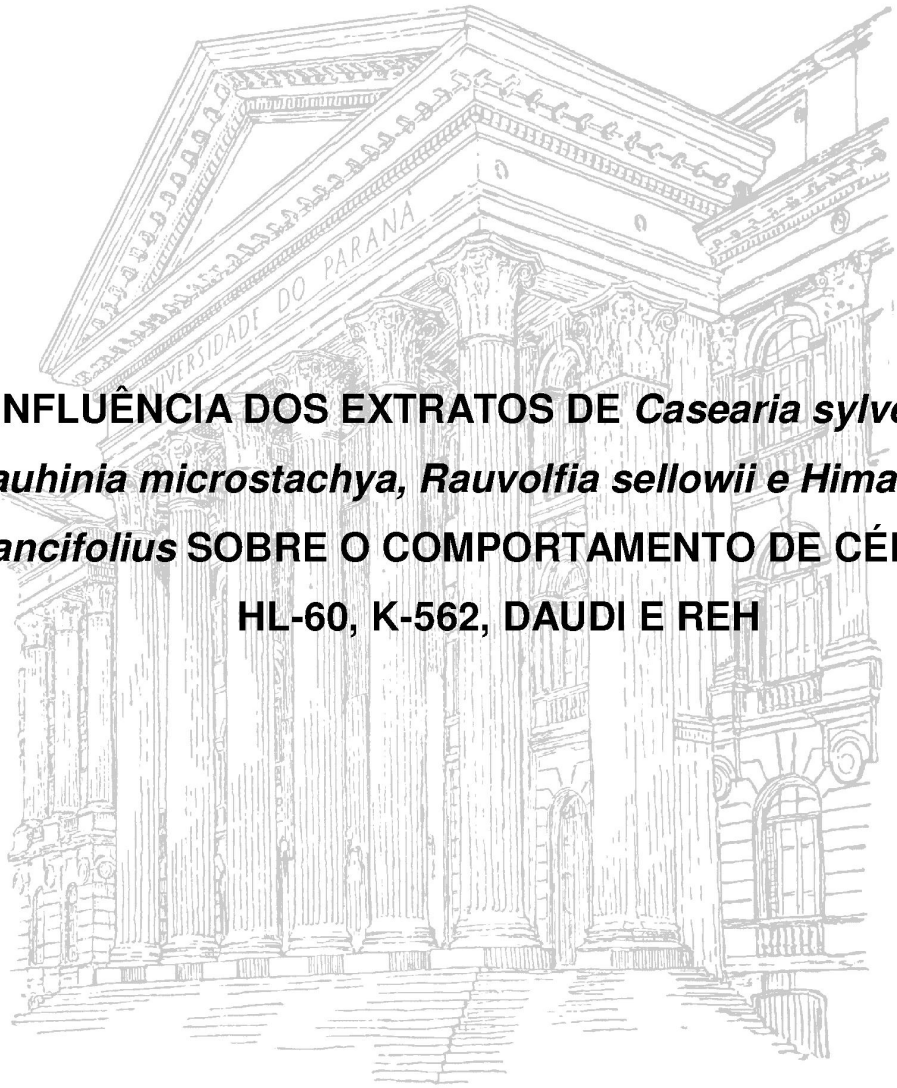
MELISSA PIRES DE LIMA



INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE *Casearia sylvestris, Bauhinia microstachya, Rauvolfia sellowii e Himatanthus lancifolius* SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS HL-60, K-562, DAUDI E REH

CURITIBA
2008

MELISSA PIRES DE LIMA

INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE Casearia sylvestris; Bauhinia microstachya; Rauvolfia sellowii e Himatanthus lancifolius SOBRE O COMPORTAMENTO DE CÉLULAS HL-60, K-562, DAUDI E REH

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof.ª Dr.ª Almeriane Maria Weffort-Santos

CURITIBA
2008

TERMO DE APROVAÇÃO

MELISSA PIRES DE LIMA

Título: "Influência dos extratos de *Casearia sylvestris; Bauhinia microstachya; Rauvolfia sellowii* e *Himatanthus lancifolius* sobre o comportamento das células HL-60, K562 e Daudi"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Análises clínicas.

Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort Santos
Orientadora

Profa. Dra. Primavera Borelli
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Celia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de março de 2008.

NOTA BIOGRÁFICA

A autora é Farmacêutica Bioquímica graduada pela Universidade Federal do Paraná em 2004. Durante a graduação, de agosto de 2002 a julho de 2003, foi aluna de iniciação científica no Laboratório de Bioquímica da mesma instituição de ensino, onde realizou estudos sobre as propriedades químicas e físicas do hidrogel obtido da semente de *Magonia pubescens* St Hil. De abril de 2003 a março de 2004, participou do Programa de Monitoria vinculado à disciplina de Farmacognosia, período em que realizou o projeto sobre a análise farmacopéica de amostras de Camomila (*Matricaria recutita* L.), sob orientação da Prof[a]. Dr[a]. Márcia do Rocio Duarte. Em 2004, iniciou sua carreira como farmacêutica bioquímica no Laboratório Biogen – Biologia Molecular e Histocompatibilidade, realizando testes de histocompatibilidade em amostras de sangue de doadores voluntários de medula óssea. Em 2006, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Análises Clínicas, como bolsista da CAPES, tendo desenvolvido o projeto baseado no estudo do comportamento de células hematopoiéticas *in vitro* após tratamento com extratos de plantas medicinais brasileiras, cujos resultados estão apresentados nesta dissertação de mestrado.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo Dair Júnior, meu pai,

Sandrinha e meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Jesus Cristo*, o Autor da minha vida, por ter me guardado, me abençoado e cumprido, em mim, os Seus propósitos.

Ao meu pai *Nilton*, por ter sido meu super pai, amigo, conselheiro, exemplo de vida e de caráter. Por ter abraçado a nossa família e feito dela a prioridade em sua vida. Pai... Os anos se passaram e você continua sendo meu herói!

Aos meus irmãos *Rodrigo e Renata*, à minha cunhada *Juliana* e ao mais novo integrante da família, meu sobrinho *Cauã*, que trouxe mais alegria a nossas vidas.

A *Sandra Mara*, nossa querida Sandrinha, por ter se tornado parte da família, pelos incentivos constantes em meus objetivos e por todo o amor que tem dispensado a nós.

Ao amor da minha vida, *Dair Júnior*, pelo incentivo diário, apoio, carinho, amor e dedicação. Durante todos esses anos, você esteve ao meu lado, e hoje a minha vitória também é sua!

À minha orientadora, *Profª Drª. Almeriane Maria Weffort-Santos*, por ter compartilhado comigo, com toda dedicação, seus conhecimentos e por despertar em mim o amor pela pesquisa. Agradeço sua amizade, mostrando-se sempre um exemplo de pesquisadora, cheia de motivação e perseverança.

Aos amigos do laboratório de Hematologia, *Fabiana, Fernanda, Luciana, Monique, Christian e Alexandre*, pela ajuda valiosa durante este período de trabalho e pela amizade, que permanece. Também agradeço aos amigos do Laboratório de Citologia Clínica, *Michele*, *Jacqueline*, *Fagner* e *Ana Carolina Tomczak,* pela parceria e boas conversas que tivemos.

Ao *Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos,* pelos extratos das plantas medicinais e pelo auxílio dedicado desde a época da graduação.

A *Irene* e a *Geni*, pela valiosa dedicação, ajuda e amizade em todos os dias dessa caminhada. Que Deus continue abençoando suas vidas!

Ao *Profº Dr. Aguinaldo José do Nascimento,* pela paciência e auxílio primoroso nas análises estatísticas deste trabalho.

Ao Hospital Erasto Gaertner e à Farmacêutica *Jeanine Marie Nardin*, pelo fornecimento das amostras de medula óssea utilizadas neste projeto.

À equipe da Seção de Virologia do Hospital de Clínicas, UFPR, pela presteza e facilidades no congelamento das linhagens celulares. Ao mestrando Fernando de Souza Fonseca Guimarães, pela ajuda com o citômetro de fluxo.

