com POH por 24 horas	44
Figura 23: Gráfico representativo da contagem de células A172 com características viáveis e mortas	45
Figura 24: Dosagem dos níveis de caspase-3 ativada das células K562 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot	46
Figura 25: Dosagem dos níveis de caspase-3 ativada das células K562 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot	47
Figura 26: Dosagem dos níveis de caspase-3 ativada nas células A172 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot	47
Figura 27: Dosagem da expressão de NFκB das células K562 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot	48
Figura 28: Dosagem da expressão de NFκB das células K562 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot	49
Figura 29: Dosagem da expressão de NFκB das células A172 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot	50
Figura 30: Dosagem da expressão de NFκB das células A172 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot	50
Figura 31: Resultado da zimografia de células K562 tratadas com POH e PA por 24 horas	51
Figura 32: Gráficos resultantes da análise dos géis de zimografia das células K562	52
Figura 33: Resultado da zimografia de células A172 tratadas com POH e PA por 24 horas	52
Figura 34: Gráficos resultantes da análise dos géis de zimografia das células A172	53

RESUMO

Leucemia Mielóide Crônica e Glioblastoma Multiforme são cânceres de grande incidência e de difícil tratamento, havendo, portanto, uma constante procura por terapias mais eficientes. A maior parte dos produtos naturais são candidatos a se tornarem drogas antitumorais, dentre eles os terpenos apresentam destaque. O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos do álcool perílico, terpeno de origem vegetal utilizado no tratamento de diversos tumores, e seu metabólito majoritário circulante, PA, nas células de leucemia (K562) e glioma (A172), através de ensaios citotóxicos, análise de apoptose, proliferação e ativação de gelatinases. Os resultados mostraram que ambas as técnicas de análise citotóxica utilizadas, incorporação do corante vital vermelho neutro e redução do MTT, foram sensíveis aos efeitos do POH e PA. O POH se mostrou mais eficiente em causar alterações morfológicas nas células, bem como em induzir apoptose. Nos ensaios de proliferação e ativação de gelatinases, ambos os compostos se comportaram de forma semelhante. POH, diferente do PA, também apresentou efeito sobre os prolongamentos celulares da linhagem A172. De maneira geral, POH possui maior efeito do que o PA e a linhagem K562 mostrou maior sensibilidade nos experimentos de apoptose. Experimentos futuros poderão avaliar o comportamento dos dois compostos sobre os diversos níveis das cascatas de sinalização que controlam proliferação e/ou morte celular.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia and glioblastoma multiforme are types of cancer with high incidence and bad prognostic. Therefore, there is a constant search for more effective therapies. Most natural products are candidates to become antitumour drugs, among them the terpenes, which have antimitotic activity, are of great medical interest. In the present work, we compared the effect of perillyl alcohol (POH), a vegetal-derived terpene currently used in the treatment of several tumours, and its circulating majority metabolic, perilic acid (PA), in leukemia (K562) and glioma (A172) cells, using cytotoxicity assays, apoptosis, proliferation and gellatinases activation analysis. The overall results indicated that both cytotoxic techniques used, the vital dye neutral red incorporating and MTT reduction, were sensitive to POH and PA effects. POH proved to be more effective in causing morphological changes in cells and inducing apoptosis. In the proliferation and gellatinases activation assays, both compounds had similarly effects. POH, unlike PA, also presented effect on A172 cellular extents. In general, POH had greater effect than PA and K562 cells showed higher sensitivity in the apoptosis experiments. It is important to conduct further experiments in an attempt to analyze the behavior of POH and PA on the various levels of signaling cascades that control proliferation and/or cell death.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer, neoplasia ou tumor maligno são sinônimos usados para denominar uma classe de doenças caracterizada pelo crescimento descontrolado de células. Estas células invadem tecidos e órgãos normais, por extensão direta ou por disseminação à distância através do sangue, linfa ou superfície serosa, espalham-se para outras regiões do corpo e podem levar à morte (Robins, 2005).

Há evidências de câncer em restos humanos ancestrais e na literatura médica desde a antiguidade, datados de antes da época dos faraós no Egito antigo. Embora seja difícil interpretar o diagnóstico de médicos que viveram há tantos séculos atrás, pode-se assumir que muitas das suas descrições eram relacionadas a casos de câncer (Nobili *et al.*, 2009).

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. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60 % destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e válidas também para o ano de 2011, apontam a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2010).

Os tumores do sistema nervoso central são a terceira causa de morte por câncer em adultos e a primeira em crianças. Com relação ao tipo histopatológico, 38 a 40 % dos casos são de glioblastomas (Fuentes *et al.*, 2009). Já as leucemias ocuparam o sétimo lugar na ocorrência de casos de câncer em homens e sexto lugar em mulheres no

ano de 2008 no Brasil (INCA, 2008). A leucemia mielóide crônica representa cerca de 14 % de todas as leucemias e 20 % das leucemias de adulto (Quintás-Cardana e Cortes, 2006).

De forma geral, o tratamento padrão para os casos de câncer é cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Porém, em alguns casos, o sucesso desses tratamentos é limitado (Gan *et al.*, 2009). Durante as últimas décadas, o aumento do conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer serve de base para procura de novas estratégias terapêuticas mais eficientes (Roeder *et al.*, 2009).

1.1.2 Leucemia Mielóide Crônica

A incidência mundial de leucemia mielóide crônica (LMC) é geralmente de 1.0–1.5/100.000 população/ano, podendo aumentar em países onde a idade média da população está aumentando, já que a incidência de LMC aumenta com a idade (Goldman, 2008).

Esta doença é uma desordem mieloproliferativa originária nas células tronco hematopoiéticas (Pacheco *et al.*, 2009). Uma única célula desta sofre uma lesão que causa uma expansão inapropriada de sua progênie, levando à substituição de todo tecido mielóide por células leucêmicas diferenciadas. Sem um tratamento efetivo, esta doença leva o paciente à morte (Goldman, 2008).

A LMC é principalmente caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia ou translocação t (9:22), que une o protooncogene C-ABL presente no cromossomo 9 à região BCR do cromossomo 22 (Figura 1). O gene de fusão formado, BCR-ABL, provoca uma expressão desregulada da atividade tirosina quinase da ABL (Pacheco *et al.*, 2009).

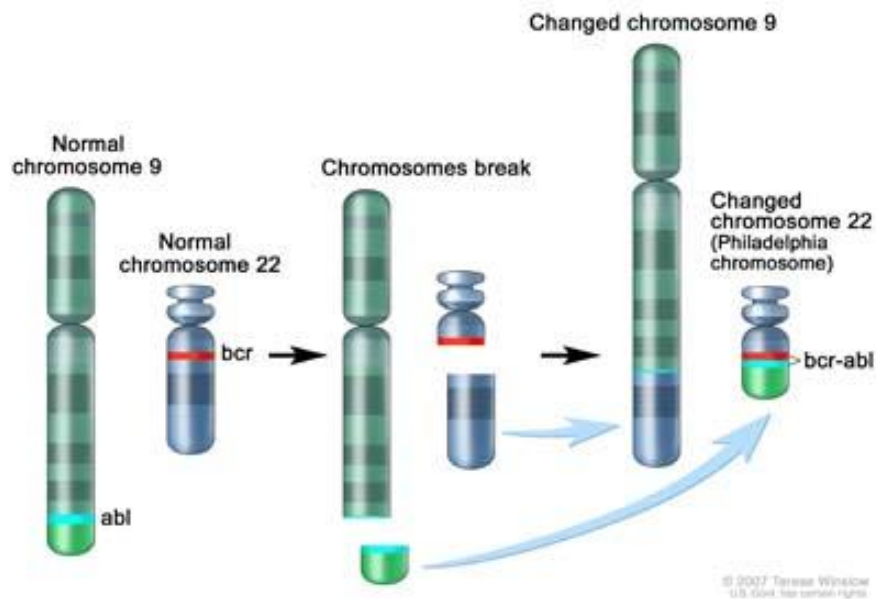


Figura 1: A formação do cromossomo Philadelphia. O cromossomo Philadelphia é derivado da troca de parte do braço longo do cromossomo 22 com um segmento do braço longo do cromossomo 9, que contém o gene ABL. A formação de um gene quimérico BCR/ABL, mostrado no lado direito da figura, é o evento genético crítico na leucemia mielóide crônica. O gene quimérico no cromossomo 9 é irrelevante para a LMC. Disponível em: www.health.com/.../0,,ncicdr0000258006,00.html

Esta oncoproteína interage com vias de sinalização que levam à célula ao crescimento e ativam programas antiapoptóticos que prolongam a sobrevivência celular na ausência de fatores de crescimento (Clark *et al.*, 2002). É capaz de ativar NFκB, Ras e Rac, PI3 kinase e induzir expressão de c-Myc e Bcl-2 (Goldman, 2008). A ativação de vários desses mecanismos pelo BCR/ABL é necessária para a transformação das células hematopoiéticas pelo oncogene (Figura 2) (Sokal *et al.*, 2002) e a progressão da doença é resultado de aquisições espontâneas de uma série de mudanças moleculares que são acompanhadas de novas mudanças citogenéticas (Goldman, 2008).

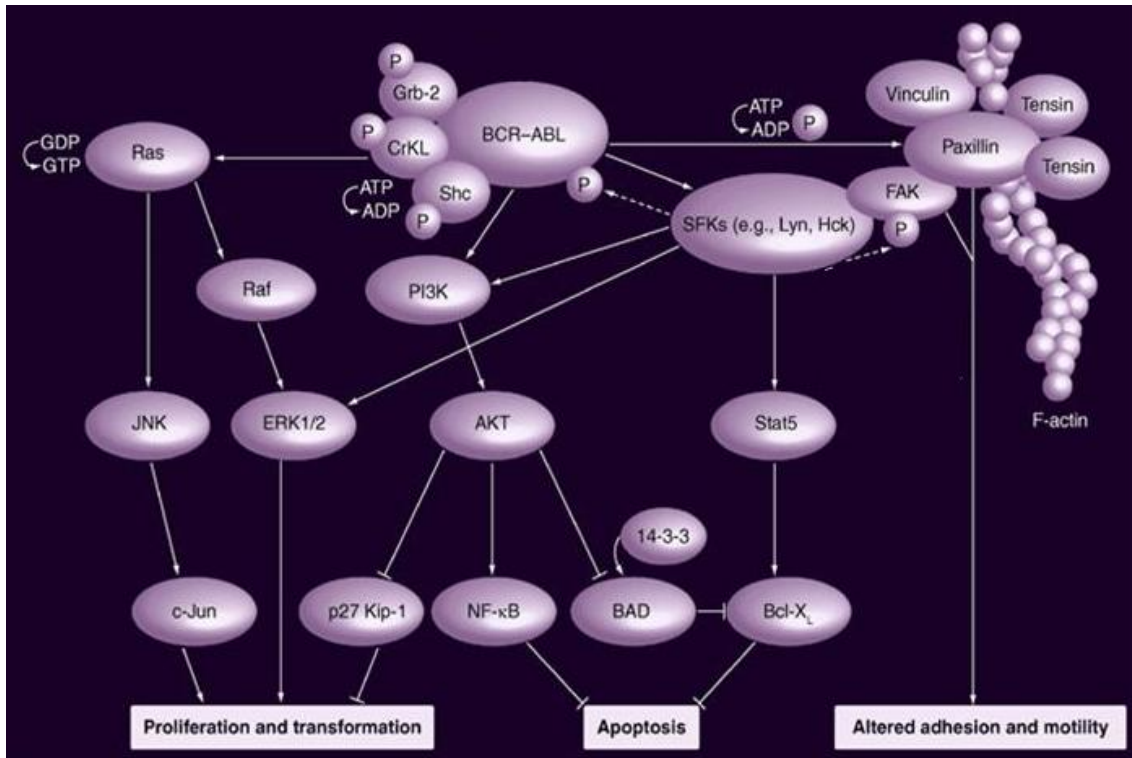


Figura 2: Vias envolvidas na sinalização do oncogene BCR-ABL (modificada de Kantarjian *et al.*, 2006).

Durante a hematopoiese normal, a proliferação e mecanismos de diferenciação de células progenitoras são dependentes da interação complexa com o microambiente da medula óssea. Essa interação envolve contato íntimo dessas células com células estromais e da matriz extracelular (Wilson, 1997). Transformação maligna das células progenitoras hematopoiéticas resulta no bloqueio da habilidade de se diferenciarem, causando acúmulo de células imaturas e quebra das interações células-estroma/matriz, levando à disseminação de elementos sanguíneos imaturos da medula óssea para o sangue periférico e tecidos. Sob este ponto de vista, células leucêmicas são descritas como invasivas em linhagens *in vitro*, como KG-1, K562, HEL, HL-60 e U-937 e *in vivo*, nos casos de leucemia aguda (Devy *et al.*, 1997).

A translocação característica da doença pode ser resultado de um erro de replicação (Pacheco *et al.*, 2009; Goldman, 2008). Além da genética, a única causa estabelecida para a LMC é exposição à radiação, que pode levar a translocação

cromossomal necessária para começar a doença, não havendo implicação de influência familiar, fatores ambientais ou infecção viral no desenvolvimento desta doença.

A primeira droga descrita para o tratamento de LMC foi o arsênico. Alguns anos depois, este foi baseado em drogas citostáticas como o bussulfan e hidroxiuréia. Atualmente, os tratamentos se baseiam em transplante, interferon- α e medicamentos que focam nos mecanismos moleculares envolvidos nesta doença (Figura 2) (Hehlmann *et al.*, 2005). O imatinibe é, atualmente, o agente que mais se destaca. Ele é um inibidor do domínio tirosina quinase do BCR/ABL, sendo utilizado em todos os estágios da doença (Figura 3). Outros inibidores estão em fase preliminar dos estudos clínicos para pacientes em fase crônica que não foram previamente tratados (Goldman, 2008). Dentre eles, o desatinibe mostrou grande potência em testes *in vitro* e é eficiente em pacientes com LMC que não responderam bem a terapia com o imatinibe (Shah *et al.*, 2004; Talpaz *et al.*, 2006).

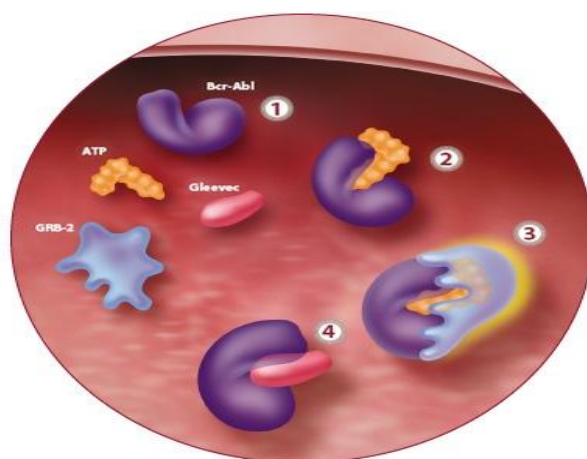


Figura 3: Imatinibe (Gleevec). Foi projetado para impedir a ação da proteína anormal da LMC. Esta proteína, chamada BCR-ABL (1) se liga a uma molécula de ATP (2), ativando a proteína BCR-ABL. Esta se liga a uma proteína de sinalização, GRB-2, (3) que ativa vias de proliferação, levando à progressão da doença. Imatinibe foi projetado para se ligar a proteína BCR-ABL, impedindo a ligação desta com o ATP, inibindo assim a ativação de GRB-2 (4). Disponível em: <http://www.jamesline.com/viewer/Pages/index.aspx?P=440>

Ainda é grande a procura de tratamentos alternativos para a LMC, apesar do imatinibe ainda ser o medicamento de primeira linha (Faber, 2009).

1.1.3 Glioblastoma multiforme (GBM)

Gliomas formam um grupo heterogêneo de tumores que, em pacientes adultos, podem ser classificados baseados nas características histopatológicas em astrocítico, oligodendroglial, oligoastrocítico ou tumores endimais (Campbell *et al.*, 2007). Embora esta classificação histopatológica ainda seja a base para a terapia dos pacientes, existem diferenças genéticas dentro desses subtipos que são de extrema importância para o prognóstico (Da Fonseca *et al.*, 2008).

Os tumores astrocíticos (originados de astrócitos) correspondem a aproximadamente 75% dos casos de gliomas e apresentam uma subclassificação por graus, que variam de I a IV, quanto à malignidade. O grau I, astrocitoma pilocítico, é considerado um tumor benigno; o astrocitoma difuso, grau II; astrocitoma anaplásico, grau III e o glioblastoma multiforme (GBM) é caracterizado como grau IV, dado ao seu elevado grau de malignidade (Tabela 1) (Vescovi *et al.*, 2006; Ohgaki e Kleihues, 2007).

Tabela 1: Classificação dos tumores astrocíticos, estabelecida pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (Vescovi *et al.*, 2006).

Origem do tumor	Classificação
Astrocítico	Astrocitoma pilocítico (grau I)
	Astrocitoma difuso (grau II)
	Astrocitoma anaplásico (grau III)
	Glioblastoma (grau IV)

Glioblastoma Multiforme (GBM) é o tumor do sistema nervoso central mais comum em adultos (Mattos *et al.*, 2006). Raramente sofrem metástase para fora do sistema nervoso central, mas possuem crescimento agressivo. O tecido cerebral que rodeia o tumor apresenta vários tipos de resposta inflamatória, incluindo ativação de macrófagos, astrócitos reativos hipertrofiados, invasão vascular e formação de edema (Balassiano *et al.*, 2006). As células tumorais dos GBMs apresentam um modelo de distribuição tecidual difuso no cérebro, que impede a retirada cirúrgica do tumor, tornando o prognóstico para o GBM bastante desanimador, pois a sobrevida média, quando combinadas radioterapia e quimioterapia, é de aproximadamente 14,6 meses (Vescovi *et al.*, 2006).

Do ponto de vista clínico e biológico, uma distinção entre GBM primário e secundário é importante. Os primários manifestam-se rapidamente, sem evidência de lesões malignas precursoras, e acometem pessoas com idade média de 55 anos. Os secundários desenvolvem-se mais lentamente, pela progressão do astrocitoma de grau II ou III, e acometem preferencialmente adultos jovens, com idade média de 40 anos. (Ohgaki e Kleihues, 2007; Ohgaki *et al.*, 2004).

Aumento na expressão ou mutação de receptores de fatores de crescimento como EGF, PDGF, VEGF, TNF- α , associados com tirosinas quinases, foram identificados em gliomas malignos, levando a ativação constitutiva das vias de sinalização, o que resulta na proliferação celular descontrolada, sobrevivência e invasão (Sathornsumetee *et al.*, 2007).

Muitos mecanismos para inibir as vias de sinalização dos fatores de crescimento e seus receptores até os efetores intracelulares têm sido estudados (Sathornsumetee *et al.*, 2007). Estes estudos incluem moléculas que atuam como inibidores de TGF- β , como SD-208 (Uhl *et al.*, 2004), inibidores do VEGF, como bevacizumab (Genentech,

South San Francisco) e VEGF-trap (Regeneron, Tarrytown, NY), inibidores da farnesiltransferase (FTI), como tipifarnibe (Johnson & Johnson, Brunswick, NJ) dentre outros (Sathornsumetee *et al.*, 2007).

A figura abaixo mostra as vias de sinalização envolvidas nos gliomas e os diversos alvos de terapias (Figura 4).

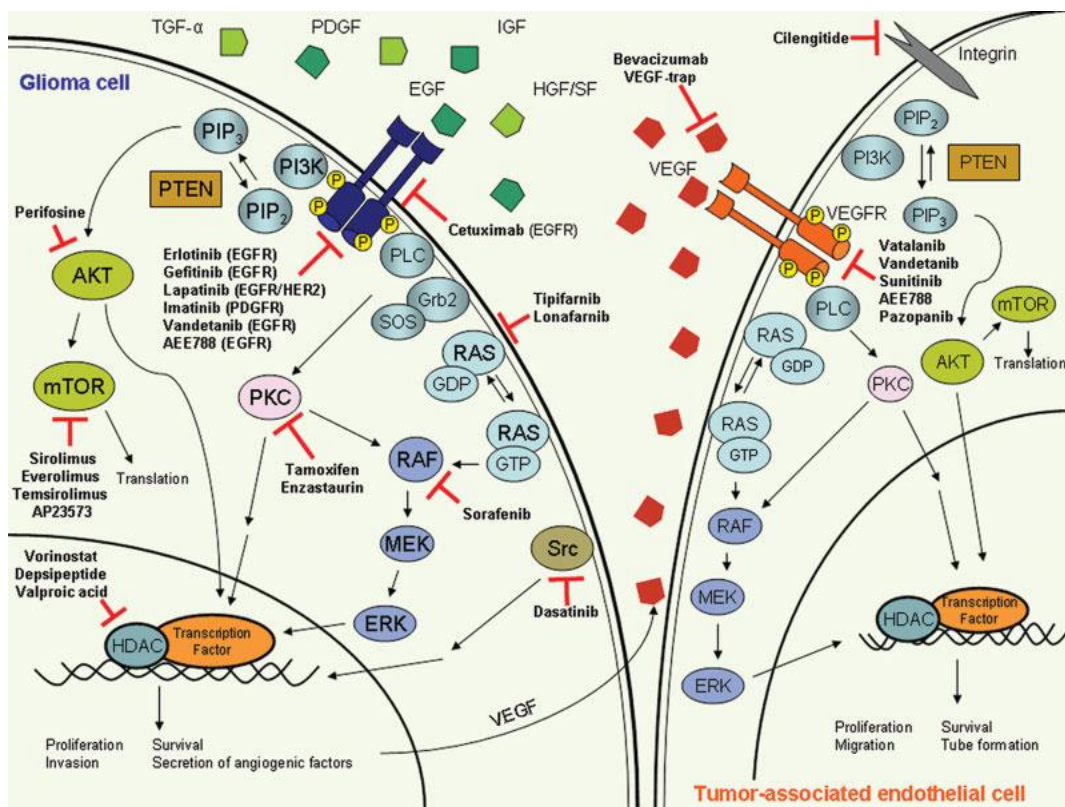


Figura 4: Representação simplificada das vias de tradução de sinal e alvos terapêuticos relevantes em células de glioma (esquerda) e células endoteliais associadas a tumor (direita). Vários pontos nesta cascata são alvos terapêuticos em desenvolvimento para gliomas malignos (alguns são mostrados) (Sathornsumetee *et al.*, 2007).