Ao *Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo*, da UFPR e do CEGEMPAC, pela doação da linhagem celular REH.

Aos amigos da turma de mestrado, por terem dividido comigo as alegrias e aflições do período de mestrado, pelo convívio, pelas conversas e amizade.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que verdadeiramente torceram por mim, me incentivaram e hoje comemoram comigo esta conquista.

EPÍGRAFE

"Confia no Senhor de todo o seu coração e não se apóie no seu próprio entendimento. Reconhece-O em todos os seus caminhos, e Ele endireitará as suas veredas."

Provérbios 3:5-6

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA..... iii

DEDICATÓRIA..... iv

AGRADECIMENTOS..... v

EPÍGRAFE..... vi

LISTA DE FIGURAS..... x

LISTA DE TABELAS..... xii

RESUMO..... xiii

ABSTRACT..... xiv

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS DE INTERESSE..... 2

1.1.1 Guaçatonga 2

1.1.2 Escada-de-macaco..... 3

1.1.3. Pau-pra-tudo..... 4

1.1.4. Agoniada..... 4

1.2. PLANTAS MEDICINAIS E CÂNCER..... 5

1.3. O SISTEMA HEMATOPOIÉTICO E AS NEOPLASIAS..... 8

1.3.1. Hematopoiese e a cultura de células de medula óssea..... 10

1.3.2. Hematopoiese e toxicidade..... 11

1.3.3. Ensaios para avaliação do perfil anti-neoplásico de plantas medicinais e seus compostos..... 12

1.4. LINHAGENS LEUCÊMICAS E SUA UTILIDADE NA INVESTIGAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE SOBRE A HEMATOPOIESE..... 13

1.4.1. Linhagens celulares humanas..... 14

1.4.1.1. Daudi..... 15

1.4.1.2. REH..... 15

1.4.1.3. HL-60..... 16

1.4.1.4. K-562..... 16

1.5 LINHAGENS CELULARES LEUCÊMICAS E PLANTAS MEDICINAIS..... 17

1.6. INDUÇÃO DE APOPTOSE POR EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS..... 18

1.7. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO..... 20

2. OBJETIVOS..... 22

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL..... 22

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 22

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 23

3.1. SOLUÇÕES..... 23

3.2. MATERIAL BOTÂNICO..... 26

3.2.1. Preparo dos extratos..... 26

3.3. AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA..... 27

3.3.1. Processamento das amostras de medula óssea e isolamento de células mononucleares..... 28

3.4. VIABILIDADE CELULAR..... 28

3.5. PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS..... 28

3.6. COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWALD-GIEMSA (MGG)..... 29

3.7. COLORAÇÃO NEGRO DE SUDÃO B..... 29

3.8. COLORAÇÃO COM BENZIDINA..... 29

3.9. ENSAIOS CLONOGÊNICOS DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA EM MEIO SEMI-SÓLIDO..... 29

3.9.1. Identificação, contagem e caracterização de colônias hematopoiéticas..... 30

3.10. LINHAGENS CELULARES HUMANAS..... 30

3.11. ENSAIOS COM LINHAGENS CELULARES HUMANAS..... 30

3.11.1 Ensaios de proliferação celular..... 30

3.11.2. Potencial clonogênico 31

3.11.3. Ensaios de diferenciação/maturação celular..... 31

3.12. AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO..... 32

3.13. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA POR CITOMETRIA DE FLUXO. 32

3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS..... 33

3.15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 33

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34

4.1. LINHAGENS LEUCÊMICAS DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA..... 35

4.1.1. Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre a proliferação de linhagens leucêmicas... 35

4.1.2. Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre o potencial clonogênico de linhagens leucêmicas..... 45

4.1.3. Ensaios de diferenciação/maturação celular..... 54

4.1.4. Avaliação de apoptose por citometria de fluxo..... 58

4.2. PROGENITORES DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS 64

4.2.1. Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre progenitores Eritróides e de CFU-GM..... 66