Muitos inibidores que visam apenas um alvo obtiveram respostas modestas em pacientes com gliomas malignos. Esses fracassos são resultado da existência de muitas vias paralelas e compensatórias. Muitas estratégias estão sendo desenvolvidas para aumentar a eficiência das terapias alvos, que inclui visar múltiplas vias de transdução de sinal com múltiplos inibidores de quinases (Sathornsumetee *et al.*, 2007).

1.2 Produtos Naturais e Fármacos Anticancerígenos

Os registros médicos ancestrais mostram que cirurgia era realizada como tratamento para o câncer. Porém, os médicos também recomendavam o uso de alguns produtos naturais, especialmente oriundos de plantas, o que representa um interessante ponto de comparação com o conhecimento atual (Nobili *et al.*, 2009).

O uso de plantas, ervas, fungos e sementes como medicamentos são anteriores aos registros históricos e representam o antecedente da medicina moderna. Nos tempos atuais, evidências clínicas mais significantes do valor das plantas no tratamento do câncer permitem a reconstrução da história destas plantas e seu uso nesses casos (Nobili *et al.*, 2009).

Há apenas 200 anos, um farmacêutico de 21 anos chamado Friedrich Sertürner isolou o primeiro composto puro farmacologicamente ativo de uma planta: morfina do ópio produzido pela casca da semente de papoula da espécie *Papaver somniferum*. Isto iniciou uma era onde drogas extraídas de plantas podem ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas. Por volta de 1990, 80 % das drogas eram advindas de produtos naturais ou análogos inspirados nestes produtos (Li e Vederas, 2009).

A maior parte dos produtos naturais, incluindo aqueles isolados de animais marinhos como as esponjas, tunicados e seus vários predadores são candidatos a se tornarem drogas (Simmons *et al.*, 2005). Além dos produtos marinhos, as plantas são excelentes fontes de novos fármacos. Dentre os quimioterápicos para o câncer, a vimblastina e a vincristina são extraídas de *Catharrantus rose* (planta nativa das florestas tropicais de Madagascar). O etoposídeo e o teniposídeo (extraídos da resina da raiz do podófilo - *Podophyllum peltatum* L. *P. emodi.*) são importantes fármacos

introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos, fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (Junior *et al.*, 2006).

Dentro do grupo de produtos naturais com atividade antitumoral estão os terpenos, que possuem atividade antimetabólica de grande interesse médico (Belanger, 1998; Fernandes *et al.*, 2005). Esses hidrocarbonetos são classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas (formada por cinco carbonos), podendo ser: hemiterpenos (uma unidade isoprênica), monoterpenos (duas unidades isoprênicas), sesquiterpenos (três unidades isoprênicas), diterpenos (quatro unidades isoprênicas) e politerpenos (mais de quatro unidades isoprênicas) (McGarvey e Croteau, 1995).

Os monoterpenos são uma classe de moléculas isoprenóides formados pela condensação de duas moléculas de isopreno gerando compostos monocíclicos, bicíclicos ou acíclicos. São derivados da via de síntese do mevalonato das plantas, constituindo os componentes primários de óleos essenciais (Hudes, 2000).

O limoneno (Figura 5) é o monoterpene monocíclico mais simples, encontrado em óleos de frutos cítricos, como laranja e limão (Hudes, 2000). Devido a seu sabor agradável, é usado como ingrediente para sabor cítrico em óleos artificiais e fragrâncias. Pode ser encontrado também em bebidas não-alcóolicas, sorvetes e doces (Chow *et al.*, 2002). É formado a partir do geranylpirofosfato e é o precursor de outros monoterpenos monocíclicos oxigenados (Hudes, 2000). Desde a década de 80, o limoneno é reconhecido como um agente com ações quimiopreventivas e quimioterapêuticas. A eficácia do limoneno durante os estágios de iniciação e progressão da carcinogênese foi demonstrada em diversos tumores (Chow *et al.*, 2002) e pode estar relacionada à inibição da isoprenilação de proteínas da família G, incluindo membros da família Ras (Haag *et al.*, 1992). A isoprenilação é importante para a associação dessas proteínas à membrana plasmática, tornando-as capazes de atuar na via de sinalização requerida para

o crescimento, proliferação celular e apoptose (Gelb *et al.*, 1995; Holstein e Hohl, 2003; Nakada *et al.*, 2007).

Devido a estas propriedades, o limoneno foi considerado como um candidato em potencial para atuar como droga anticâncer. Entretanto, a alta dose requerida (1000mg/Kg/dia) limitou sua utilidade clínica. Outros monoterpenos passaram a ser investigados, principalmente seus metabólitos álcool perílico (POH) e ácido perílico (PA) (Figura 5) (Boik, 2001).

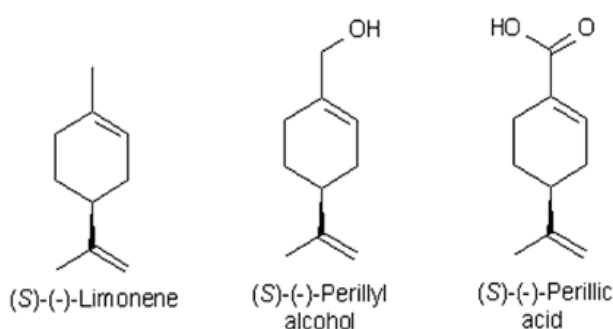


Figura 5: Estrutura química dos monoterpenos limoneno, POH e PA. Adaptado de Holstein e Hohl, 2003.

1.2.1 POH

Álcool perílico (POH), também conhecido como p-metha 1,8-diene-7-ol, é um monoterpene monocíclico hidroxilado, formado pela condensação de duas unidades isoprênicas. É encontrado em óleos essenciais de cerejas, lavandas, capim-limão, hortelã, sementes de aipo e gengibre (McGarvey e Croteau, 1995).

O álcool perílico é produzido a partir do limoneno, numa rota caracterizada pela substituição do componente metila do limoneno. O primeiro relato dessa via de biotransformação foi realizado por Dhavalikar e Bhattacharyya. Os autores descreveram a biotransformação de *R*-(+)-limoneno por meio de uma linhagem de *Pseudomonas* isolada de uma amostra de solo (Dhavalikar e Bhattacharyya, 1966). Outros estudos relatam a biotransformação do limoneno com obtenção dos compostos perílicos por

linhagens de leveduras, fungos filamentosos (*Penicillium digitatum* e *Mortierella minutissima*) e bactérias (Júnior e Pastore, 2007). A enzima responsável pela transformação do limoneno em álcool perílico é a limoneno 7-monooxigenase (Figura 6). Em ratos, cachorro e humanos, o POH é rapidamente metabolizado à PA e DHPA. A recuperação urinária total dos três compostos é de 8-9%, enquanto que a maior parte da droga é recuperada sob a forma de PA (O'Brien, 2004).

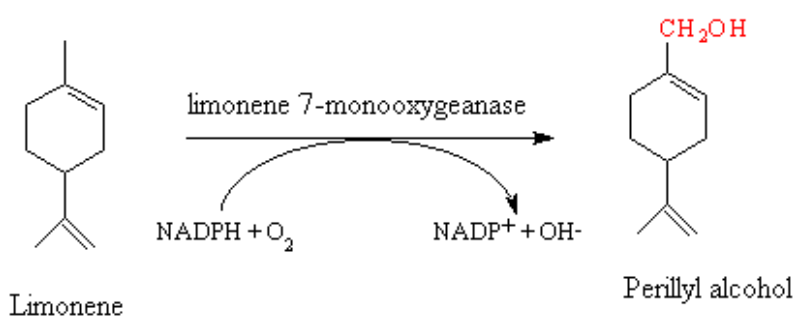


Figura 6: Transformação do Limoneno em Álcool Perílico pela ação da enzima limoneno-7 monooxigenase. Fonte: Ballal *et al.*, 1966.

Em 1994, Crowell e colaboradores conduziram um estudo sobre o metabolismo do limoneno. Este foi o primeiro relato da presença dos metabólitos do limoneno no plasma de humanos. Neste mesmo ano, e sob a supervisão do mesmo pesquisador, foi feito o primeiro estudo da análise de atividade do álcool perílico, focando a prenilação de proteínas e a proliferação celular. Nesses estudos foi determinado que o limoneno é metabolizado por humanos e ratos de maneira similar e que o POH se mostrou mais eficiente do que o limoneno e seus metabólitos em ambas atividades testadas (Crowell *et al.*, 1994a; Crowell *et al.*, 1994b).

O POH é considerado como uma substância com potencial atividade regressora de diferentes tumores, incluindo mamários, pancreáticos e cerebrais (Yuri *et al.*, 2004; Da Fonseca *et al.*, 2006a, 2006b e 2007; Matos *et al.*, 2008), efeito radiosensibilizador

(Rajesh *et al.*, 2003) e significativa inibição da angiogênese (Loutrari *et al.*, 2004). Diversas atividades antitumorais do POH já foram descritas. É capaz de bloquear o ciclo celular e causar apoptose em células leucêmicas (Clark *et al.*, 2002), de tumor pulmonar (Yeruva *et al.*, 2007) e adenocarcinoma (Elegbede *et al.*, 2003; Wiseman *et al.*, 2007), ativar proteínas apoptóticas (Clark, 2006), inibir angiogênese (Loutrari *et al.*, 2004), inibir metástase em células de glia (Balassiano *et al.*, 2002), inibir proliferação de células de câncer de pulmão (Xu *et al.*, 2004), inibir migração (Wagner *et al.*, 2002) e proliferação de células de tumor de mama (Yuri *et al.*, 2004), inibir a via de sinalização da proteína Ras (da Fonseca *et al.*, 2008; Da Fonseca *et al.*, 2006a; Chaudhary *et al.*, 2009) e sua prenilação (Holstein e Hohl, 2003), induz apoptose em células de GBM (Fernandes *et al.*, 2005) e tumores de fígado (Mills *et al.*, 1995), inibir enzimas de prenilação (Gelb *et al.*, 1995), inibir a expressão e função do receptor de androgênio em tumores de próstata (Chung *et al.*, 2006), alterar citoesqueleto e expressão de p34 em células de adenocarcinoma (Cerdeira *et al.*, 1999), inibir transativação de AP-1 em tumores de pele (Barthelman *et al.*, 1998) e inibir NFκB (Berchtold *et al.*, 2005). A tabela abaixo (Tabela 2) mostra um resumo das atividades do POH.

Quadro 1: Descrição das atividades do POH.

Ano	Grupo	Estudo
1998	Belanger	Revisão
	Rippie <i>et al.</i>	Fase I / administração diária
2000	Hudes <i>et al.</i>	Fase I / efeito em doenças sólidas refratárias
	Rippie <i>et al.</i>	Fase I / administração 4x por dia
2002	Murren <i>et al.</i>	Fase I / efeito em doenças refratárias
	Balassiano <i>et al.</i>	Anti-metástase em glia

	Wagner <i>et al.</i>	Efeito na migração celular
	Clark <i>et al.</i>	Bloqueio do ciclo celular em células leucêmicas
2003	Azoli <i>et al.</i>	Fase I / efeito em tumores sólidos
	Clark <i>et al.</i>	Inibição da sinalização via Mek (células leucêmicas)
	Rajesh <i>et al.</i>	Aumento da sensibilização a tratamentos em glioma
	Elegbede <i>et al.</i>	Bloqueio de ciclo e morte celular
2004	Xu <i>et al.</i>	Inibição da proliferação (pulmão)
	Yuri <i>et al.</i>	Efeito no crescimento de cél. câncer <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
	Loutrari <i>et al.</i>	Inibição da angiogênese
2005	Fernandes <i>et al.</i>	Indução de apoptose (células de GBM)
2006	Da Fonseca <i>et al.</i>	Resposta favorável à administração intranasal
	Clark <i>et al.</i>	Indução de apoptose mediada por c-Myc (células leucêmicas)
	Da Fonseca <i>et al.</i>	Efeito no tamanho do tumor em pacientes
2007	Wiseman <i>et al.</i>	Bloqueio de ciclo celular mediado por p21 e p27 (pâncreas)
	Yeruva <i>et al.</i>	Bloqueio de ciclo celular e apoptose (pulmão)
2009	Da Fonseca <i>et al.</i>	Fase I/II – efeito da administração intranasal em glioma
	Da Fonseca <i>et al.</i>	Efeito da administração nasal na via da Ras
	Chaudhary <i>et al.</i>	Inibição da inflamação e tumorigênese (pele de murinos)

POH já faz parte de vários testes de fase I e II e mostrou potencial terapêutico (Wiseman *et al.*, 2007). Estudos clínicos de sua administração oral em pacientes com tumores sólidos malignos estão em andamento (Ripple *et al.*, 2000; Hudes *et al.*, 2000; Azzoli *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2004; Stearns *et al.*, 2004), porém foram relatados

efeitos colaterais no trato gastrointestinal (Hudes *et al.*, 2000; Azzoli *et al.*, 2003). Estudos da administração do POH por via nasal também vêm sendo realizados, com diminuição da massa tumoral, melhora do quadro clínico e aumento da sobrevida em diversos pacientes com gliomas malignos recidivos, além da redução dos efeitos colaterais do trato gastrointestinal (Da Fonseca *et al.*, 2006a, 2006b, 2007 e 2008).

1.2.2 PA

O POH é rapidamente metabolizado no fígado de animais, formando ácido perílico (PA) e ácido dihidroperílico (DHPA). Em humanos, PA é o metabólito majoritário circulante (Yeruva *et al.*, 2007). A oxidação do POH à PA provavelmente envolve o aldeído perílico (PCO) como intermediário, que pode ser subsequentemente oxidado à PA pela enzima aldeído desidrogenase ou reduzido à POH pela álcool desidrogenase (Figura 7) (Boone *et al.*, 1990).

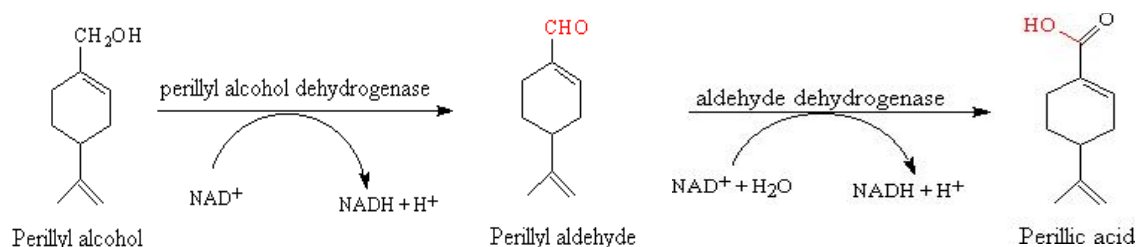


Figura 7: Transformação do álcool perílico em aldeído perílico (pela enzima álcool perílico desidrogenase) e deste em ácido perílico (pela enzima aldeído desidrogenase). Adaptado de: Dhavalikar e Bhattacharyya, 1966.

O PA não foi estudado na mesma proporção que o POH ou o limoneno, mas algumas de suas atividades antitumorais já foram descritas. É capaz de bloquear o ciclo celular e causar apoptose em células de tumor pulmonar (Yeruva *et al.*, 2007), inibir isoprenilação da proteína Ras (Holstein e Hohl, 2003) e inibir a produção de IL-2

(Schulz *et al.*, 1997). A tabela abaixo (Tabela 3) mostra um resumo das atividades do PA.

Quadro 2: Descrição das atividades do PA.

Ano	Grupo	Estudo
1997	Schulz <i>et al.</i>	Inibição da produção de IL-2
2001	Cheng <i>et al.</i>	Inibição de isoprenilação (retina)
	Ferri <i>et al.</i>	Bloqueio de ciclo e redução da proliferação (célula muscular)
2007	Yeruva <i>et al.</i>	Bloqueio de ciclo, apoptose e aumento da sensibilização ao tratamento

1.3 Triagem de novos fármacos

Os sistemas *in vitro*, como alternativa aos experimentos animais nas pesquisas toxicológicas, avaliam o grande número de substâncias sintetizadas ou purificadas. Os ensaios de citotoxicidade utilizando células *in vitro* têm sido usados para determinar a atividade e o mecanismo de ação de produtos naturais antitumorais, além de identificar novos alvos moleculares (Nagle *et al.*, 2004).

A análise da função celular é a atividade central da pesquisa científica de novos antitumorais. Os parâmetros analisados são geralmente número de células, integridade da membrana celular ou atividade de certas enzimas celulares. O número celular pode ser medido, por exemplo, pela análise do total de conteúdo de DNA. Análises da integridade da membrana permitem melhor detecção de efeitos citotóxicos e podem ser acessadas por análise da habilidade da célula em reter compostos, como por exemplo, no teste da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) ou nos ensaios de incorporação do corante vital Vermelho Neutro. Testes comuns usados para acessar o

estado metabólico das células incluem também o MTT (integridade mitocondrial) (Hynes *et al.*, 2006).

Após os ensaios *in vitro*, ensaios clínicos são desenvolvidos com o objetivo de investigar e encontrar agentes naturais e sintéticos que sejam capazes de prevenir, bloquear ou reverter tanto a fase de iniciação da carcinogênese quanto a progressão de células pré-malignizadas. Estes estudos incluem análises de toxicidade e segurança dose-dependente (fase 1), eficiência em uma pequena população com alto risco tanto para cânceres específicos quanto para presença de biomarcadores (fase 2) e grandes testes com controle de placebos conduzidos em grandes populações (fase 3). (Greenwald, 2004).

A descoberta de novas drogas é um problema mais complexo do que era no passado. A quantidade de informações geradas em um estudo típico pode facilmente confundir os cientistas responsáveis pela pesquisa. Os sistemas computacionais que estocam, manipulam e mostram estruturas químicas e as informações associadas a elas se tornaram uma ferramenta importante e de uso crescente na pesquisa (Richon, 1997).

O desenho de drogas é um processo iterativo que começa quando um composto com perfil biológico interessante é identificado e termina quando tanto o perfil de atividade e a síntese de uma nova entidade química são otimizados (Richon, 1997). Assim, o processo se inicia com uma grande quantidade de moléculas, mas, a cada fase, muitas delas são descartadas por não atenderem às especificações necessárias. Ao final, apenas algumas moléculas apresentarão um perfil adequado e uma será eleita como candidato potencial a um novo fármaco (Troullier *et al.*, 2002). Desta forma, grande parte dos gastos das indústrias farmacêuticas é empregado na avaliação e no teste de substâncias que são descartadas no decorrer do processo.

A modelagem molecular se mostra promissora por permitir a detecção precoce de moléculas com problemas e por orientar a pesquisa na direção de moléculas com maior potencial (Troullier *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2003; Hansch *et al.*, 2004). A disponibilidade de programas computacionais e bancos de dados são ferramentas essenciais para a simulação do comportamento de moléculas no planejamento de novos fármacos. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise da relação estrutura-atividade, onde os dados estruturais podem ser obtidos por técnicas de modelagem molecular (Patrick, 2001; Carvalho *et al.*, 2003).

Os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) têm um papel importante em definir a disponibilidade *in vivo* e os efeitos tóxicos de uma molécula, auxiliando na redução do tempo e do custo do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Hansch *et al.*, 2004).

A avaliação do potencial de um composto como fármaco também pode ser realizada por análises no campo da modelagem molecular. O potencial de “*druglikeness*” de um composto está relacionado à semelhança com fármacos do mercado, sendo baseado em descritores topológicos, dados estruturais ou outras propriedades como cLogP (coeficiente de partição octanol/água calculado) e peso molecular. 80% dos fármacos comerciais têm um valor de “*druglikeness*” positivo. O potencial de “*drug score*” combina o potencial de *druglikeness*, cLogP, LogS (solubilidade em água), peso molecular e risco de toxicidade em um valor que é utilizado para inferir o potencial de um composto se tornar um fármaco. A avaliação *in silico* da toxicidade de moléculas inclui efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução (Abreu, 2008).

2 OBJETIVOS

Monoterpenos monocíclicos representam uma nova classe de compostos antitumorais. Álcool perfílico é um desses monoterpenos que possui atividade quimiopreventiva e quimioterápica estabelecida e bem descrita na literatura, para diversos tipos de tumores malignos. Ácido perfílico é seu metabólito majoritário circulante e também possui atividade antitumoral descrita. Porém, o estudo da atividade antitumoral do PA é bem restrito quando comparada ao do POH e não há na literatura estudos comparativos desses dois compostos em linhagens de leucemia mielóide crônica e glioblastoma multiforme.

Devido a isso, uma análise acerca da atividade do POH e PA nestas linhagens torna-se interessante e pode ajudar na busca por alternativas no tratamento de tais doenças.

Sendo assim, foram estabelecidos os seguintes objetivos para este trabalho:

Objetivo geral:

- Avaliar o efeito antitumoral dos monoterpenos POH e PA em células de leucemia mielóide crônica (K562) e glioblastoma multiforme (A172).

Objetivos específicos:

- Comparar a citotoxicidade do POH e PA nas duas linhagens celulares pelas técnicas da incorporação do corante vital Vermelho Neutro e redução do MTT.

- Determinar o potencial teórico do POH e PA como drogas comerciais.
- Analisar alterações morfológicas nas células tratadas com POH e PA.
- Verificar o potencial do POH e PA como indutores de apoptose por eletroforese de DNA, microscopia de fluorescência e western blotting.
- Determinar o efeito do POH e PA na proliferação celular.
- Determinar o efeito do POH e PA na síntese de metaloproteases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Substâncias testadas

Os monoterpenos (S)-(-)-álcool perílico, 96 %, (S)-(-)-ácido perílico, 95 %, DMSO, 99,9 % e etoposídeo foram adquiridos da firma Sigma (Sigma Chem. Co. MO, USA). Os reativos que devem ser diferenciados quanto à origem e fornecedor serão mencionados oportunamente.

3.2 Células e cultura celular

3.2.1 - Linhagem K562

As células da linhagem K562 (Leucemia Mielóide Crônica) foram cedidas pela Professora Kátia Sabino da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). As células foram mantidas em garrafas de poliestireno (TPP) em meio RPMI-1640, contendo 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen), inativado a 56 ° C por 1 hora, 100 U/mL de penicilina (Invitrogen) e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2,25 g/L de NaHCO₃, a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Repiques semanais foram realizados em fluxo laminar (Tox - Modelo FLV – Série 491), de modo que cada garrafa recebesse 5mL de meio com quantidade fixa de células no momento do repique (2,0 x 10⁵ células/mL). O volume, com a quantidade de células acima, foi transferido para uma nova garrafa com meio novo.

3.2.2 - Linhagem A172

As células da linhagem A172 (Glioblastoma Multiforme Humano) foram cedidas pelo Dr. Clóvis Orlando da Fonseca da Universidade Federal Fluminense

(UFF). As células foram mantidas em garrafas de poliestireno (TPP) em meio DMEM-F12 (Invitrogen) contendo 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen), inativado a 56 ° C por 1 hora, 100 U/mL de penicilina (Invitrogen) e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2,25 g/L de NaHCO₃, a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Repiques semanais foram realizados em fluxo laminar (Tox - Modelo FLV – Série 491), de modo que cada garrafa recebesse 5mL de meio com quantidade fixa de células no momento do repique ($2,0 \times 10^5$ células/mL). Após desprezar o meio, as células eram lavadas por duas vezes com PBS/EDTA (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,03 mM EDTA, pH 7,4 ajustado com HCl). A dispersão das células foi realizada pela adição de tripsina (Invitrogen) 0,25 % a 37 ° C. Após 5 minutos, o meio de cultura era adicionado e as células repicadas na concentração acima mencionada.

3.3 Ensaios para a avaliação da citotoxicidade celular

3.3.1 – Células e compostos

Células foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^4 células por poço. POH e PA em diferentes concentrações foram adicionados (na linhagem K562, na mesma hora; na linhagem A172, no dia seguinte a fim de esperar a formação da monocamada) e incubados durante 48 horas. Um total de três experimentos foi realizado em triplicata. Os compostos foram testados nas seguintes concentrações: 3000, 2000, 1500, 1000, 750, 500 e 250 µM. Como controle positivo foi utilizado o etoposídeo, quimioterápico usado nos tratamentos de câncer, nas concentrações de 250, 150, 100, 50, 25, 10 e 5 µM. Como controle negativo, foi utilizado o DMSO, solvente no qual os compostos foram diluídos, na concentração máxima de 0,02%, que não se mostrou citotóxica.

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos foi realizada por dois ensaios diferentes, um que mede a capacidade redutora da célula através da redução do MTT, e outro que retém o corante vital Vermelho Neutro em organelas celulares com membranas íntegras.

3.3.2 - Incorporação do Vermelho Neutro

O teste utilizando o corante vermelho neutro (Reagen) foi realizado segundo Borenfreund e Puerner (1985). O ensaio tem por objetivo avaliar a capacidade de células viáveis reterem o corante vermelho neutro adicionado ao meio de cultura.

Após 48h de incubação com POH e PA, os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS. Terminada a segunda lavagem, as células foram incubadas com 150 µL de meio de cultura contendo o corante vermelho neutro (50 µg/mL) por 3 horas, a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e adicionou-se 150 µL de solução de lise (1 % de ácido acético, 50 % de etanol e 49 % de água destilada) às culturas tratadas, e estas foram mantidas sob agitação por 10 minutos até o total rompimento das células e solubilização do corante. Foi realizada a leitura no leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP – Reader) no comprimento de onda de 545 nm. O potencial citotóxico do DMSO foi calculado em relação ao controle sem tratamento (não se mostrou tóxico), enquanto que o potencial citotóxico dos compostos testados foi calculado em relação ao controle tratado com o veículo DMSO (na concentração máxima de 0,02%).

3.3.3 - Ensaio de redução do MTT

O método foi realizado como descrito por Mossman (1983). Ao completar 40 h de incubação das células com os compostos, foram adicionados 10 µL da solução de

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) na concentração de 5 mg/mL, diluída em PBS.

As placas que receberam a solução de MTT foram protegidas da luz e mantidas a 37 ° C, em estufa com 5 % de CO₂. Após 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de SDS 10 %, HCl 0,01 N, e a densidade óptica medida no comprimento de onda de 545 nm, usando um leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP – Reader). A determinação do potencial citotóxico dos compostos testados foi calculada em relação ao controle tratado com o veículo DMSO.

3.4 Análise *in silico* dos parâmetros ADMET

Os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) são de grande importância na escolha de um fármaco. Para um candidato à fármaco ser considerado eficaz, este deve possuir alta potência, seletividade ao seu alvo biológico e atingir concentrações acima de um valor pré-determinado no tecido alvo. (Katzung, 2002).

POH e PA foram submetidos a uma análise *in silico* dos parâmetros ADMET, usando o programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>), para avaliar o potencial teórico destes compostos como candidatos a novos fármacos, comparados com o etoposídeo, quimioterápico em uso clínico. Para isso, foram determinados os valores de: **a)** cLogP, correspondente a lipofilicidade do composto; **b)** risco toxicológico, relacionado aos efeitos irritantes, mutagênico, tumorigênico e sobre a reprodução; **c)** “druglikeness” que avalia a frequência de ocorrência de fragmentos comuns a fármacos comerciais e **e)** “*drug score*”, que combina “*druglikeness*”, cLogP, LogS, massa molecular e risco de

toxicidade em um valor que pode inferir o potencial de um composto se tornar um futuro fármaco (Teckto, 2005).

3.5 Avaliação da apoptose por fragmentação do DNA

Apoptose é uma forma de morte celular altamente regulada, necessária para o desenvolvimento de órgãos e manutenção da homeostase (Zamai *et al.*, 2004). Um dos marcadores bioquímicos da apoptose é a fragmentação do DNA (Nagata, 2000). Eletroforese, em gel de agarose, de DNA extraído de células em apoptose geralmente revela um discreto fragmento de 50kbp, seguido de uma “escada” de fragmentos de aproximadamente 180bp e múltiplos (Goping *et al.*, 1999).

3.5.1 - Extração do DNA

Esta técnica foi realizada segundo Maniats (1982). Células foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^6 células) em presença dos compostos por 24 e 48h. POH e PA foram utilizados nas concentrações de 500, 1500 e 3000 μM e etoposídeo na concentração de 200 μM . Nas células aderentes, os compostos foram adicionados no dia seguinte, a fim de esperar a formação da monocamada. Após a incubação com os compostos, as células K562 foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 1160 x g por 10 minutos. A linhagem aderente A172 foi lavada com PBS, realizada a soltura com tripsina 0,25 % (Invitrogen) e novamente lavada duas vezes com PBS por centrifugação a 1160 x g por 10 minutos. Foram adicionados 400 μL da solução de digestão (Tris-HCl 1 M pH 8; EDTA 25 mM pH 8; SDS 0,5 % e NaCl 100 mM), 10 μL de proteinase K (0,5 mg/mL – Invitrogen) e deixadas em banho-maria (BN 02, Acil) por 16-20 horas à 56° C. Após incubação, o digesto foi centrifugado a 10.480 x g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro eppendorf onde sofreu

desproteinização com adição de 400µL de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (todos da Invitrogen) na proporção de 25:24:1, homogeneizado e centrifugado a 10.480 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro eppendorf onde foram adicionados 185 µL de acetato de amônio (10 M) e 1,2 mL de etanol 100 % (Merck) gelado para precipitação do DNA por 16-20 horas à -4 ° C.

Em seguida, foi realizada a centrifugação a 10.480 x g por 5 minutos, o precipitado contendo DNA foi lavado duas vezes com etanol 70 % gelado e ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, 7,4).

3.5.2 - Eletroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados utilizando-se agarose (Invitrogen) na concentração de 0,8 g % em tampão TBE (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA, pH 8,0) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada em tampão TBE, sob tensão de 60 V por cerca de 1 hora e 30 minutos. O DNA foi visualizado através de transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia) e o resultado fotografado.

3.6 Análise morfológica da apoptose

Células em processo de apoptose exibem mudanças morfológicas características do processo, como condensação da cromatina, “quebra” nuclear, encolhimento celular e formação de expansões na membrana (“*blebbing*”) chamadas de corpos apoptóticos, que, *in vivo*, são fagocitados (Luchetti *et al.*, 2004). Para a visualização destas alterações morfológicas serão utilizados os compostos laranja de acridina e brometo de etídeo.

A laranja de acridina é um corante vital que penetra nas células pela membrana plasmática intacta e intercala o DNA, fazendo com que este adquira coloração verde,

assim como o citoplasma da célula. Variações na intensidade da fluorescência estão relacionadas com a distribuição da eucromatina ou heterocromatina. Em contraste, núcleos apoptóticos possuem cromatina condensada, que é corada de forma uniforme e se apresenta como corpos esféricos brilhantes crescentes ou numerosos. O brometo de etídio é captado somente por células com danos na membrana citoplasmática, que ficam coradas com os núcleos em vermelho (Roger *et al.*, 1996).

Ambas as linhagens celulares foram semeadas em placas de 24 poços (10^5 células / poço). POH e PA foram utilizados nas concentrações de 500, 1500 e 3000 μM e etoposídeo na concentração de 200 μM , por 24 horas.

Após, as células K562 foram recolhidas, centrifugadas a 1200 x g por 10 minutos e ressuspensas em 50 μL de meio com soro. Uma alíquota de 25 μL de células foram coradas com 2 μL de uma mistura de laranja de acridina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e brometo de etídeo (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS e examinados imediatamente em microscópio de fluorescência (Eclipse TE2000-U, Nikon) em comprimento de onda de 490 nm. As células A172 receberam no próprio poço da placa 150 μL da mistura de laranja de acridina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e brometo de etídeo (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS e a análise realizada como acima descrita.

3.7 Dosagem de proteínas

A dosagem foi realizada segundo Lowry *et al.* (1951). Brevemente, 2 μL de amostras foram diluídas em 98 μL de água destilada. Após, foram adicionados 1ml de RCA (CuSO_4 1%, Tartarato-NaK 2%, Na_2CO_3 2%, NaOH 0,1N) por 10 minutos e 50 μL do reativo de folling (Sigma) por 30min, protegido da luz.

A densidade óptica foi medida no comprimento de onda de 570 nm, usando um leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP – Reader).

3.8 Avaliação da apoptose por western blot

3.8.1 - Tratamento das células

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (5×10^6 células / poço), tratadas com POH e PA nas concentrações de 500, 1000 e 1500 μM , e etoposídeo, na concentração de 200 μM , por 24 horas. Após, foram homogeneizadas em tampão de amostra (Sigma[®], EUA) diluído em: 0,173 M Tris; 30 % glicerol; 3 % SDS; 3 % β -mercaptoetanol, pH 6,8 e mantido a 4 ° C. Após fervura, a 100 ° C por 5 minutos, as proteínas foram dosadas com base no método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Após estabelecer a mesma concentração de proteínas para todas as amostras (50 μg /poço), foram adicionados a elas volumes iguais do mesmo tampão de amostra citado com 1mg de azul de bromofenol.

3.8.2 - Western blot

Os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese (GIBCO, EUA) possuíam 4 % (gel de entrada) ou 12,5 % (gel de separação), com 0,75 mm de espessura. Foram adicionados 50 μg de proteína por poço.

A eletroforese foi realizada com o padrão de peso molecular (10 – 250kd) Molecular Rainbow Weight Marker[™] (Amersham Biosciences, RU), para a separação e identificação futura por peso molecular das proteínas. A corrida foi realizada a 100 volts, por um tempo médio de 2 horas (Power Pac 200 – Bio-Rad, EUA), sendo em seguida transferida para membranas PVDF (Hybond[™]-P, Amersham Biosciences, RU) a 15 Volts por 25 minutos (Semi Dry – Bio-Rad, EUA). Após, as membranas foram

bloqueadas com 5 % de leite desnatado em TBST (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, MgCl₂ 1mM) + 0,05% Tween20, pH 7,4 em temperatura ambiente sob agitação por 2 horas.

Ao fim do bloqueio, iniciou-se a incubação de cada membrana com o anticorpo primário específico (Tabela 1), a 4° C por 16 horas. Após a lavagem das membranas com TBS (Tris 0,05M, NaCl 0,15M, MgCl₂ 1mM), estas foram incubadas com anticorpos secundários apropriados (anti-coelho, titulação de 1:2000 (Bio Rad)) conjugados à peroxidase (HRP), para detecção dos anticorpos primários, em temperatura ambiente e sob agitação por 2 horas. O anticorpo contra β -actina já é conjugado à peroxidase, não havendo necessidade de incubação com anticorpo secundário.

As bandas foram detectadas por quimioluminescência com o uso do kit ECL Plus[™] (Amersham Biosciences, RU) e subsequente exposição ao filme Hyperfilm ECL[™] (Amersham Biosciences, RU) por 5 minutos. A análise quantitativa por densitometria óptica foi realizada utilizando o programa de análise de imagem Scion Program (National Institute of Health, Image Program, USA).

Tabela 2: Anticorpos usados na técnica de western blot.

Anticorpos	Origem	Diluição	Fornecedor
NFkB ativado	Coelho	1/500	Santa Cruz
Caspase-3 ativada	Coelho	1/1000	Abcam
β -Actina-HRP	Humano	1/500	Santa Cruz

3.9 Zimografia

Esta técnica foi realizada segundo Kherif (1999) com o objetivo de determinar a atividade gelatinase das metaloproteases (MMP-2 e 9). Para tal, células foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^6 células / poço) e tratadas com POH, PA (nas concentrações de 500, 1500 e 3000 μM) e etoposídeo (200 μM) por 24h. As células foram centrifugadas, os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196°C). Foram diluídos em tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 7,6; 200 mM NaCl; 100 mM CaCl_2 e 1% Triton x-100) a 4°C . A concentração protéica foi determinada através do método de Lowry (item 3.7).

Os géis de poliacrilamida (gel de entrada 4% e gel de separação, 7,5%) foram impregnados com gelatina tipo A (2 mg/mL) de pele de porco (Sigma[®], St. Louis Mo., EUA). A eletroforese foi realizada com 25 μg de proteína / poço para cada uma das amostras, com voltagem de 165 volts por um tempo médio de 1 h (Power Pac 200 – Bio-Rad, EUA).

Em seguida, os géis foram lavados duas vezes por 30 minutos em solução 2,5 % Triton X-100 à temperatura ambiente e incubados por 24 h em tampão de desenvolvimento (10 mM Tris-HCL, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) pH 7,5 a 37°C . Os géis foram corados (30 % metanol, 10 % ácido acético e 0,5 % Coomassie Brilliant Blue R-250) e depois descorados com a mesma solução sem o corante. A atividade gelatinase foi detectada por bandas não coradas em fundo azul, representando áreas de proteólise da proteína substrato (gelatina). A análise quantitativa por densitometria óptica foi realizada utilizando o programa de análise de imagem Scion Program (National Institute of Health, Image Program, USA).

3.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando os programas Excel (Office 2003), GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad software Inc. EUA) e GraphPad InStat. O cálculo de IC₅₀ foi realizado por regressão linear e a existência de diferenças significativa entre os tratamentos foi estabelecida pelo teste de t de *Student*. O nível de significância $\alpha = 5\%$ foi adotado para comparar dados de um mesmo experimento. Assim, foram adotadas como significativas as diferenças que geraram $p < 0,05$. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética \pm desvio padrão de experimentos feitos em triplicatas.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade do POH e PA

4.1.1 Análise da viabilidade pela redução do MTT

Células K562 e A172 foram incubadas, por 48 horas, em presença de diferentes concentrações do POH e PA. Nas células K562, o IC₅₀ (concentração de droga capaz de matar 50% das células) do POH foi de 2616,32 μ M e do PA de 3469,95 μ M, diferença não significativa ($p = 0,067$) (Figura 8).

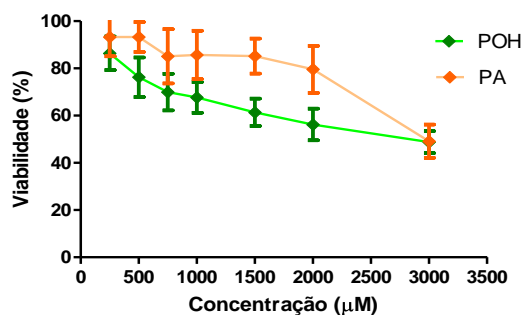


Figura 8: Avaliação da viabilidade de células K562 pelo ensaio de redução do MTT. Após 48 horas de incubação com POH e PA em diferentes concentrações, a análise da redução do MTT foi feita por espectrofotometria, a 545 nm. Cada ponto corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos feitos em triplicata.

Nas células A172, o IC₅₀ do POH foi de 3191,06 μ M e do PA de 4148,70 μ M.

Esta diferença também não é estatisticamente significativa ($p = 0,257$) (Figura 9).

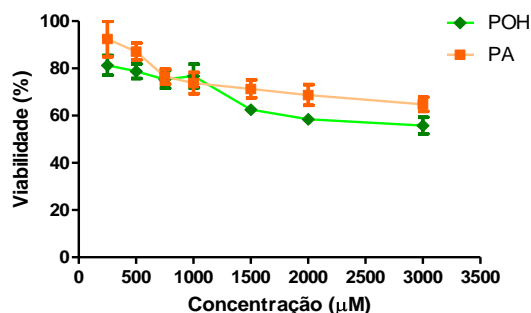


Figura 9: Avaliação da viabilidade de células A172 pelo ensaio de redução do MTT. Após 48 horas de incubação com POH e PA a análise da redução do MTT foi feita por espectrofotometria, a 545 nm. Cada ponto corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos feitos em triplicata.

Foi possível verificar por esta técnica uma tendência das células K562 se mostrarem mais sensíveis ao tratamento com POH do que a A172, mesmo os valores de IC_{50} não sendo diferentes estatisticamente ($p = 0,619$ e $0,459$, respectivamente) (Figura 10A e B).

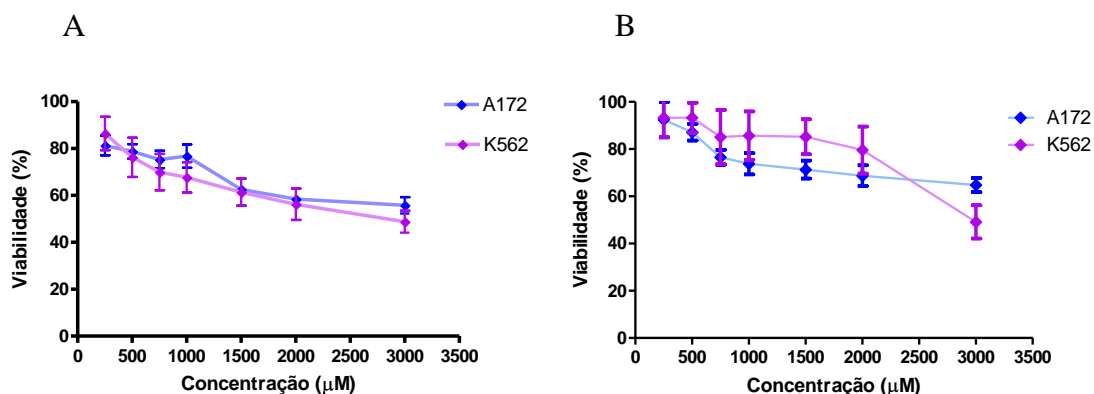


Figura 10: Comparação da viabilidade celular entre as linhagens K562 e A172 pela técnica do MTT. Os valores são referentes ao tratamento das células com POH (A) e PA (B) por 48 horas.

4.1.2 Incorporação do corante Vermelho Neutro

Nas células K562, o IC_{50} do POH foi de $2408,06 \mu\text{M}$ e do PA de $3161,03 \mu\text{M}$.

Esta diferença não é estatisticamente significativa ($p = 0,999$) (Figura 11).

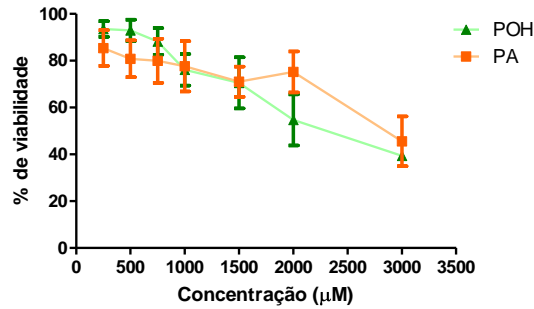


Figura 11: Avaliação da viabilidade de células K562 pelo ensaio de incorporação do corante vital Vermelho Neutro. Após 48 horas de incubação com POH e PA, o meio com as drogas foi retirado e as células foram incubadas com meio contendo vermelho neutro por 3 horas e lisadas. A análise da incorporação foi feita por espectrofotometria, a 545 nm. Cada ponto corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos feitos em triplicata.

Nas células A172, o IC_{50} do POH foi de 2620 μ M e do PA de 2794 μ M, diferença não significativa ($p = 0,172$) (Figura 12).