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 75

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 77

ANEXOS..... 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da hematopoiese 9

Figura 2. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii*, *Himatanthus lancifolius, Casearia sylvestris* e *Bauhinia microstachya* sobre a proliferação e a viabilidade de células HL-60 36

Figura 3. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii*, *Himatanthus lancifolius, Casearia sylvestris* e *Bauhinia microstachya* sobre a proliferação e a viabilidade de células K-562 37

Figura 4. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii*, *Himatanthus lancifolius, Casearia sylvestris* e *Bauhinia microstachya* sobre a proliferação e a viabilidade de células Daudi..... 38

Figura 5. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii*, *Himatanthus lancifolius, Casearia sylvestris* e *Bauhinia microstachya* sobre a proliferação e a viabilidade de células REH..... 39

Figura 6. Efeito do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre o potencial clonogênico de células HL-60..... 47

Figura 7. Efeito do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre o potencial clonogênico de células K-562..... 47

Figura 8. Efeito do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o potencial clonogênico de células K-562..... 48

Figura 9. Efeito do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre o potencial clonogênico de células Daudi..... 49

Figura 10. Efeito do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre o potencial clonogênico de células Daudi..... 50

Figura 11. Efeito do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o potencial clonogênico de células Daudi..... 50

Figura 12. Efeito do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre o potencial clonogênico de células Daudi..... 51

Figura 13. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a morfologia de células HL-60..... 53

Figura 14. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a morfologia de células K-562..... 54

Figura 15. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* na morfologia de células K-562..... 55

Figura 16. Ação do dimetilsulfóxido sobre células HL-60..... 57

Figura 17. Ação da hemina sobre células K-562..... 57

Figura18. Ação da teofilina sobre células Daudi..... 57

Figura 19. Influência do extrato de *Rauwolfia sellowii* sobre a morfologia de células HL-60..... 58

Figura 20. Extrato de *Rauvolfia sellowii* e células HL-60: apoptose ou necrose?..... 60

Figura 21. Extrato de *C. sylvestris* e *H. lancifolius* e células K-562: apoptose?..... 61

Figura 22. Extrato de *C. sylvestris* e *H. lancifolius* e células K-562: necrose?..... 62

Figura 23. Colônias de progenitores eritróides..... 67

Figura 24. Colônias de progenitores de granulócitos e macrófagos..... 68

Figura 25. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a formação de colônias eritróides..... 69

Figura 26. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a formação de colônias de CFU-GM..... 69

Figura 27. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre a formação de colônias eritróides..... 70

Figura 28. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre a formação de colônias de CFU-GM..... 70

Figura 29. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a formação de colônias eritróides..... 71

Figura 30. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a formação de colônias de CFU-GM..... 72

Figura 31. Influência do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre a formação de colônias eritróides..... 72

Figura 32. Influência do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre a formação de colônias de CFU-GM..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de drogas citotóxicas desenvolvidas a partir de plantas de uso popular 6

Tabela 2 – Influência dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada e guaçatonga sobre a morfologia de células leucêmicas, avaliada por citometria de fluxo..... 52

Tabela 3 – Dados clínico-laboratoriais dos pacientes doadores das amostras de medula óssea..... 65