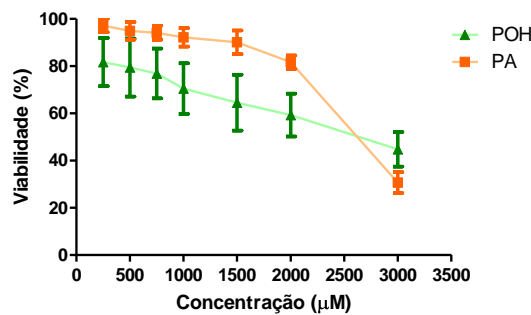


Figura 12: Avaliação da viabilidade de células A172, pelo ensaio de incorporação do corante vital Vermelho Neutro. Após 48h de incubação com POH e PA, o meio com as drogas foi retirado e as células foram incubadas com meio contendo vermelho neutro por 3 horas e lisadas. A análise da incorporação foi feita por espectrofotometria, a 545 nm. Cada ponto corresponde à média \pm desvio padrão de três experimentos feitos em triplicata.

Foi possível verificar que, por esta técnica, as células K562 novamente mostraram tendência em ser mais sensíveis do que as células A172 sob ação do POH, porém sem diferença significativa ($p = 0,564$). Já sob ação do PA, o inverso acontece e as células A172 se mostram mais sensíveis, ainda com valores não significativos ($p = 0,378$) (Figura 13 A e B).

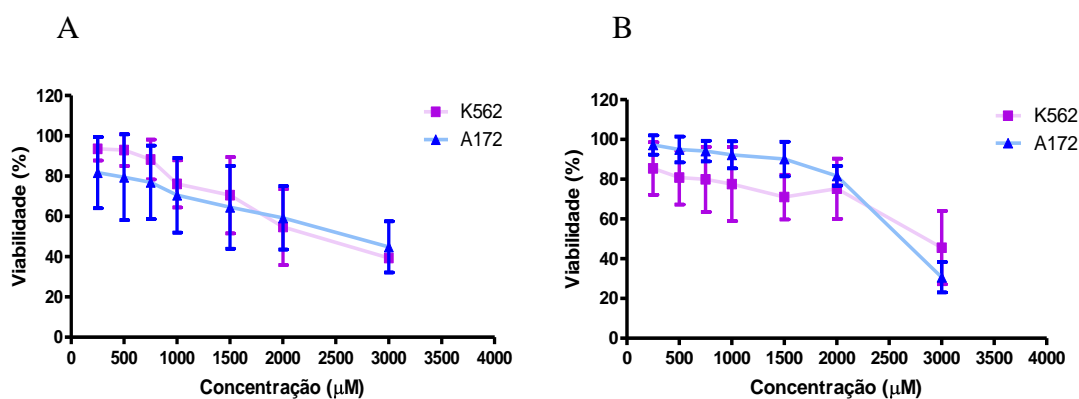


Figura 13: Comparação da viabilidade celular entre as linhagens K562 e A172 pela técnica de incorporação do vermelho neutro. Os valores são referentes ao tratamento das células com POH (A) e PA (B) por 48 horas.

A tabela abaixo apresenta um resumo dos valores de IC_{50} do POH, PA e etoposídeo nas células K562 e A172, pelas duas técnicas de avaliação citotóxica.

Quadro 3: Comparação estatística dos valores de IC_{50} do POH e do PA e entre as diferentes células

CÉL.	REDUÇÃO MTT			VERMELHO NEUTRO		
	POH (IC_{50} em μM)	PA (IC_{50} em μM)	Valor de p	POH (IC_{50} em μM)	PA (IC_{50} em μM)	Valor de p
K562	2616,32	3469,95	0,067	2620	2794	0,999
IC_{50} etop.	217,78			244,36		
A172	3191,06	4148,70	0,257	2408,06	3161,03	0,172
IC_{50} etop.	169,02			211,67		

4.2 Análise do potencial teórico do POH e PA como drogas de mercado

As análises do potencial teórico foram feitas em colaboração com a Prof^a Helena Carla Castro. Os dados aqui apresentados foram fornecidos por seu aluno de Doutorado Plínio Sathler.

Os dois compostos, POH e PA, foram submetidos à análise *in silico* usando o programa Osiris para avaliar o potencial teórico destes compostos como candidatos a novos fármacos, comparando com o etoposídeo, quimioterápico já comercializado.

Foram determinados os valores de cLogP (que corresponde a lipofilicidade do composto), risco toxicológico (efeitos irritantes, mutagênico, tumorigênico e reprodução), “*druglikeness*” (avalia a frequência de ocorrência de fragmentos comuns a fármacos comerciais) e “*drug score*” (combina “*druglikeness*”, cLogP, LogS, massa molecular e risco de toxicidade) que gera um valor que infere o potencial de um composto se tornar um futuro fármaco.

Segundo as análises, os compostos (POH e PA) apresentaram um perfil de “*druglikeness*” e “*drug score*” inferiores ao estimados para o etoposídeo (Figura 14). As barras inferiores (valores negativos) correspondem ao “*druglikeness*” e as barras superiores (valores positivos), ao “*drug score*”.

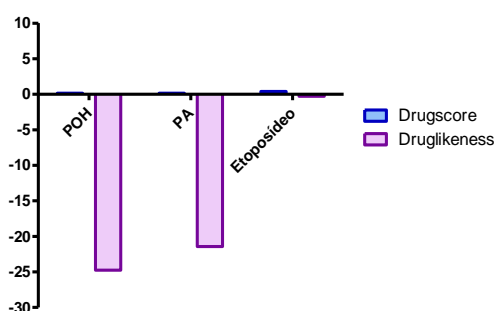


Figura 14: Comparação dos valores de “*druglikeness*” e “*drug score*” do POH, PA e etoposídeo. Esta análise foi realizada utilizando o programa Osiris Property Explorer.

A avaliação da toxicidade no Osiris mostrou que POH e PA possuem nível médio de causar efeitos mutagênicos, tumorigênico e reprodutivo. Ambos possuem alto risco de causar efeito irritante. Já o etoposídeo possui baixo risco para todos os efeitos citados (Figura 15).

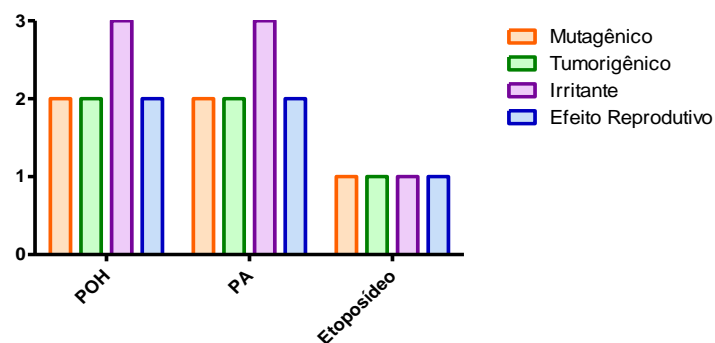


Figura 15: Risco de toxicidade para POH, PA e etoposídeo. Esta análise foi realizada utilizando o programa Osiris Property Explorer.

4.3 Análise das características morfológicas das células tratadas com POH e PA

Foram retiradas fotos das duas linhagens celulares com POH e PA na concentração de 3000 μM referentes ao tratamento por 48h. A figura 16 A mostra as células da linhagem A172 após incubação com POH e a Figura 16 B, das mesmas em presença do PA. É possível perceber que as células tratadas com POH apresentam morfologia arredondada e a monocamada não se mostra de maneira homogênea, quando comparada ao controle.

Já as células tratadas com PA não apresentaram alteração de morfologia quando comparadas com o controle.

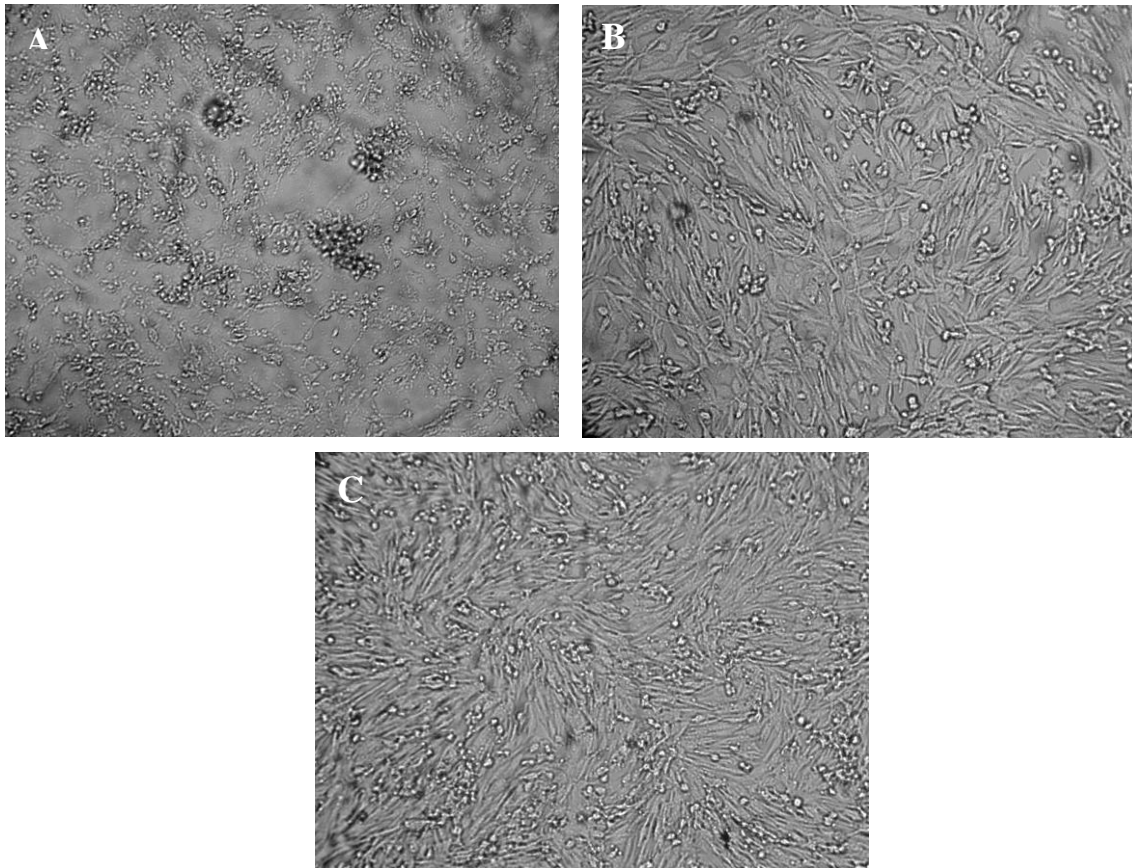


Figura 16: Efeito do POH e PA na morfologia de células A172. Células incubadas com 3000 μM de POH (A) e PA (B) ou meio (C), por 48 horas, foram observadas por microscopia óptica (aumento de 100X).

A figura 17 A mostra as células da linhagem K562 após incubação com POH e a Figura 17 B, das mesmas em presença do PA. É possível perceber que as células tratadas com POH, além de estarem em menor número, perderam o formato arredondado e a característica de se aglomerarem, formando estruturas semelhantes a cachos de uva. Pode-se notar também a presença de fragmentos celulares espalhados pelo campo.

Já as células tratadas com PA não apresentaram alterações tão drásticas, com somente algumas células tendo perdido o formato arredondado, porém mantendo a conformação aglomerada, semelhante ao controle (células sem tratamento).

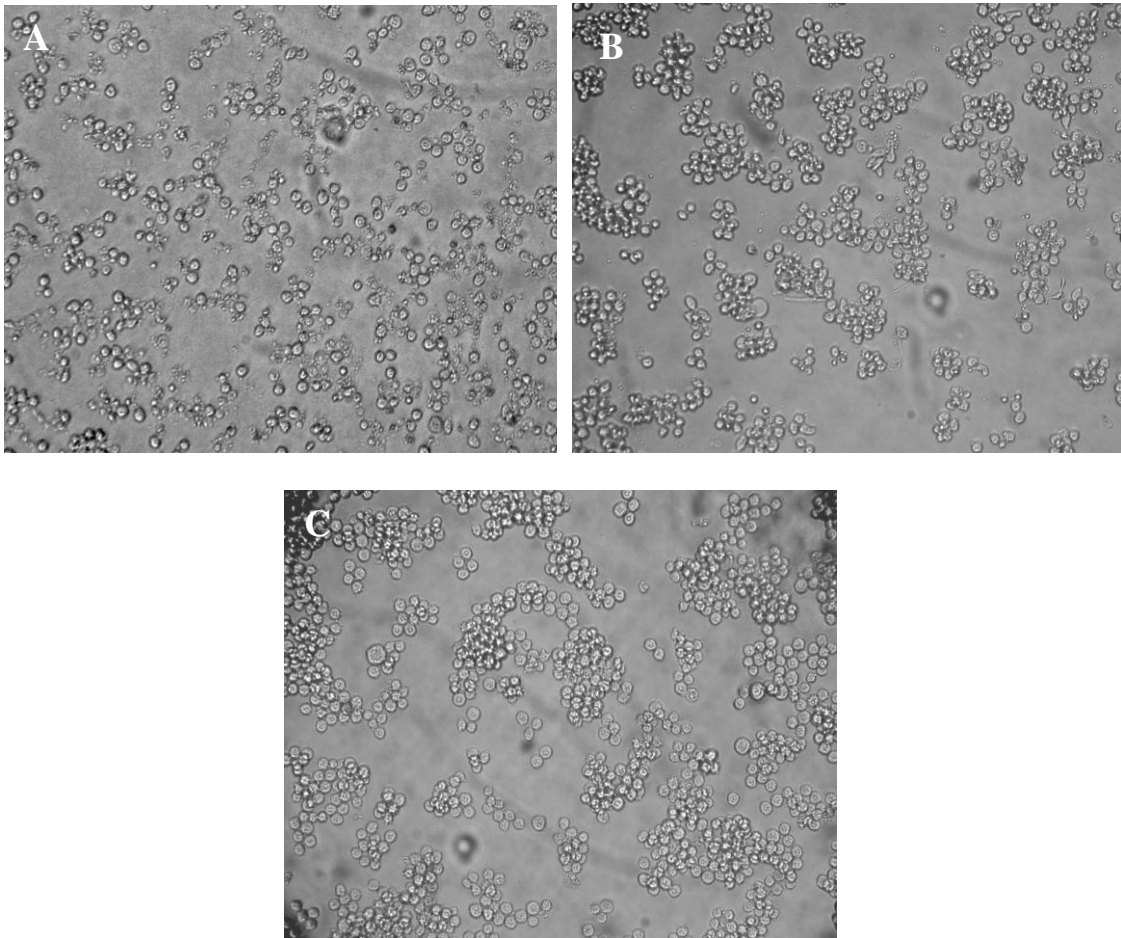


Figura 17: Efeito do POH e PA na morfologia de células K562. Células incubadas com 3000 μM de POH (A), PA (B) ou meio (C), por 48 horas, foram observadas por microscopia óptica (aumento de 100X).

4.4 Análise da apoptose

4.4.1 Análise pela fragmentação nuclear

A fim de avaliar a apoptose, o padrão de fragmentação em escadas do DNA foi analisado. A figura 18 A mostra o resultado da eletroforese do DNA das duas linhagens celulares tratadas com POH, enquanto a figura 18 B mostra os resultados do tratamento com PA. Em ambos os tratamentos é possível verificar um rastro abaixo de cada poço do gel, indicando fragmentação do DNA, porém não é possível identificar o “padrão de fragmentação em escada” característico de apoptose.

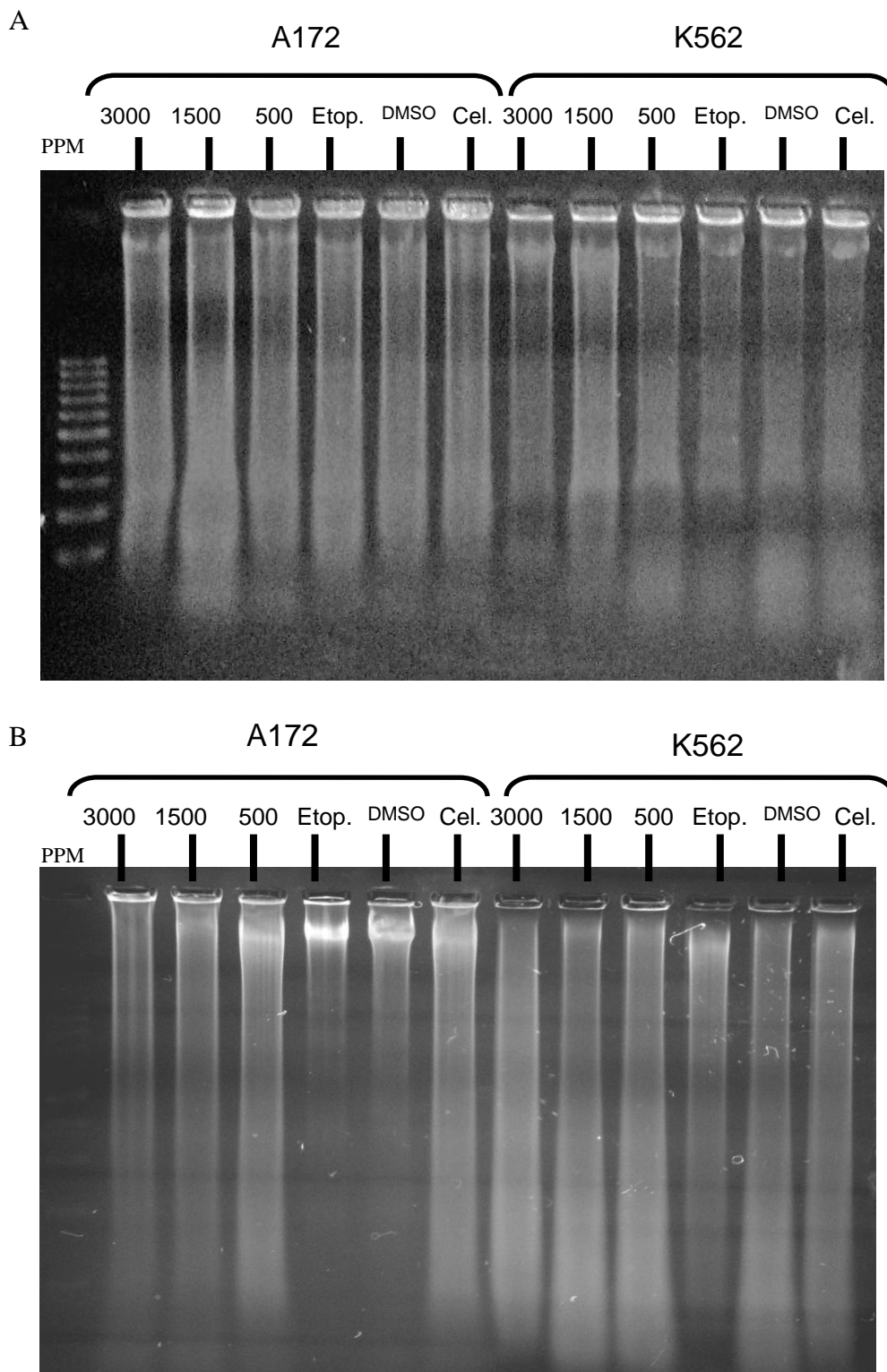


Figura 18: Eletroforese do DNA das células tratadas. As duas linhagens celulares foram tratadas com POH (A) e PA (B) por 24 horas e seus DNAs foram extraídos e usados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os valores acima correspondem às concentrações de cada composto, em μM . Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas.

4.4.2 Análise morfológica da apoptose

Já que não foi possível verificar apoptose pela eletroforese do DNA e como células em processo de apoptose exibem mudanças morfológicas características do processo, foi realizado um experimento com os corantes laranja de acridina e brometo de etídio, a fim de analisar a morfologia de tais células sob microscópio de fluorescência, após 24 horas de incubação com POH e PA.

Nas células K562, foi possível verificar células já mortas (coradas em vermelho), células ainda viáveis (coradas em verde) e células entrando no processo de apoptose. Essas características foram mais evidentes no tratamento com POH, na concentração máxima (3000 μM). Já no tratamento com PA, as células apresentavam morfologia normal. Foram retiradas fotos, que estão representadas na figura 19. A figura 20 representa a contagem das células com três características diferentes: viáveis, mortas e apoptóticas.

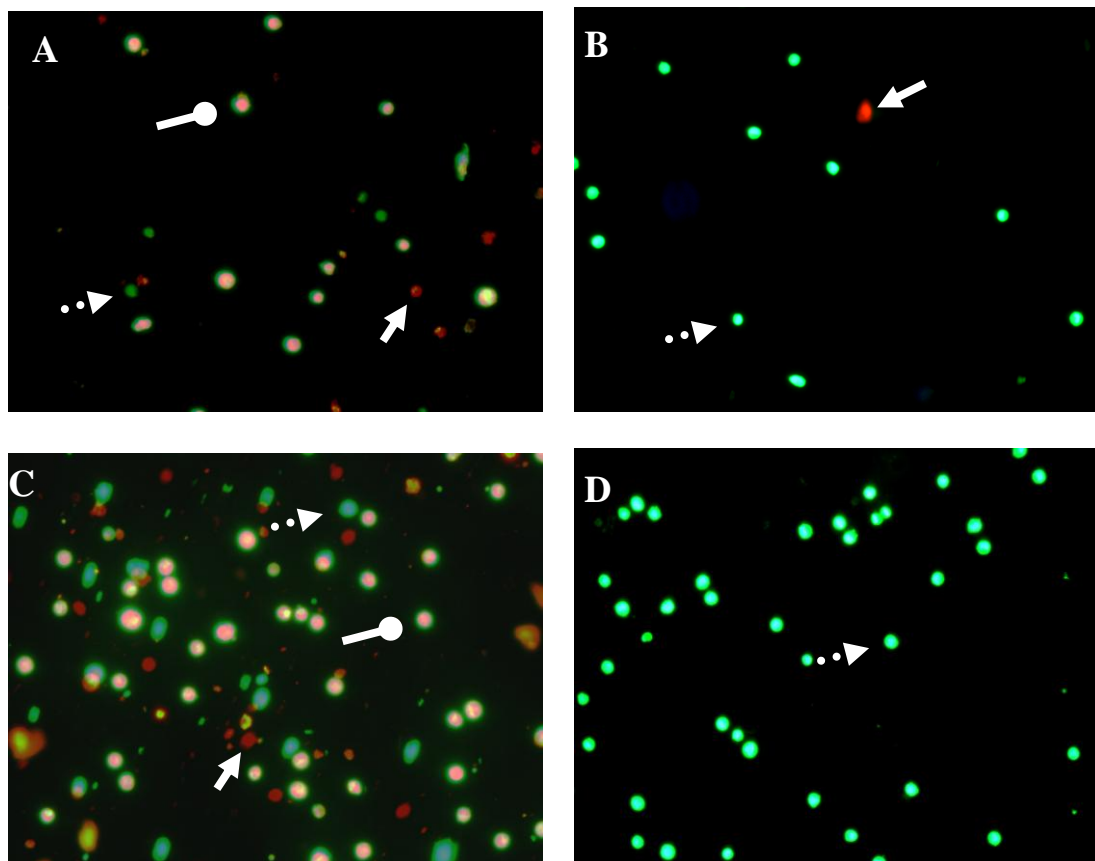


Figura 19: Morfologia das células K562 após tratamento com POH e PA por 24 horas. As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas sob microscópio de fluorescência, no aumento de 100X. A figura A representa o tratamento com POH na concentração de 3000 μM ; a figura B, tratamento com PA à 3000 μM , foto C, controle positivo - etoposídeo (200 μM) e D, células não tratadas. As setas tracejadas identificam as células vivas; as com linha cheia, células mortas e as com ponta arredondada, células em apoptose.

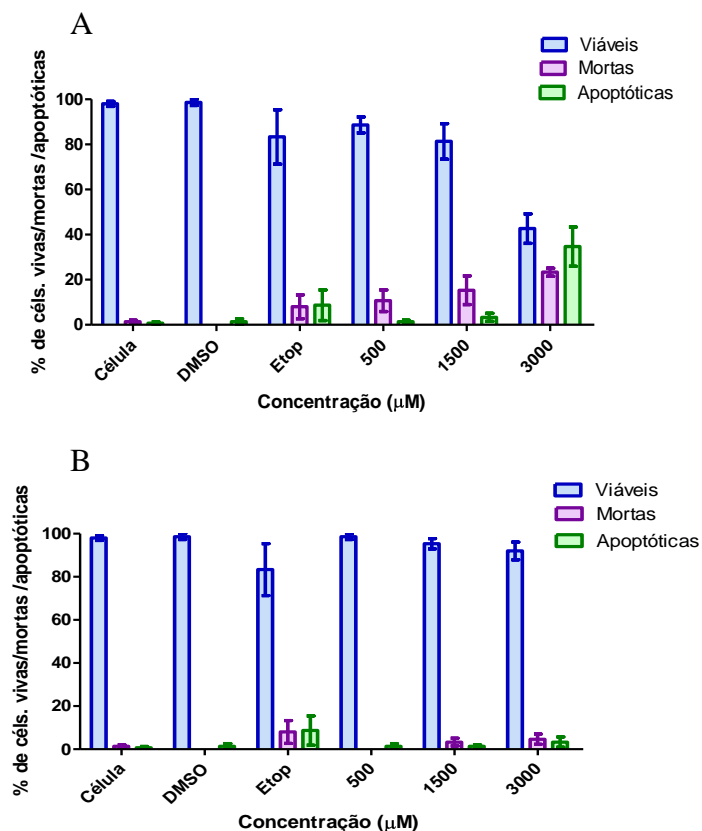


Figura 20: Gráfico representativo da contagem de células K562 com características viáveis, mortas e apoptóticas. O gráfico A corresponde ao tratamento com POH e o gráfico B, tratamento com o PA, ambos por 24 horas. Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo.

A figura 21 representa as células A172 sob as mesmas condições. Por tal célula ser aderente, a análise do processo de apoptótico se torna mais difícil e só foi possível identificar duas características: células viáveis (coradas em verde) e células mortas (coradas em vermelho). O tratamento com POH apresentou mais células mortas quando comparado com o tratamento com PA.

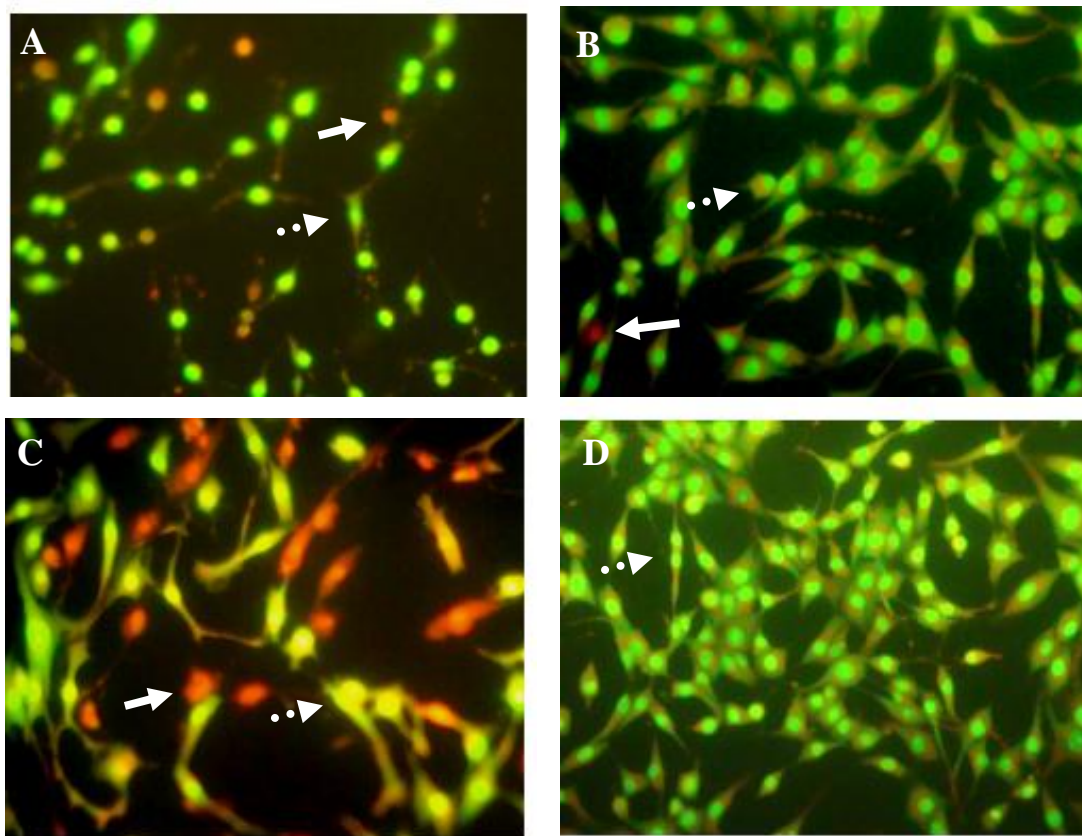


Figura 21: Morfologia das células A172 após tratamento com POH e PA por 24horas. As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas sob microscópio de fluorescência, no aumento de 100X. A figura A representa o tratamento com POH na concentração de 3000 μM ; a figura B, tratamento do PA a 3000 μM , a foto C o controle positivo etoposídeo (200 μM) e D, células não tratadas. As setas tracejadas identificam as células vivas e as com linha cheia, células mortas.

Sob o tratamento do POH por 24 horas, as células A172 apresentaram alteração nos seus prolongamentos, se mostrando de forma mais afilada. O nível dos prolongamentos celulares diminuiu conforme se aumentava a concentração do composto (Figura 22). No tratamento com PA, tal alteração não ocorreu e as células permaneceram viáveis.

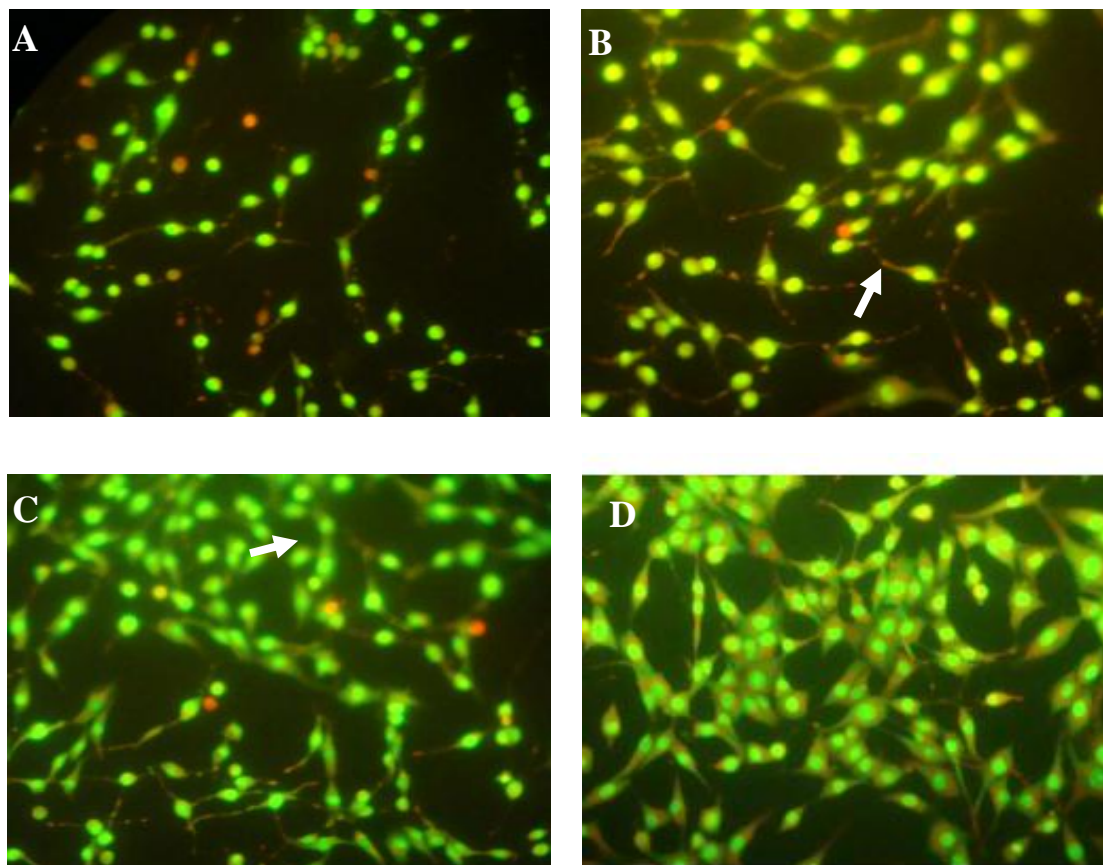


Figura 22: Morfologia das células A172 após tratamento com POH por 24 horas. As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas sob microscópio de fluorescência, no aumento de 100X. A figura A representa o tratamento com POH na concentração de 3000 μM , figura B, à concentração de 1500 μM , figura C, 500 μM e D, células sem tratamento. As setas brancas ressaltam a característica afilada dos prolongamentos celulares.

A figura 23 representa a contagem das células com as duas características diferentes: viáveis e mortas.

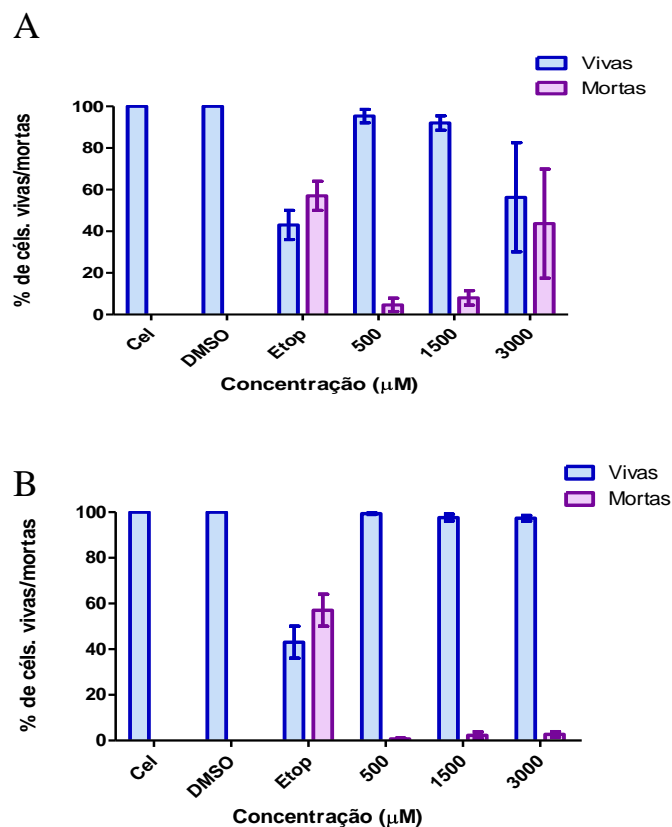


Figura 23: Gráfico representativo da contagem de células A172 com características viáveis e mortas. O gráfico A corresponde ao tratamento com POH e o gráfico B, tratamento com o PA, ambos por 24 horas. Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo.

4.4.3 Análise da expressão de caspase-3

Também com o objetivo de avaliar a indução de apoptose pelo ponto de vista molecular, a dosagem da expressão da enzima caspase-3 foi realizada, pelo método de western blot, em ambas as linhagens na presença de POH e PA por 24 horas. A proteína β -actina foi utilizada como controle interno.

Na linhagem K562 na presença do POH, observou-se a mesma quantidade de β -actina para todas as concentrações, exceto para a diluição de 3000 μ M, em que a viabilidade celular se encontrou reduzida à menos de 50% (Figura 9). Houve marcação para caspase-3 em todas as amostras, com exceção do DMSO e controle negativo, resultado já esperado (Figura 24A). Os resultados apresentados na Figura 24B

correspondem à quantificação do gel e mostram que houve aumento dos níveis da caspase-3 à medida que aumenta a concentração do POH, resposta dose dependente. A concentração mínima (500 μM), não apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo com etoposídeo.

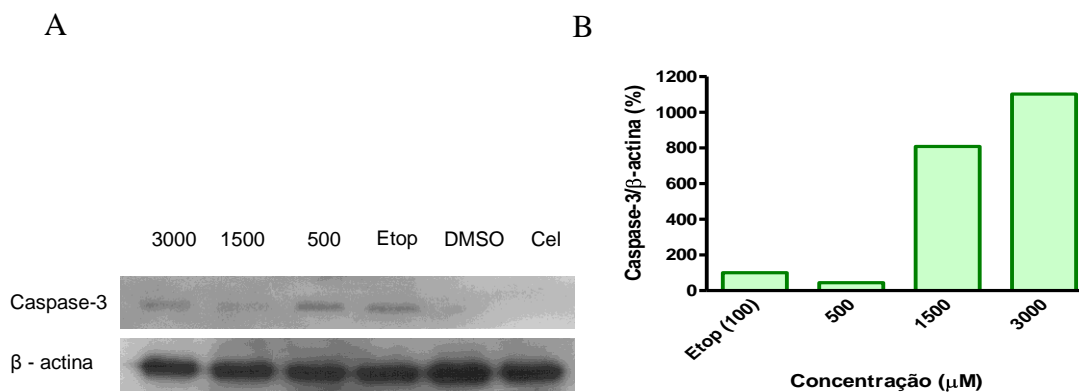


Figura 24: Dosagem dos níveis de caspase-3 das células K562 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do POH (em μM) e o etoposídeo foi considerado o 100% de ativação.

Nesta linhagem, quando na presença do PA, observou-se a mesma quantidade de β -actina para todas as concentrações (Figura 25 A), não havendo agora diminuição para a diluição de 3000 μM , já que a viabilidade celular não se encontra tão reduzida (Figura 9). Os resultados apresentados na Figura 25B correspondem à quantificação do gel e confirmam a expressão de caspase-3 somente na concentração máxima (3000 μM) e em concentração bem menor que o controle positivo.

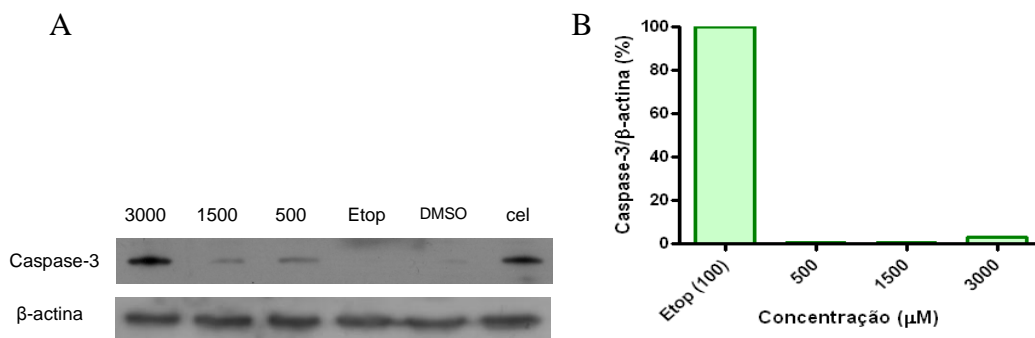


Figura 25: Dosagem dos níveis de caspase-3 das células K562 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do PA (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do PA (em μM) e o etoposídeo foi considerado o 100% de ativação.

Na linhagem A172, na presença do POH, observou-se também a mesma quantidade de β -actina para todas as concentrações e houve marcação para caspase-3 em todas as amostras, com exceção do DMSO e controle negativo, onde esta ausência já era esperada. (Figura 26A). Os resultados apresentados na Figura 26B correspondem à quantificação do gel e confirmam a expressão de caspase-3. Somente ocorreu variação estatisticamente significativa do nível de caspase ativada no tratamento com POH em presença da concentração máxima (3000 μM).

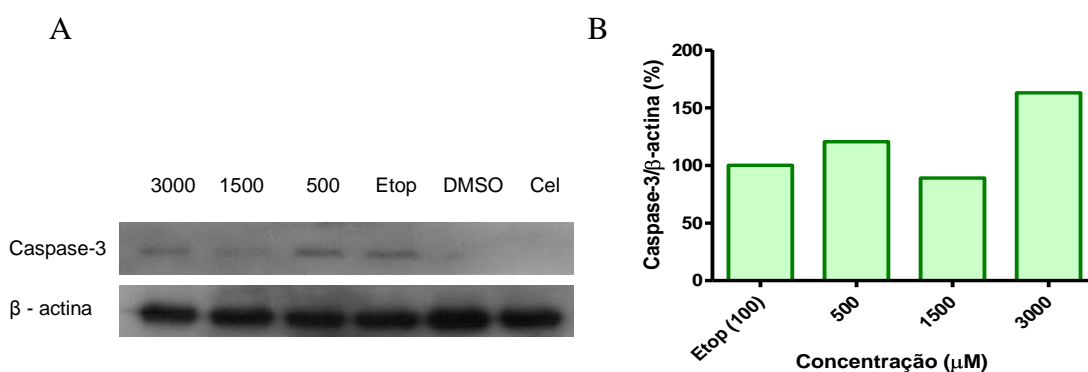


Figura 26: Dosagem dos níveis de caspase-3 ativada nas células A172 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do POH (em μM) e o etoposídeo foi considerado o 100% de ativação.

A linhagem A172, quando na presença do PA, não apresentou marcação de expressão de caspase-3.

Comparando as duas linhagens celulares, é possível perceber que a os níveis de caspase-3 se encontram mais altos no tratamento da linhagem K562 (Figuras 24 e 26B).

4.5 Análise da expressão de NFκB

A dosagem da expressão de NFκB também foi realizada pela técnica de western blot. Ambas as linhagens foram incubadas na presença de POH e PA por 24 horas e a proteína β-actina foi utilizada como controle interno.

Na linhagem K562 na presença do POH observou-se a mesma quantidade de β-actina para todas as concentrações, exceto para a concentração de 3000 μM, em que a viabilidade celular se encontrou reduzida à menos de 50% (Figura 9). Houve marcação para NFκB em todas as amostras (Figura 27A). Os resultados apresentados na Figura 27B correspondem à quantificação do gel e mostram que a marcação de expressão de NFκB das amostras não apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

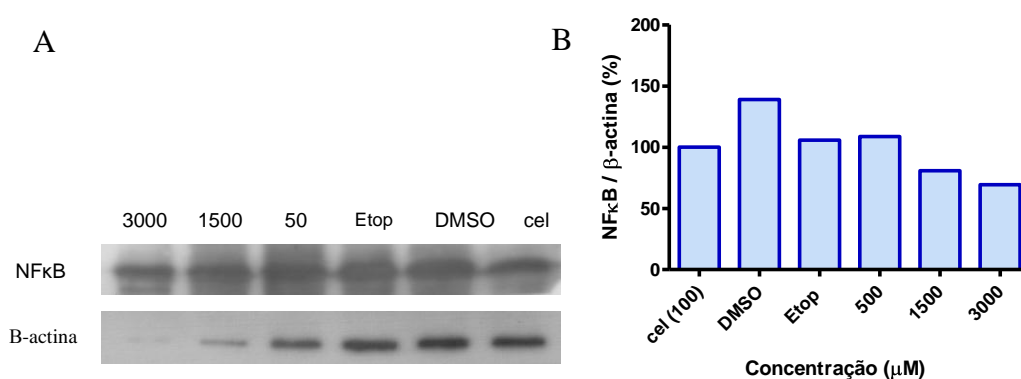


Figura 27: Dosagem da expressão de NFκB das células K562 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do POH (em μM) e cel. foi considerado o 100% de ativação.