RESUMO

Este trabalho propôs-se a avaliar a influência dos extratos de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson, *Casearia sylvestris Sw.*, *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg e *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, conhecidas popularmente como pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco, respectivamente, sobre o comportamento das linhagens celulares leucêmicas humanas HL-60, K-562, Daudi e REH, e de progenitores hematopoiéticos de portadores de doenças neoplásicas hematológicas em sistemas de cultura *in vitro.* Os ensaios realizados com linhagens leucêmicas, independente de sua origem linfóide ou mielóide, demonstraram claramente que os extratos hidroetanólicos preparados dessas plantas exercem efeitos citostáticos significativos em doses de até 100 μg/ml e que esta atividade foi particular para cada extrato e dependente da linhagem celular estudada. O extrato de pau-pra-tudo foi citostático para células HL-60 (100 μg/ml) e Daudi (0,1-100 μg/ml), assim como para os seus progenitores. O de agoniada foi citostático somente para as linhagens K-562 (1-10 μg/ml) e Daudi (0,1-10 μg/ml). A guaçatonga inibiu a proliferação de células K-562 (0,1-1 μg/ml), Daudi (1 μg/ml) e seus progenitores, assim como a de células REH (10-100 μg/ml), e o de escada-de-macaco mostrou-se eficiente na inibição somente das linhagens linfóides (1 μg/ml). Não se observou influência desses extratos sobre a diferenciação celular dessas linhagens, mas sim manutenção de seu estado maturacional inicial. Embora mais estudos sejam necessários, o conjunto de resultados apresentados revelou alguns aspectos interessantes e ainda não relatados com relação às atividades biológicas dessas plantas brasileiras, sugerindo investigações futuras para assegurar seu uso com fins terapêuticos.

Palavras-chaves:

Rauvolfia sellowii; Himatanthus lancifolius; Casearia sylvestris; Bauhinia microstachya; linhagens leucêmicas humanas; plantas medicinais; citotoxicidade; proliferação celular; ensaios clonogênicos.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the influence of the extracts prepared from Himatanthus lancifolius *(Müll. Arg) Woodson,* Casearia sylvestris *Sw.,* Rauvolfia sellowii *Müll. Arg and* Bauhinia microstachya *(Raddi) Macbride, popularly known as pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga and escada-de-macaco, respectively, on the behaviour of HL-60, K-562, Daudi and REH human leukaemic cell lines as well as on the bone marrow progenitors of patients suffering from haematological neoplastic diseases using culture systems* in vitro*. The human leukaemic cell line assays, apart from their origin, have clearly shown that all hydroethanolic plant extracts, although each one in its own way, have significant cytostatic effects till the dose of 100 μg/ml. The pau-pra-tudo extract was cytostatic for HL-60 (100 μg/ml) and Daudi (0.1-100 μg/ml) cells and their progenitors. The agoniada one was cytostatic for K-562 (1-10 μg/ml) and Daudi cells (0.1-10 μg/ml). The guaçatonga extract inhibited the proliferation of K-562 (0.1-1 μg/ml) and Daudi cells (1 μg/ml) and their progenitors, as well as REH cells (10-100 μg/ml), whereas the escada-de-macaco one had similar effects only upon the lymphoid cells lines at 1 μg/ml. No activity related to differentiation induction could be observed for any of the extracts included in this study, in contrast with a persistent maintenance of their undifferentiated state. The extracts have also shown a slight tendency in suppressing the growth of colonies from bone marrow progenitors, particularly of the erythroid lineage, of patients diagnosed with acute lymphoid and myeloid leukaemias. The data herein presented have revealed some biological activities of these Brazilian plants never reported before, suggesting that further studies are needed in order to promote their therapeutic usage.*

Keywords:

Rauvolfia sellowii; Himatanthus lancifolius; Casearia sylvestris; Bauhinia microstachya; *human leukaemic cell lines; medicinal plants; cytotoxicity; cell proliferation; clonogenic assay.*

1. *INTRODUÇÃO*

A natureza tem sido a provedora do homem desde o início dos tempos e dela a humanidade tem se servido para suprir as necessidades básicas de alimentação, vestimenta, abrigo e transporte. Da mesma forma, o uso de produtos naturais como medicamento é comum em todo o mundo.

Embora algumas propriedades terapêuticas atribuídas às plantas tenham sido interpretadas de forma errônea, a terapia através do uso de plantas medicinais baseou-se, por muito tempo, em descobertas empíricas de centenas e milhares de anos. As primeiras, escritas em blocos de argila, são vindas da Mesopotâmia e datam de aproximadamente 2600 aC.; entre as substâncias que foram usadas, pode-se citar os óleos do cipreste-comum (*Cupressus sempervirens,* Cupressaceae), o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra,* Fabaceae) e a papoula (*Papaver somniferum,* Papaveraceae), os quais ainda estão em uso nos dias de hoje para o tratamento de doenças, abrangendo desde tosses e resfriados a parasitoses e inflamações (Gurib-Fakim, 2006).