Na presença do PA, observou-se também a mesma quantidade de β -actina para todas as concentrações e marcação de NF κ B em todas as amostras (Figura 28A). Os resultados apresentados na Figura 28B correspondem à quantificação do gel e confirmam a expressão de NF κ B. Não ocorreu variação estatisticamente significativa de nenhuma amostra em relação ao controle positivo.

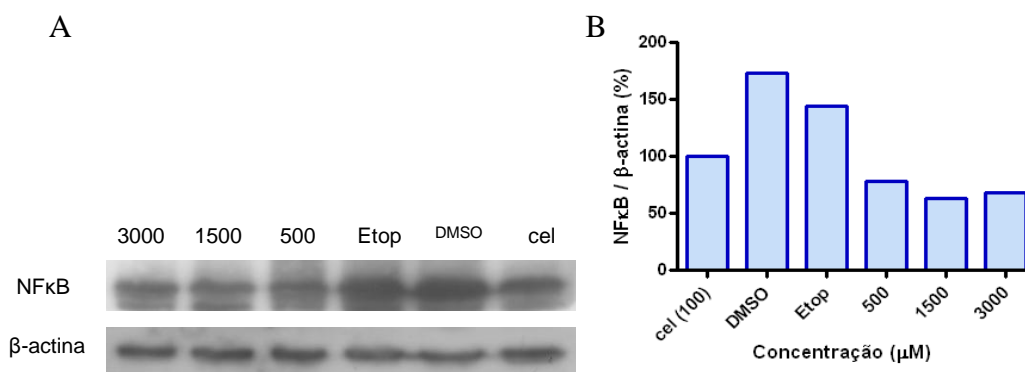


Figura 28: Dosagem da expressão de NF κ B das células K562 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do PA (em μ M). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do PA (em μ M) e cel. foi considerado o 100% de ativação.

Na linhagem A172, na presença do POH, observou-se a mesma quantidade de β -actina para todas as concentrações. Houve marcação para NF κ B em todas as amostras (Figura 29A). Os resultados apresentados na Figura 29B correspondem à quantificação do gel e confirmam a expressão de NF κ B. Não ocorreu variação estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, com exceção da concentração mínima (500 μ M), onde houve aumento da expressão da proteína.

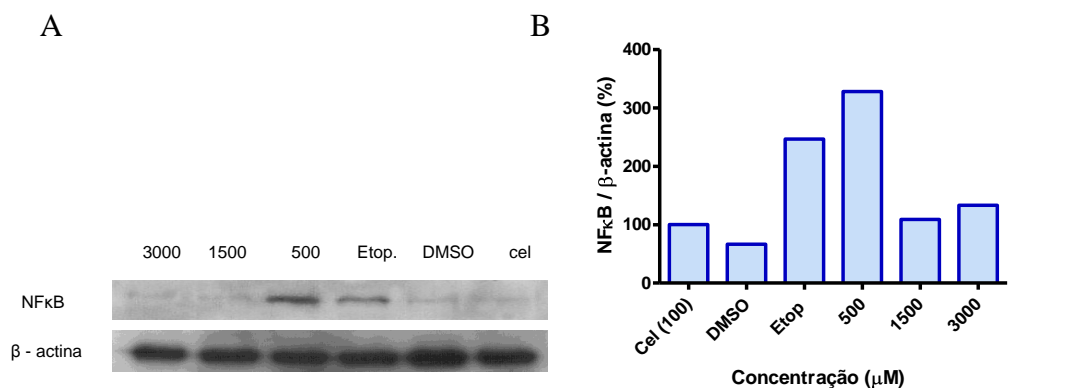


Figura 29: Dosagem da expressão de NFκB das células A172 incubadas com POH por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do POH (em μM) e cel. foi considerado o 100% de ativação.

Na presença do PA, observou-se também a mesma quantidade de β-actina para todas as concentrações e marcação de NFκB em todas as amostras (Figura 30A). Os resultados apresentados na Figura 30B correspondem à quantificação do gel e confirmam a expressão de NFκB. Não ocorreu variação estatisticamente significativa em relação ao controle positivo, com exceção da amostra tratada com o etoposídeo, onde houve aumento da expressão da proteína.

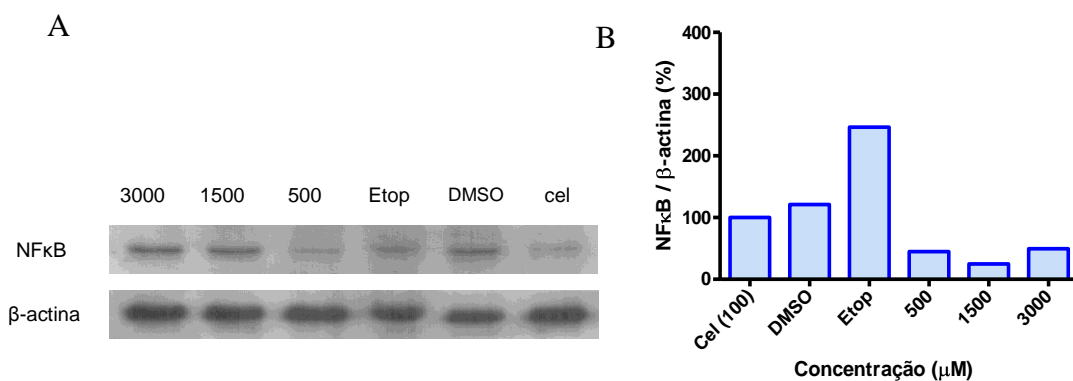


Figura 30: Dosagem da expressão de NFκB das células A172 incubadas com PA por 24 horas, pela técnica de western blot. A figura A representa a radiografia do gel de poli-acrilamida. Os números acima do gel correspondem às concentrações do PA (em μM). Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas. A figura B representa a quantificação do gel por densitometria óptica. A numeração do eixo X corresponde às concentrações do PA (em μM) e cel. foi considerado o 100% de ativação.

4.6 Análise da expressão de metaloproteases

A técnica de zimografia foi utilizada com o objetivo de avaliar a atividade gelatinase de metaloproteases. A figura 31 mostra a expressão das metaloproteases 2 e 9 em células K562 tratadas com POH e PA. É possível verificar que a expressão de MMP-2 é maior que MMP-9 em todas as concentrações dos dois compostos e nos controles positivo e negativo.

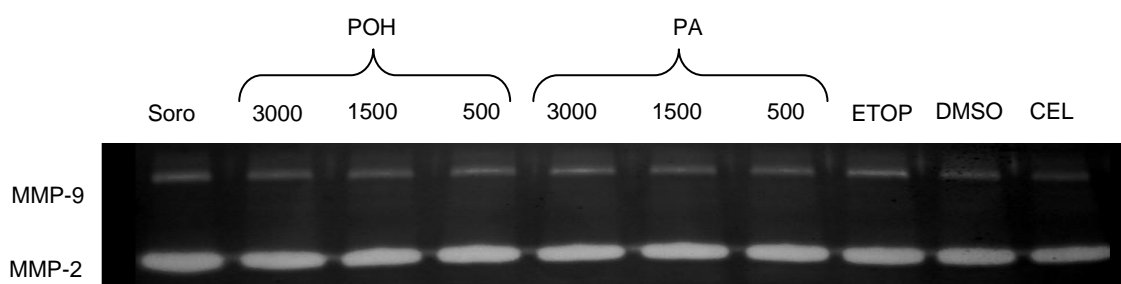


Figura 31: Resultado da zimografia de células K562 tratadas com POH e PA por 24 horas. O gel de poliacrilamida foi submetido à eletroforese com 25 µg de proteína / poço, por 1 hora e corados com Comassie Blue. A atividade gelatinase foi detectada por bandas não coradas em fundo azul, representando áreas de proteólise da gelatina. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH e PA (em µM); Soro – controle de carregamento; Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas.

A figura 32 mostra os gráficos resultantes da análise de densitometria do gel acima mostrado. O gráfico A é referente à atividade da MMP-2 e é possível verificar que, apesar de não haver diferença significativa entre o POH e PA em todas as concentrações e entre as concentrações dos mesmos, há aumento da atividade da MMP-2 em todas as concentrações em relação ao controle, inclusive do controle positivo (etoposídeo) ($p < 0,05$). O gráfico B representa a atividade da MMP-9. O resultado é semelhante ao da atividade da MMP-2, porém com % de atividades maiores.

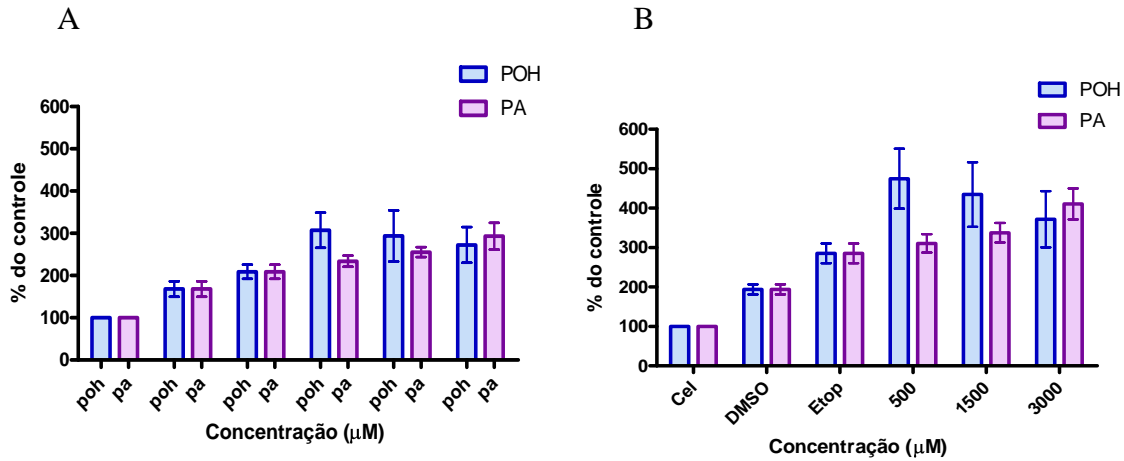


Figura 32: Gráficos resultantes da análise dos géis de zimografia das células K562. A análise foi feita utilizando o programa de análise de imagem Scion Program (National Institute of Health, Image Program, USA). O gráfico A é correspondente à atividade da MMP-2 e o gráfico B, da MMP-9.

A figura 33 mostra a expressão das metaloproteases 2 e 9 em células A172 tratadas com POH e PA. É possível verificar que, da mesma forma que nas células K562, a expressão de MMP-2 é maior que MMP-9 em todas as concentrações dos dois compostos e nos controles positivo e negativo.

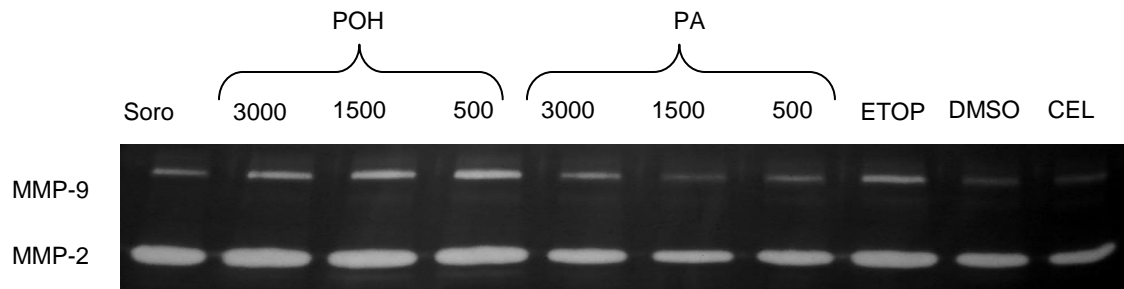


Figura 33: Resultado da zimografia de células A172 tratadas com POH e PA por 24 horas. O gel de poliacrilamida foi submetido à eletroforese com 25 μg de proteína / poço, por 1 hora e corados com Comassie Blue. A atividade gelatinase foi detectada por bandas não coradas em fundo azul, representando áreas de proteólise da gelatina. Os números acima do gel correspondem às concentrações do POH e PA (em μM); Soro – controle de carregamento; Etop. – controle positivo; DMSO – controle negativo; Cel. – células não tratadas.

A figura 34 mostra os gráficos resultantes da análise de densitometria do gel acima mostrado. O gráfico A é referente à atividade da MMP-2 e os resultados são semelhantes aos apresentados nas células K562. É possível verificar que não há

diferença significativa entre o POH e PA e entre as concentrações dos mesmos, porém há aumento da atividade da MMP-2 em todas as concentrações em relação aos controles ($p < 0,05$). O gráfico B representa a atividade da MMP-9. O resultado é semelhante ao da atividade da MMP-2 e, nesta linhagem, não há diferença significativa entre a atividade das duas metaloproteases (% de atividade semelhante).

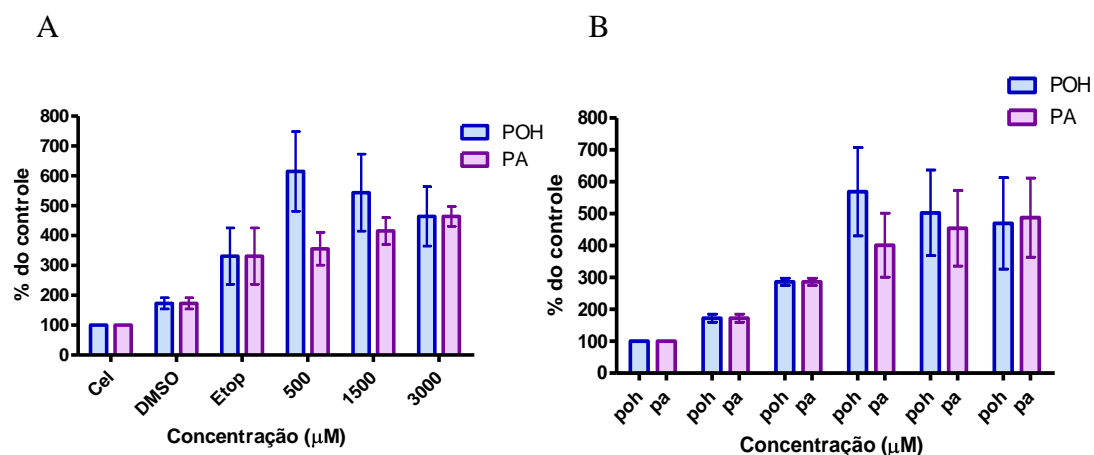


Figura 34: Gráficos resultantes da análise dos géis de zimografia das células A172. A análise foi feita utilizando o programa de análise de imagem Scion Program (National Institute of Health, Image Program, USA). O gráfico A é correspondente à atividade da MMP-2 e o gráfico B, da MMP-9.

5 DISCUSSÃO

Diversos monoterpenos possuem atividade quimioterapêutica e quimiopreventiva contra células tumorais (Yeruva *et al.*, 2007; Samaila *et al.*, 2004). Os ensaios clínicos com POH mostram que o mesmo é rapidamente metabolizado e já não pode ser medido no sangue 2 horas após a administração. Por isso, não é claro se o POH por si só ou um de seus metabólitos, PA ou DHPA, é o composto ativo (Xu *et al.*, 2004). Logo, se torna importante a realização de estudos com o objetivo de comparar a eficácia do POH e seus metabólitos.

Este trabalho mostra, pela primeira vez, um estudo comparativo das atividades do POH e seu metabólito majoritário, PA, em células de LMC e GBM. Apesar do PA ter se mostrado eficiente como droga citotóxica e na indução da apoptose, o POH possuiu atividade mais intensa, como já é descrito na literatura em células de pulmão (Yeruva *et al.*, 2007). Yeruva (2007) foi o único autor, até o momento, que descreveu uma comparação da ação dos dois compostos utilizando linhagens celulares de carcinoma de pulmão de pequenas células.

A citotoxicidade de ambos os compostos já foi diversas vezes testada, com modelos e resultados bastante diversificados. De forma geral, os valores de IC₅₀ encontrados neste trabalho foram mais elevados do que os descritos na literatura. A discrepância entre os resultados deste trabalho e de outros estudos pode ser explicada pela diferença nas linhagens celulares e das condições experimentais usadas.

Outro estudo semelhante a este foi realizado em células de GBM, com avaliação citotóxica do POH com tempo de incubação de 24 horas, utilizando a técnica de redução do MTT. O composto exerceu seu efeito inibitório de maneira dose-dependente e,

enquanto a concentração de 600 μM não exibiu nenhum efeito na viabilidade celular, 6000 μM foi suficiente para exibir máxima redução na viabilidade (Fernandes *et al.*, 2005). Tais resultados estão de acordo com os que foram apresentados neste estudo.

O PA possui sua atividade bem menos descrita e não há na literatura estudos de sua atividade em células de GBM. Porém, em outras linhagens celulares como a H520 (adenocarcinoma humano), seu valor de IC_{50} está em torno de 3.600 μM (Yeruva *et al.*, 2007; Hardcastle *et al.*, 1999).

Nas células de LMC, diversos estudos sobre a ação do POH já foram realizados, porém sem descrição de seus valores de IC_{50} , mostrando novamente o ineditismo destas análises. Com o PA, não há estudos descritos sobre sua atuação neste tipo de câncer.

Vários ensaios de citotoxicidade são atualmente disponíveis, cada um deles usando uma abordagem específica para detectar diferentes aspectos da viabilidade celular, como a integridade da célula, proliferação e funções metabólicas. Nas análises de citotoxicidade, vários trabalhos apontam a importância da utilização de mais de uma técnica de avaliação, já que pode haver diferenças na sensibilidade entre as diferentes metodologias (Schröterová *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2002; Fotakis e Timbrell, 2006).

Em nossos ensaios, além do MTT, realizamos análises com o vermelho neutro. Nossos resultados mostraram que as duas técnicas foram sensíveis para detectar a citotoxicidade do POH e PA e os valores de IC_{50} não apresentaram diferenças significativas entre elas. Também não houve diferença entre os valores de IC_{50} das duas linhagens através desta técnica.

A técnica de incorporação do corante vermelho neutro já foi utilizada para estudos com POH em células A172, porém com tempo de incubação de apenas 30 minutos, bem inferior ao nosso trabalho (Garcia, 2009), tornando assim difícil fazer qualquer tipo de comparação quanto a valores de IC_{50} .

Foi realizada a análise do potencial teórico destes compostos como candidatos a novos fármacos através dos valores de “*druglikeness*” e “*drug score*”, comparado ao etoposídeo, fármaco de mercado. Tal análise mostrou que o POH e PA apresentaram valores de “*druglikeness*” menores do que o etoposídeo (Figura 14). Tais valores, quando positivos, indicam que os compostos analisados contêm, predominantemente, fragmentos que estão presentes com maior frequência nos fármacos comerciais (Tekto, 2005). Neste caso, os valores foram todos negativos, indicando que estes compostos podem ter estruturas semelhantes aos 20% dos fármacos comerciais com valores negativos ou representarem uma “novidade” de estruturas no que diz respeito à fármacos.

Já o “*drug score*”, que combina o potencial de “*druglikeness*”, cLogP, LogS (solubilidade em água), peso molecular e risco de toxicidade, indica o potencial destes compostos se tornarem fármacos (Tekto, 2005). Os valores dos três compostos foram baixos, porém POH e PA foram muito semelhantes entre si e com o etoposídeo, que já é comercializado, indicando uma compatibilidade de resultados com a droga referência, o etoposídeo (Figura 14).

No que diz respeito às análises de toxicidade teórica, POH e PA apresentaram efeitos iguais, porém mais tóxicos que os do etoposídeo (Figura 15). A toxicidade predita por estas análises não garante que estes compostos tenham comportamento igual *in vivo* (Silva *et al.*, 2008), somente prediz o potencial teórico e promissor dos mesmos.

Com o objetivo de avaliar a natureza da inibição na viabilidade, foi analisado o efeito do POH e PA na morfologia destas células. A análise morfológica das células tratadas com os compostos permite verificar com facilidade que o POH apresenta maior efeito citotóxico do que o PA. As células A172 tratadas com PA apresentam características muito semelhantes às do controle, já as tratadas com POH assumem

formato arredondado e a monocamada não se mostra mais homogênea (é possível verificar “buracos”) (Figura 16). Outros estudos mostram alterações morfológicas semelhantes em células de GBM, inclusive a linhagem A172, quando tratadas com POH. Estas alterações incluem formato da célula, que se tornam arredondadas, mudanças na membrana (com estruturas que sugerem apoptose) e na citoarquitetura destas células (Da Fonseca, 2004; Fernandes *et al.*, 2005).

O padrão normal das células K562 é seu formato arredondado e aglomerado, formando estruturas semelhantes a cachos de uva. Sob o tratamento com PA estas células não alteram muito sua morfologia, porém, o POH causa sérios danos à membrana das células, tornando-as enrugadas e disformes, além de romper os aglomerados celulares. É possível verificar também restos celulares, indicando intensa morte (Figura 17). A análise morfológica desta linhagem sob o efeito do PA ainda não havia sido descrita.

Em 1972, Kerr e colaboradores introduziram o termo “apoptose” para descrever um processo de morte celular com características morfológicas únicas: encolhimento celular, condensação do DNA ao longo da membrana nuclear, alterações da membrana plasmática e morte celular sem reação inflamatória (Kerr *et al.*, 1972).

POH é conhecido por induzir apoptose em vários tipos de tumores (Crowell *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1997; Stayrook *et al.*, 1997; Ariazi *et al.*, 1999). Diversos trabalhos mostram apoptose causada por POH em células K562, envolvendo vários mecanismos como bloqueio de ciclo celular, ativação de c-Myc, Mek, dentre outras vias (Sahin *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2003; Clark, 2006). Há também diversos trabalhos descrevendo a indução de apoptose em células A172, envolvendo também diversos mecanismos moleculares (Da Fonseca, 2004; Fernandes *et al.*, 2005).

A maior parte dos trabalhos publicados sobre o mecanismo de ação do PA é relacionado à inibição de isoprenilação de GTPases, incluindo Ras e p21 (Casey *et al.*, 1989; Stayrook *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001) e interferência na produção de interleucinas (Schulz *et al.*, 1997), mas seu efeito na indução de apoptose também já é descrito (Iimura *et al.*, 1997; Bardon *et al.*, 1998).

Com o advento das técnicas bioquímicas como a eletroforese de DNA na década de 80, a apoptose foi relacionada a certos processos de quebra do DNA. Em alguns modelos de apoptose, endonucleases intracelulares ativadas quebram o DNA em fragmentos de 180 pares de bases e múltiplos. Estes podem ser visualizados como padrão de escada no gel de eletroforese. Este padrão é considerado um marco da presença de apoptose (Abend, 2003).

Com o objetivo de verificar e comparar a indução de apoptose causada pelo POH e PA, foi realizada a eletroforese do DNA das células K562 e A172 tratadas por 24h. Em nossos resultados, em ambos os tratamentos, foi possível verificar um rastro abaixo de cada poço do gel, indicando intensa fragmentação do DNA. Porém não foi possível identificar o “padrão de fragmentação em escada” característico de apoptose, talvez por não haver células apoptóticas suficientes para que tais bandas fossem identificadas (Figura 18).

O etoposídeo foi utilizado como controle deste experimento por ser um quimioterápico conhecido por retardar a progressão do ciclo celular, inibir a topoisomerase II, causar “quebras” no DNA e induzir apoptose (Dolega, 1998). A célula K562 já foi descrita como sendo resistente em apresentar fragmentação de DNA e mudanças morfológicas características de apoptose quando tratadas com etoposídeo, possuindo aparência normal por 3 à 4 dias. Em altas concentrações, este tempo reduz para aproximadamente 48h (Martins *et al.*, 1997). Por esse motivo, não foi possível

verificar fragmentação de DNA no gel de eletroforese no tratamento correspondente ao etoposídeo, mesmo este composto sendo conhecido como indutor de apoptose, pois foi realizado num tempo de 24h de incubação. Não há na literatura relatos da resposta da célula A172 ao tratamento com etoposídeo, mas os resultados deste trabalho sugerem que, no tempo de 24h, não houve célula em apoptose suficiente para ser possível a visualização da fragmentação em escada.

As células em processo de apoptose também podem ser identificadas pelas mudanças morfológicas características do processo, como condensação da cromatina, encolhimento celular e formação de expansões na membrana (“*blebbing*”) chamadas de corpos apoptóticos (Luchetti *et al.*, 2004). Diversos corantes podem ser utilizados para, por microscopia de fluorescência, analisar tais alterações. Dois deles, largamente usados e descritos na literatura, são os compostos laranja de acridina e brometo de etídeo.

Para corroborar os resultados de apoptose obtidos pela eletroforese de DNA, uma análise da apoptose por coloração com brometo de etídeo e laranja de acridina foi realizada e as células foram contadas. No tratamento de células K562 com POH, na concentração máxima (3000 μM) encontra-se cerca de 30% de células em apoptose e esse número vai reduzindo conforme reduz a concentração do composto. O mesmo ocorre no tratamento com PA, sendo que a quantidade de células em apoptose, mesmo na concentração máxima, é próxima à do controle (Figuras 19 e 20). Em células tumorais do pulmão o POH também causa mais alterações típicas de apoptose do que o PA, sendo este valor mais que o dobro (Yeruva *et al.*, 2007). Devido a esta baixa quantidade de células apoptóticas, as bandas no gel de eletroforese não foram identificadas.

Com as células A172, não foi possível fazer tal comparação com o padrão e apoptose no gel e a morfologia na microscopia de fluorescência. Por serem células

alongadas, a visualização de núcleos picnóticos ou vacuolização se torna difícil, sendo possível distinguir somente células vivas e mortas pela diferença na coloração, verde e vermelha, respectivamente. Apesar disso, foi possível verificar que, no tratamento com POH, somente a concentração de 3000 μM causou redução significativa no número de células viáveis. No tratamento com PA, nenhuma concentração foi capaz de reduzir o número de células viáveis (Figuras 21 e 23). Este resultado é consistente com as análises de citotoxicidade deste estudo (Figuras 8 e 11).

Há diversos itens a serem considerados antes de se determinar a forma de morte celular induzida por um determinado agente anticancerígeno. Tudo depende do contexto, incluindo o tipo celular, o genótipo da célula, o tipo de dano ao DNA ao qual a célula é exposta e a dose do agente usado (Abend, 2003). Mesmo dentro do mesmo tecido, a heterogeneidade entre as células no tempo após o tratamento, quando a apoptose ocorre, pode ser um problema ao se acessar o nível geral de morte celular. Além disso, a análise da morte celular em um tempo específico pode ser interpretada como mudanças no nível de morte celular, mesmo que seja somente uma mudança na cinética da morte, causada pelo tratamento (Brown e Attardi, 2005). Já é descrito também que as células de um mesmo tratamento com POH podem entrar em apoptose de maneira dessincronizada, o que reflete na heterogeneidade da população celular (Xu *et al.*, 2004).

Outra forma de analisar a indução de apoptose é a dosagem da ativação da caspase-3. Embora exista pelo menos 14 caspases em humanos, somente uma parcela destas enzimas é ativada por diversos estímulos de morte em diferentes tipos celulares, e a caspase-3 faz parte deste grupo. Sua freqüente ativação comprova a necessidade desta protease para a morte da célula e para as muitas mudanças morfológicas associadas à apoptose (Porter e Janicke, 1999). POH é conhecido como indutor da caspase-3 em

diversos tumores (Yeruva *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004), bem como seu metabólito PA (Yeruva *et al.*, 2007).

Com o objetivo de confirmar os resultados acima obtidos, o mecanismo de apoptose foi verificado através da expressão de caspase-3. Foi possível verificar que a linhagem A172, sob tratamento do POH, somente apresentou aumento na expressão de caspase-3 na concentração máxima (Figura 26), enquanto que o PA falhou na indução da ativação desta enzima. Este fato pode estar relacionado à menor capacidade do PA de induzir resposta ou à indução de outra via de morte que não seja a apoptose e, logo, não envolva aumento na expressão de caspase-3. Este fenômeno já foi observado em células de linhagens estabelecidas de GBM, que entram em processo de necrose tardia à medida que aumenta a concentração do POH (Fernandes *et al.*, 2005) e em células de melanoma, onde POH induziu morte por necrose antes de haver qualquer indício de apoptose (Lluria-Prevatt *et al.*, 2002).

Já a linhagem K562 apresentou aumento da expressão de caspase-3 de maneira dose-dependente no tratamento com POH, como já foi verificado por Loutrari e colaboradores (2004) (Figura 24). O tratamento com PA novamente não se mostrou eficaz na indução da expressão da caspase-3 (Figura 25). O PA já foi descrito como indutor da expressão de caspase-3 em células tumorais do pulmão por Yeruva e colaboradores (2007), porém sua capacidade de promover apoptose é bem reduzida quando comparada com POH.

Há várias explicações possíveis para a discrepância de sensibilidade entre as duas linhagens celulares quanto à citotoxicidade e indução de apoptose. Enquanto as células não apresentam diferença significativa entre si em relação ao padrão de resposta à citotoxicidade do POH e PA, a linhagem K562 se mostra mais sensível no que diz respeito às alterações morfológicas e aos efeitos na indução de apoptose. Isso indica que

estas células talvez sejam capazes de iniciar o programa apoptótico em níveis menores de atividade da caspase-3. Isto pode estar relacionado a diferentes tipos de alterações genéticas que ocorrem nas duas linhagens celulares.

Também é possível que outras vias de morte celular possa estar ocorrendo juntamente com a apoptose nas duas células. Uma pequena quantidade de necrose pode estar envolvida nas células que, mediante a análise morfológica, já se apresentavam mortas no tempo de tratamento em questão. Pode ser que as células K562 utilizem um duplo mecanismo (apoptose e necrose) e por isso necessite de menos ativação da caspase-3 para atingir o mesmo nível de morte. O mesmo fenômeno foi descrito com diferentes linhagens de células pulmonares (Xu *et al.*, 2004).

Elevação crônica na atividade de NFκB está associada com muitos tipos de tumores, incluindo leucemia, linfoma, tumores de cabeça e pescoço, ovário, próstata, cólon, tireóide e mama (Namba *et al.*, 2007). O ambiente de hipóxia e a ação de citocinas liberadas pelas próprias células tumorais ou por células sadias infiltradas ativam este fator. Sua ativação media resistência, proliferação e metástase, através da ativação de genes pró-angiogênicos e pró-metástase. Também já é descrito que o NFκB é um antagonista da atividade de p53, induzindo a transcrição de genes anti-apoptóticos. (Karin, 2006; Basak e Hoffmann, 2008). Porém, alguns estudos demonstraram que a ativação do NFκB é um importante fator para a indução da apoptose mediada por Fas (Bian *et al.*, 2001). Sua ativação também promove regulação negativa de bcl-2, translocação de bax e regulação positiva de p53, induzindo apoptose em células endoteliais da aorta humana (Shishodia e Aggarwal, 2004).

Neste estudo, a linhagem K562 apresentou aumento dos níveis de NFκB tanto no tratamento com POH quanto com PA, porém este aumento não foi maior do que o controle (Figuras 27 e 28). O mesmo aconteceu com a linhagem A172 (Figuras 29 e

30). O efeito do POH e PA sobre a ativação do NFκB já foi testada em células WEHI-231 (linfoma de murino). Enquanto o POH foi capaz de diminuir sua indução, o PA não apresentou nenhum efeito (Berchtold *et al.*, 2005).

Uma característica bastante interessante que surgiu na análise dessas células sob tratamento com POH foi seu efeito sobre os prolongamentos celulares. Conforme aumentava a concentração do composto, os prolongamentos diminuía de espessura, praticamente sendo impossível sua observação no tratamento com concentração máxima, onde as células pareciam não mais se conectarem (Figura 22). Esta alteração nos prolongamentos celulares não foi observada no tratamento com PA.

O citoesqueleto é um sistema central na manutenção da morfologia celular e transdução de sinais iniciados na superfície celular. O efeito do POH sobre esse sistema já é descrito na literatura. Em 2002, Wagner e colaboradores mostraram que células de mama tratadas com POH apresentaram arredondamento e perda de organização do citoesqueleto, mas permaneceram viáveis, como foi determinado pelo corante vital Azul de Tripán e ensaio de redução do MTT, sugerindo que o POH pode inibir a migração pelo rompimento da maquinaria de citoesqueleto necessária para exercer força para extensão lamelar (Wagner *et al.*, 2002). POH também induziu morfologia achatada às células de adenocarcinoma, com perda dos contatos intercelulares e condensação da actina na periferia (Cerdeira *et al.*, 1999). Estudos posteriores utilizando marcação para β-actina poderão confirmar tais resultados.

Além de alterações no citoesqueleto, a agressividade de tumores está relacionada também com sua capacidade de invasão. O processo de invasão é complexo e envolve mudanças na adesão célula-célula e célula-matriz, proteólise e migração. Proteólise da matriz extracelular é importante para a invasão tumoral, pois permite às células penetrarem na lâmina basal e liberarem fatores de indução de crescimento e migração

(Ridley, 2004). Embora a migração celular tumoral seja uma característica de metástase, desde 1978, menos de 100 compostos que possuíam alguma atividade de inibição da migração celular foram reportados; entretanto, milhares de compostos ainda não foram testados (Rust *et al.*, 2000).

Uma característica do GBM é sua habilidade de infiltrar e invadir o tecido cerebral normal à sua volta. A migração de células de glioma é uma combinação complexa de múltiplos passos moleculares: soltura do seu local de origem, modificação da adesão com as proteínas da matriz extracelular, degradação desta matriz com proteases secretadas e modificação do citoesqueleto de modo à permitir sua movimentação. Alvos potentes incluem receptores de fatores de crescimento e outras proteínas tirosina quinases, vias de transdução de sinais intracelulares, ativação da ras e atividade de MMPs (Da Fonseca *et al.*, 2006; Nakada *et al.*, 2007). Muitas evidências sugerem que as MMPs contribuem para a invasão do glioma através da degradação da matriz extracelular, relacionando a elevação dos níveis desta enzima com a capacidade invasiva do tumor (Rao, 2003). As razões para isso seriam: MMP-2 e MMP-9 degradam (de forma cooperativa) quase todos os tipos de componentes da matriz extracelular e suas ativações estão relacionadas com dispersão do tumor e prognóstico ruim (Nakada *et al.*, 2007).

Durante a hematopoiese normal, a proliferação e diferenciação de células progenitoras são dependentes da sua interação com o microambiente da medula óssea, que envolve contato célula-célula e adesão à matriz extracelular. A transformação maligna dessas células progenitoras resulta no bloqueio da sua habilidade de diferenciar, causando acúmulo de células imaturas, com conseqüente quebra das interações célula-estroma e disseminação desses elementos sanguíneos imaturos para a corrente sanguínea e tecidos. Sob esse ponto de vista, células leucêmicas são descritas como

invasivas, especialmente *in vitro*, como no caso da linhagem em estudo K562 (Gordon *et al.*, 1987; Devy *et al.*, 1997; Deininger *et al.*, 2000). A expressão de MMPs, especialmente MMP-2 e MMP-9 já é bem descrita em adultos com LMC ou LMA (Ries *et al.*, 1999).

Já que as metaloproteases desempenham papel central na invasão e metástase tumoral, pois degradam colágeno tipo IV, considerado o maior componente da matriz extracelular (Devy *et al.*, 1997), a atividade gelatinase das metaloproteases MMP-2 (72-kDa colagenase tipo IV; gelatinase A) e MMP-9 (92-kDa colagenase tipo IV; gelatinase B) das duas linhagens celulares foram analisadas, pela técnica de zimografia, com o objetivo de estudar o efeito do POH e PA na capacidade invasiva das células.

Nas duas linhagens, tanto no tratamento com POH quanto com PA, a MMP-2 se mostrou mais ativa do que a MMP-9, porém não houve diferença entre o tratamento com POH e PA. Em todas as concentrações, esses dois compostos aumentaram a expressão de ambas as metaloproteases em relação ao controle (Figuras 31 à 34).

O tratamento *in vivo* de células de glioblastoma com POH mostrou inibição da migração celular e atividade antimetastática no modelo do embrião de pinto com células C6 (Teruszkin *et al.*, 2002). *In vitro*, muitos inibidores de MMPs foram efetivos em diminuir a invasão de gliomas (Tonn *et al.*, 1999; Nakada *et al.*, 2007).

Trabalhos com linhagens de células leucêmicas mostram aumento na expressão de MMP-9 (Devy *et al.*, 1997) e a presença de MMP-2 e MMP-9 foi detectada no citoplasma de todos os casos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Schneider *et al.*, 2009). MMP-2 é expressa mais intensamente por células de glioma enquanto que MMP-9 é expressa por células endoteliais em proliferação, sugerindo que MMP-2 é mais importante nas propriedades invasivas de células neoplásicas enquanto que MMP-9 deve regular a angiogênese (Raithatha *et al.*, 2000).

De forma geral, a atividade do PA foi reduzida em todos os experimentos realizados. *In vivo*, não existem evidências de que os metabólitos do POH, como o PA, rapidamente formados no organismo após administração de POH exibam as mesmas propriedades do POH (Azzoli *et al.*, 2003; Boon *et al.*, 2000).

Considerando os dados apresentados e discutidos, os experimentos devem continuar com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação dos dois compostos. Devem também ser realizados novos experimentos capazes de definir se o POH e o PA podem também atuar, na mesma intensidade, sobre as diversas cascatas de sinalização que controlam o crescimento e/ou a morte celular.

Outro parâmetro merecedor de análises mais profundas é a modelagem química da molécula do POH e PA, uma vez que pequenas alterações na estrutura química de compostos alteram suas propriedades físico-químicas e podem influenciar no seu efeito biológico. Este tipo de estudo pode trazer informações importantes para a busca de fármacos mais eficientes.

6 CONCLUSÕES

- POH e PA apresentaram citotoxicidade nas células A172 e K562 em 48 horas de incubação, através das duas metodologias de detecção de citotoxicidade utilizadas. Foi possível observar que o efeito do PA foi menor que o do POH;
- POH promoveu alterações morfológicas das células tratadas por 48 horas, porém tais alterações são mais evidentes na linhagem K562. PA não foi capaz de causar tais alterações em nenhuma linhagem;
- As análises teóricas de “*druglikeness*” sugerem que o POH e PA não possuem fragmentos semelhantes aos presentes na maioria dos fármacos comerciais. Já nas análises de “*drug score*”, os dois compostos apresentaram valores semelhantes ao etoposídeo, fármaco de mercado. Ambos os compostos apresentaram toxicidade teóricas maiores que as do etoposídeo;
- Não foi possível observar células em apoptose, na incubação em presença de POH e PA por 24 horas, pela técnica de eletroforese do DNA. Porém, é possível observar alterações morfológicas características de apoptose, no mesmo tratamento, na linhagem K562;
- Na linhagem A172, POH provocou alterações nos prolongamentos celulares, indicando sua ação no citoesqueleto;
- POH induziu ativação de caspase-3 e seus níveis foram maiores na linhagem K562;
- POH e PA induziram expressão de NFκB em todas as amostras testadas, porém estes resultados não diferem estatisticamente do controle;

- POH e PA aumentaram a expressão de metaloproteases-2 e 9 em ambas as linhagens, sugerindo que os compostos interferem na capacidade invasiva das células;
- O POH apresentou maior efeito citotóxico que PA, nos dois tipos celulares, nas avaliações de alterações morfológicas e indução de apoptose.

7 REFERÊNCIAS

- ABEND, M. 2003. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 79(12):927–941.
- ABREU, P.A. 2008. Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas. Dissertação. UFF - Niterói.
- ARIAZI, E.A.; SATOMI, Y.; ELLIS, M.J.; HAAG, J.D.; SHI, W.; SATTTLER, C.A.; GOULD, M.N. 1999. Activation of the transforming growth factor β signaling pathway and induction of cytostasis and apoptosis in mammary carcinomas treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Cancer Res.* 59:1917-1928.
- AZZOLI, C.G.; MILLER, V.A.; NG K.K.; KRUG, L.M.; SPRIGGS, D.R.; TONG, W.P.; RIEDEL, E.R. AND KRIS, M.G.A. 2003. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 51(6): 493- 8.
- BAILEY, H.H.; WILDING, G; TUTSCH, K.D., ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.FEIERABEND, C.; SIMON, K.; MARNOCHA, R.; HOLSTEIN, S.A.; STEWART, J.; LEWIS, K.A. AND HOHL, R.J. 2004. A phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days. *Cancer Chemother Pharmacol.* 54(4): 368-76.
- BALASSIANO, I.T.; DE PAULO, S.A.; SILVA, N.H.; CABRAL, M.C.; GIBALDI, D.; BOZZA, M.; DA FONSECA, C.O.; CARVALHO, M.G.C. 2002. Effects of perillyl alcohol in glial C6 cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. *International Journal of Molecular Medicine.* 10:785-788.
- BALLAL, N.R.; BHATTACHARYYA, P.K.; RANGACHARI, P.N. 1966. Perillyl alcohol dehydrogenase from a soil pseudomona. *Biochem Biophys Res Commun.* 23(4): 473-8.
- BARDON, S.; PICARD, K.; MARTEL, P. 1998. Monoterpenes inhibit cell growth, cell cycle progression, and cyclin D1 gene expression in human breast cancer cell lines. *Nutr. Cancer.* 32:1-7.
- BARTHELMAN, M.; CHEN, W.; GENSLER, H.L.; HUANG, C.; DONG, Z.; BOWDEN, G.T. 1998. Inhibitory Effects of Perillyl Alcohol on UVB-induced Murine Skin Cancer and AP-1 Transactivation. *Cancer Research.* 58:711-716.
- BASAK, S.; HOFFMANN, A. 2008. Crosstalk via the NF- κ B signaling system. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 19:187–197.
- BELANGER, J.T. 1998. Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev.* 3(6): 448-57.
- BERCHTOLD, C.M.; CHEN, K.; MIYAMOTO, S.; GOULD, M.N. 2005. Perillyl Alcohol Inhibits a Calcium-Dependent Constitutive Nuclear Factor-KB Pathway. *Cancer Res.* 65(18).
- BIAN, X.; MCALLISTER-LUCAS, L.M.; SHAO, F.; SCHUMACHER, K.R., FENG, Z.; PORTER, A.G.; *et al.* 2001. NF κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276(52):48921–48929.
- BOIK, J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. 1st ed. *Oregon Medical Press.* Princeton, Minnesota, U.S.A.

BOON, P.J.M.; VAN DER BOON, D.; MULDER, G.J. 2000. Cytotoxicity and Biotransformation of the Anticancer Drug Perillyl Alcohol in PC12 Cells and in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167:55–62.

BOONE, C.W.; KELLOFF, G.J.; MALONE, W.E. 1990. Identification of Candidate Cancer Chemopreventive Agents and Their Evaluation in Animal Models and Human Clinical Trials: A Review. *Cancer Research*. 50:2-9.

BORENFREUND, E. AND PUERNER, J.A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*. 24(2-3): 119-24.

BROWN, J.M. AND ATTARDI, L.D. 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews – Cancer*. 5:231-37.

CAMPBELL, P.M.; GROEHLER, A.L.; LEE, K.M.; OUELLETTE, M.M.; KHAZAK, V.; DER, C.J. 2007. K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Res*. 67: 2098–2106.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. 2003 Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova*. 26(3):428-438.

CASEY, P.J.; SOLSKI, P.A.; DER, C.J.; BUSS, J.E. 1989. P21 ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:8323-7.

CERDA, S.R.; WILKINSON, J.; THORGEIRSDOTTIR, S.; BROITMAN, S.A. 1999. R-(1)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased *ras* and p34cdc2 expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. *J. Nutr. Biochem*. 10:19 –30.

CLARK, S.S.; PERMAN, S.M.; SAHIN, M.B.; JENKINS, G.; ELEGBEDE, J.A. 2002. Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/ G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia*. 16: 213–222.

CLARK, S.S.; ZHONG, L.; FILIAULT, D.; PERMAN, S.; REN, Z.; GOULD, M.; YANG, X. 2003. Anti-Leukemia Effect of Perillyl Alcohol in Bcr/Abl-Transformed Cells Indirectly Inhibits Signaling through Mek in a Ras- and Raf-Independent Fashion. *Clinical Cancer Research*. 9:4494–4504.

CLARK, S.S. 2006. Perillyl Alcohol Induces c-Myc-Dependent Apoptosis in Bcr/Abl- Transformed Leukemia Cells. *Oncology*. 70:13–18.

CHAUDHARY, S.C.; ALAM, M.S.; SIDDIQUI, M.S.; ATHAR, M.; SHAH, N.P.; TRAN, C.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; SAWYERS, C.L. 2004. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 305:399–401.

CHAUDHARY, S.C.; ALAM, M.S.; SIDDIQUI, M.S.; ATHAR, M. 2009. Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis. *Chemico-Biological Interactions*. 179:145–153.

CHOW, H-H.S.; SALAZAR, D.; HAKIM, I.A. 2002. Pharmacokinetics of Perillic Acid in Humans after a Single Dose Administration of a Citrus Preparation Rich in d-Limonene Content Cancer Epidemiology. *Biomarkers & Prevention*. 11:1472–1476.

CHUNGA, B.H.; LEEA, H.; LEEA, J.S.; YOUNGB., C.Y.F. Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. 2006. *Cancer Letters*. 236:222–228.

CLARK, S.S. 2006. Perillyl Alcohol Induces c-Myc-Dependent Apoptosis in Bcr/Abl-Transformed Leukemia Cells. *Oncology*. 70:13–18.

- COLLINS, F.S.; GREEN, E.D.; GUTTMACHER, A.E.; GUYER, M.S. 2003. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 422(6934):835-47.
- CROWELL, P.L.; CHANG, R.R.; REN, Z.; ELSON, C.E.; GOULD, M.N. 1991. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26 kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chhem*. 266:176-79.
- CROWELL, P.L.; ELSON, C.E.; BAILEY, H.H.; ELEGBEDE, J.A.; HAAG, J.D.; GOULD, M.N. 1994. Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 35: 31-37.
- CROWELL, P.L.; REN, Z.; LIN, S.; VEDEJS, E.; GOULD, M. 1994. Structure activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochem. Pharmacol*. 47: 1404-1415.
- DA FONSECA, C.O. 2004. Effects of *in vivo* and *in vitro* treatment of monoterpene perillyl alcohol on proliferation and gene expression control of high grade gliomas. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 62:117-1118.
- DA FONSECA, C.O.; LANDEIRO, J.A.; CLARK, S.S.; QIRICO-SANTOS, T.; CARVALHO, M.G.C. AND GATTASS, C.R. 2006a. Recent advances in the molecular genetics of malignant gliomas disclose targets for antitumor agent perillyl alcohol. *Surgical Neurology*. 65: S1:2-9.
- DA FONSECA, C.O.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R. AND QUIRICO-SANTOS, T. 2006b. Anaplastic oligodendroglioma responding favorably to intranasal delivery of perillyl alcohol: a case report and literature review. *Surg Neurol*. 66: 611-5.
- DA FONSECA, C.O.; FISCHER, J.S.G.; MASINI, M.M.; FUTURO, D.; CAETANO, R.; GATTASS, C.R.; QUIRICO-SANTOS, T. 2007. Oligodendrogliomas: a genética molecular e o desenvolvimento de estratégia terapêutica adjuvante. *Arq Bras Neurocir*. 26(1): 8-15.
- DA FONSECA, C.O.; LINDEN, R.; FUTURO, D.; GATTASS, C.R.; QUIRICO-SANTOS, T. 2008. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol Arch. *Immunol. Ther. Exp*. 56:267-276.
- DEVY, L.; NOE, A.; BARAMOVA, E.; BAJOU, K.; TRENTESAUX, C.; JARDILLIER, J-C.; FOIDART, J-M.; JEANNESSON, P. 1997. Production and Activation of Matrix Metalloprotease-9 (MMP-9) by HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 238:842-846.
- DHAVALIKAR, R.S.; BHATTACHARYYA, P.K. 1966. Protein Components of a Cytochrome P-450 Linalool 8-Methyl Hydroxylase. *Indian J. Biochem*. 3(144).
- DOLEGA, A. 1998. Cytotoxic mechanism and antineoplastic action of etoposide. *Postepy Hig Med Dosw*. 52 (1) : 67-87.
- ELEGBEDE, J.A.; FLORES, R.; WANG, R.C. 2003. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured *in vitro*. *Life Sciences*. 73:2831-2840.
- FABER, E. 2009. Has the time come for induction and maintenance imatinib therapy in chronic myeloid leukemia? *Leukemia Research* 33:605-606.
- FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A.; GATTASS, C.R. 2005. Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncol Rep*. 13: 943-7.
- FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J.A. 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 160(2):171-7.
- FUENTES, E.G.; EXPÓSITO, F.N.; VILLAVERDE, R.M.; SOTO, M.A. 2009. Tumores del sistema nervioso central. *Medicine*. 10(25):1672-86.

- GAN, H.K.; KAYE, A.H.; LUWOR, R.B. 2009. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*. 16:748–754.
- GARCIA, D.G. 2009. Efeito do Monoterpeno Álcool Perfílico na Atividade da Enzima Na⁺, K⁺ ATPase. Dissertação. Departamento de Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal Fluminense. Niterói-RJ.
- GELB, M.H.; TAMANOIB, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASHCHI, F.; ESSONB, K.; GOULD, M.N. 1995. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Letters*. 91:169-175.
- GOLDMAN, J.M. 2008. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia *Medicine*. 37(4).
- GOPING, G.; WOOD, K.A.; SEI, Y.; POLLARD, H.B. 1999. Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR white: A combined histochemical (LM) and ultrastructural (EM) study. *J Histochem Cytochem* 47:561–568.
- GORDON, M.Y.; DOWDING, C.R.; RILEY, G.P.; GOLDMAN, J.M.; GREAVES, M.F. 1987. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 328:342-344.
- GREENWALD, P. 2007. Clinical Trials in Cancer Prevention: Current Results and Perspectives for the Future. *The Journal of Nutrition*.
- HAAG, J.D.; LINDSTROM, M.J.; GOULD, M.N. 1992. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res*. 52:4021–4026.
- HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S.B.; KURUP, A. 2004. QSAR and ADME. *Bioorg. Med. Chem*. 12:3391–3400.
- HARDCASTLE, I.R.; ROWLANDS, M.G.; BARBER, A.M.; GRIMSHAW, R.M.; MOHAN, M.K.; NUTLEY, B.P.; JARMAN, M. 1999. Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene. *Biochem Pharmacol*. 57(7):801-9.
- HEHLMANN, R.; BERGER, U.; HOCHHAUS, A. 2005. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Ann Hematol*. 84:487-497.
- HOCHHAUS, A. **et al.** 2007. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. **Semin Hematol**. 44:15-24.
- HOLSTEIN, S.A. AND HOHL, R. 2003. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *J Lipid Res*. 44(6): 1209-15.
- HUDES, G.R.; SZARKA, C.E.; ADAMS, A.; RANGANATHAN, S.; MCCAULEY, R.A.; WEINER, L.M. AND GALLO, J.M. 2000. Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clinical Cancer Research*. 6:3071- 3080.
- HYNES, J.; HILL, R.; PAPKOVSKY, D.B. 2006. The use of a Xuorescence-based oxygen uptake assay in the analysis of cytotoxicity. *Toxicology in Vitro*. 20:785–792.
- IIMURA, O.; VRTOVSNIK, F.; TERZI, F.; FRIEDLANDER, G. 1997. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in mouse proximal tubular cells in primary culture. *Kidney Int*. 52:962–972.
- INCA. 2009. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro. **Disponível em: www.inca.gov.br Acessado em: 28 de janeiro de 2010.**
- JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*. 29(2):326-337.
- JÚNIOR, M.R.M. AND PASTORE, G.M. 2007. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Quim. Nova*. 30(2):382-387.
- KARIN, M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 6:441:431.

KATZUNG, B.G. 1998. Farmacologia Básica e Clínica. 6° ed., Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

[Kerr, J.F.](#); [Wyllie, A.H.](#); [Currie, A.R.](#) 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4):239-57.

KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER J-G.; VERDIÈRE-SAHUQUE, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H.S. 1999. Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Regenerating Skeletal Muscle: A Study in Experimentally Injured and mdx Muscles. *Developmental Biology*. 205:158-170.

LLURIA-PREVATT, M.; MORREALE, J.; GREGUS, J.; ALBERTS, D.S.; KAPER, F.; GIACCIA, A.; POWELL, M.B. 2002. Effects of perillyl alcohol on melanoma in the TPras mouse model. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 11:573-579.

LOUTRARI, H.; HATZIAPOSTOLOU, M.; SKOURIDOU, V.; PAPADIMITRIOU, E.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F.N.; PAPAPETROPOULOS, A. 2004. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J Pharm Exper Therap*. 311(2): 568-75.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.

LUCHETTI, F.; MANNELLO, F.; CANONICO, B.; BATTISTELLI, M.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E.; PAPA, S. 2004. Integrin and cytoskeleton behaviour in human neuroblastoma cells during hyperthermia-related apoptosis. *Apoptosis*. 9:635-648.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. 1982. "Purification of nucleic acids" in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1st Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. p. 458.

MARTINS, L.M.; MESNER, P.W.; KOTTKE, T.J.; BASI, G.S.; SINHA, S.; TUNG, J.S.; SVINGEN, P.A.; MADDEN, B.J.; TAKAHASHI, A.; MCCORMICK, D.J.; EARNSHAW, W.C.; KAUFMANN, S.H. 1997. Comparison of caspase activation and subcellular localization in HL-60 and K562 cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Blood*. 90(11):4283-4296.

MATOS, J.M.; SCHMIDT, C.M.; THOMAS, H.J.; CUMMINGS, O.W.; WEIBKE, E.A.; MADURA, J.A.; PATRICK, L.J. AND CROWELL, P.L. 2008. A pilot study of perillyl alcohol in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 147: 194-9.

MATTOS, J.P.; MARENCO, H.A.; CAMPOS, J.M.; FARIA, A.V.; QUEIROZ, L.S.; BORGES, G.; DE OLIVEIRA, E. 2006. Cerebellar Glioblastoma Multiforme in an Adult. *Arq Neuropsiquiatr*. 64(1):132-135.

MCGARVEY, D.J. AND CROTEAU, R. 1995. Terpenoid metabolism. *Planta Cell*. 7(7): 1015-26.

MELO, P.S.; DURÁN, N.; HAUN, M. 2002. Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Hum Exp Toxicol*. 21(5):281-8.

MICHAEL, W.N.; DEININGER, J.; GOLDMAN, M.; MELO, J.V. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96(10):3343-3356.

MIFIS, J.J.; CHARI, R.S.; BOYER, I.J.; GOULD, M.N.; JIRTLE, R.L.; LI, J.W.-H.; VEDERAS, J.C. 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*. 325.

- MILLS, J.J.; CHARI, R.S.; BOYER, I.J.; GOULD, M.N.; JIRTLE, R.L. 1985. Induction of Apoptosis in Liver Tumors by the Monoterpene Perillyl Alcohol. *Cancer Research*. 55:979-983.
- MOSSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 65:55-63.
- NAGATA, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 256:12-18.
- NAGLE, D.G.; ZHOU, Y.; MORA, F.D.; MOHAMMED, K.A.; KIM, Y. 2004. Mechanism Targeted Discovery of Antitumor Marine Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*. 11:1725-1756.
- NAKADA, M.; OKADA, Y.; YAMASHITA, J. 2003. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Frontiers in Bioscience*. 8:261-269.
- NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N.L.; HOELZINGER, D.B.; BERENS, M.E. 2007. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci*. 64: 458-78.
- NAMB, H.; SAENKO, V.; YAMASHITA, S. 2007. Nuclear Factor- κ B in Thyroid Carcinogenesis and Progression: a Novel Therapeutic Target for Advanced Thyroid. *Câncer Arq Bras Endocrinol Metab*. 51(5):843-851.
- NOBILI, S.; LIPPIB, D.; WITORTC, E.; DONNINIC, M.; BAUSI, L.; MINIA, E.; CAPACCIOLIC, S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. 59:365-378.
- O'BRIEN, Z. 2004. Pharmacokinetics, in vitro absorption and metabolism of perillyl alcohol, a chemopreventive and chemotherapeutic agent. Dissertação. The Ohio State University
- OHGAKI, H. AND KLEIHUES, P. 2007. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *The American Journal of Pathology*. 170(5).
- OHGAKI, H.; DESSEN, P.; JOURDE, B.; HORSTMANN, S.; NISHIKAWA, T.; DI PATRE, P-L.; BURKHARD, C.; SCHULER, D.; PROBST-HENSCH, N.M.; MAIORKA, P.C.; BAEZA, N.; PISANI, P.; YONEKAWA, Y.; YASARGIL, M.G.; LUTOLF, U.M.; KLEIHUES, P. 2004. Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Research*. 64:6892-6899.
- PACHECO, J.M.; TRAUlsen, A.; DINGLI, D. 2009. The allometry of chronic myeloid leukemia. *J. Theor. Biol*.
- PATRICK, G.L. (2001) An Introduction to Medicinal Chemistry, 2nd ed., Oxford University Press: Oxford.
- PORTER, A.G. AND JANICKE, R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 6:99-104.
- QIU-FANG CHENG, P.; VASANTHA R.A.O.; ZIGLER, J.S.J.R. 2001. Effect of Perillic Acid, a Putative Isoprenylation Inhibitor, on the Cultured Rat Lens. *Exp. Eye Res*. 73:239-245.
- QUINTÁS-CARDAMA, A. AND CORTES, J.E. 2006. Chronic myeloid leukemia: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 81(7):973-988.
- RAITHATHA, S.A.; MUZIK, H.; MUZIK, H.; REWCASTLE, N.B.; JOHNSTON, R.N.; EDWARDS, D.R. 2000. Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neurooncology*. 2:145-150.
- RAJESH, D.; STENZEL, R.A.; STEVEN, P.H. 2003. Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. *J Biol Chem*. 278(38):35968-78.
- RAO, J.S. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer*. 3:489 - 501.

REDDY, B.S.; WANG, C-X.; SAMAHA, H.; LUBET, R.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J. 1997. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Res.* 57:420-425.

RICHON, A.B. 1994. An Introduction to Molecular Modeling. *Mathematech.* 1(83).

RIES, C.; LOHER, F.; ZANGM, C.; ISMAIR, M.G.; PETRIDES, P.E. 1999. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res.* 5:1115–24.

RIPPLE, G.H.; GOULD, M.N.; ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.; FEIERABEND, C.; SIMON, K.; BINGER, K.; TUTSCH, K.D.; POMPLUN, M.; WAHAMAKI, A.; MARNOCHA, R.; WILDING, G. AND BAILEY, H.H. 2000. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin Cancer Res.* 6:390-6.

ROBBINS; COTRAN. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7 ed., Elsevier – Campus, 2005.

ROEDER, I.; D'INVERNO, M. *et al.* 2009. New experimental and theoretical investigations of hematopoietic stem cells and chronic myeloid leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.*

ROGER, R.; ISSAAD, C.; PALLARDY, M.; LÉGLISE, M-C.; TURHAN, A.G.; BERTOGLIO, J.; BRÉARO, J. 1996. BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. *Blood.* 87(3):1113-1122.

RUST, W.L.; HUFF, J.L.; PLOPPER, G.E. 2000. Screening assay for promigratory/antimigratory compounds. *Anal Biochem.* 280(1):11–19.

SAHIN, M.B.; PERMAN, S.M.; JENKINS, G.; CLARK, S.S. 1999. Perillyl alcohol selectively induces G0/G1 arrest and apoptosis in Bcr/Abl-transformed myeloid cell lines. *Leukemia.* 13:1581– 1591.

SAMAILA, D.; EZEKWUDO, D.E.; YIMAM, K.K.; ELEGBEDE, J.A. 2004. Bioactive plant compounds inhibited the proliferation and induced apoptosis in human cancer cell lines, in vitro. *Tibets.* 1:34–42.

SATHORNSUMETEE, S.; REARDON, D.A.; DESJARDINS, A.J.; QUINN, A.; VREDENBURGH, J.J.; RICH, J.N. 2007. Molecularly Targeted Therapy for Malignant Glioma. *Cancer.* 110(1).

SHISHODIA, S. AND AGGARWAL, B.B. 2004. Nuclear factor-kappa B: a friend or a foe in cancer? *Biochem. Pharmacol.* 68(6):1071–1080.

SCHNEIDER, P.; COSTA, O.; LEGRAND, E.; BIGOT, D.; LECLEIRE, S.; GRASSI, V.; VANNIER, J-P.; VASSE, M. 2009. In vitro secretion of matrix metalloprotease 9 is a prognostic marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research.*

SCHRÖTEROVÁ, L.; KRÁLOVÁ, V.; VORÁCOVÁ, A.; HASKOVÁ, P.; RUDOLF, E.; CERVINKA, M. 2009. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro.* 23(7):1406-11.

SCHULZ, S.; REINHOLD, D.; SCHMIDT, H.; ANSORGE, S.; HOLLT, V. 1997. Perillic Acid Inhibits Ras/MAPkinase-Driven IL-2 Production in Human T Lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 241:720–725.

SILVA, F.C.; SOUZA, M.C.B.V.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; CASTRO, H.C.; SOUZA, S.L.O.; SOUZA, T.M.L.; RODRIGUES, D.Q.; SOUZA, A.M.T.; ABREU, P.A.; PASSAMANI, F.; RODRIGUES, C.R.; FERREIRA, V.F. 2008. Synthesis, HIV-

RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. *Eur. J. Med. Chem.* (in press).

SIMMONS, T.L.; ANDRIANASOLO, E.; MCPHAIL, K.; FLATT, P.; GERWICK, W.H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4(2):333–342.

STAYROOK, K.R.; MCKINZIE, J.H.; BURKE, Y.D.; BURKE, Y.A.; CROWELL, P.L. 1997. Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. *Carcinogenesis*. 18:1655–1658.

STAYROOK, K.R.; MCKINZIE, J.H.; BARBHAIYA, L.H.; CROWELL, P.L. 1998. Effects of the antitumor agent perillyl alcohol on H-Ras vs. K-Ras famesylation and signal transduction in pancreatic cells. *Anticancer Res.* 18:823–8.

STEARNS, V.; COOP, A.; SINGH, B.; GALLAGHER, A.; YAMAUCHI, H.; LIEBERMAN, R.; PENNANEN, M.; TROCK, B.; HAYES, D.F. AND ELLIS, M.J. 2004. A pilot surrogate end point biomarker trial of perillyl alcohol in breast neoplasia. *Clin Cancer Res.* 10:7583–91.

TALPAZ, M.; SHAH, N.P.; KANTARJIAN, H.; DONATO, N.; NICOLL, J.; PAQUETTE, R.; CORTES, J.; O'BRIEN, S.; NICAISE, C.; BLEICKARDT, E. 2006. Dasatinib in im-atinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 354: 2531–2541.

TEKTO, I.V. 2005. Computing chemistry on the web. *Drug Discov. Today*. 10(22):1497–1500.

TERUSZKIN, I.; ALVES, S.; SILVA, H.N.; CURIE, C.M.; BOZZA, M.; FONSECA, C.O.; DA COSTA, C.M.G. 2002. Effects of perillyl alcohol in glial cell line in vitro and anti-metastatic activity in chorioallantoic membrane model. *Int J Mol Med.* 10:785–8.

TONN, J.C.; KERKAU, S.; HANKE, A.; BOUTERFA, H.; MUELLER, J.G.; WAGNER, S.; VINCE, G.H.; ROOSEN, K. 1999. Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *Int. J. Cancer.* 80:764 – 772.

TROULLIER, P.; OLLIARO, P.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. 2002. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. *The Lancet.* 359:2188–2194.

UHL, M. *et al.* 2004. SD-208, a novel transforming growth factor β receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 64:7954–7961.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. 2006. Brain tumour stem cells *Nature Reviews Cancer.* 6: 425–436.

WAGNER, J.E.; HU, J.L.; RUST, W.L.; KINGSLEY, K.; PLOPPER, G.E. 2002. Perillyl Alcohol Inhibits Breast Cell Migration without Affecting Cell Adhesion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2(3):136–140.

WILSON, J.G. 1997. Adhesive Interactions in Hemopoiesis. *Acta Haematol.* 97:6–12.

WISEMAN, D.A.; WERNER, S.R.; Crowell, P.L. 2007. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 320(3):1163–1170.

XU, M.; FLOYD, H.S.; GRETH, S.M.; CHANG, W-C.L.; LOHMAN, K.; STOYANOVA, R.; KUCERA, G.L.; KUTE, T.E.; WILLINGHAM, M.C.; MILLER, M.S. 2004. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation:

potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195:232–246.

YERUVA, L.; PIERRE, K.J.; ELEGBEDE, A.; WANG, R.C.; CARPER, S.W. 2007. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*.

YURI, T.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; KIYOZUKA, Y.; SENZAKI, H.; SHIKATA, N.; KANZAKI, H.; TSUBURA, A. 2004. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Research and Treatment*. 84:251–260.

ZAMAI, L.; BURATTINI, S.; LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; FERRI, P.; MELLONI, E.; GONELLI, A.; GUIDOTTI, L.; PAPA, S.; FALCIERI, E. 2004. In vitro apoptotic cell death during erythroid differentiation. *Apoptosis* 9:235–246.

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](#)