O interesse na natureza como fonte de agentes quimioterapêuticos continua. Produtos naturais e seus derivados representam mais que 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo (Gurib-Fakim, 2006), pois a população procura formas medicinais alternativas na tentativa de evitar os efeitos colaterais e os elevados custos dos medicamentos sintéticos. Dessa forma, as plantas medicinais têm papel importante no tratamento de uma variedade de doenças (El-Shemy *et al.*, 2007).

Suplementos de origem natural são, geralmente, utilizados com duas finalidades: no alívio de sintomas presentes em estados patológicos e/ou na prevenção de doenças. Exemplos de produtos medicinais como paliativos incluem o uso de *Hypericum perforatum,* para o alívio de sintomas relacionados à depressão aguda e ansiedade (Kumar e Singh, 2007; Nangia *et al.*, 2000), o *Ginkgo biloba,* no tratamento e prevenção da demência e mal de Alzheimer e melhora da cognição (Oken *et al.*, 1998), e da *Echinacea* sp., para aliviar sintomas do frio (Grimm e Muller, 1999; Schulten *et al.*, 2001). Exemplos de produtos de origem vegetal utilizados com o intuito de prevenir doenças ou atenuar os efeitos do risco para determinadas doenças incluem o consumo de chá verde (Brown, 1999; Kazi *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004) e outros alimentos ricos em flavonóides (Jang *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004), como

fontes de antioxidantes naturais, e o uso do alho *(Allium sativum*), devido ao seu elevado teor de compostos organossulfurados, que tem mostrado experimentalmente, prevenir câncer em animais (Wargovich, 1987; Wargovich *et al*., 1988) e inibir a proliferação de células cancerosas humanas *in vitro* (Arunkumar *et al*., 2006; Hirsch *et al*., 2000; Jakubikova e Sedlak, 2006; Kwon *et al*., 2002).

No Brasil, a biodiversidade e riqueza de sua flora estimulam a procura de novas drogas para o tratamento de diversas doenças que acometem o ser humano e estudos têm revelado uma diversidade de plantas com potencial medicinal, particularmente da Floresta Atlântica Tropical (Di Stasi *et al*., 2002).

1.1 Plantas medicinais brasileiras de interesse

1.1.1 Guaçatonga

Cientificamente conhecida como *Casearia sylvestris* Sw., é uma das plantas pertencentes à flora brasileira popularmente conhecida também como café-de-frade, apiá-acanoçu, bugre-branco, café-bravo, cambroé, erva-lagarto, erva-pontada, língua-de-teju, língua-de-tiú, para-tudo, varre-forno, fruta-de-saíra, café-do-diabo. Pertence à família Flacourtiaceae e está distribuída por todo o Brasil, desde o Amapá até o Rio Grande do Sul.

Os índios brasileiros, através da maceração de suas cascas, tratam diarréias; suas raízes ou sementes esmagadas são usadas em feridas e lesões de pele causadas pela lepra. Ainda, fazem uso da planta como antídoto para veneno de cobra através da ingestão e do uso tópico de decocto feito a partir das suas folhas. Na medicina popular, é usada como panacéia, indicada como antiinflamatória, anti-viral, no tratamento do reumatismo, sífilis, herpes, úlceras de pele, edemas, febres, diarréias, além de anestésica e hemostática para lesões de pele e mucosas, duas ações farmacológicas já comprovadas cientificamente (Borges *et al*., 2000; Borges *et al*., 2001).

Estudos de possível atividade anti-câncer da guaçatonga datam da década de oitenta, no Japão, quando se observou que o extrato etanólico preparado de suas folhas apresentava intensa atividade anti-tumoral contra sarcomas de camundongos (Itokawa *et al*., 1988). Em 1991, compostos isolados da planta, denominados casearinas, demonstraram não só atividade anti-tumoral, mas também citotóxica contra várias linhagens de células humanas cancerosas (Morita

et al., 1991). No início do século, o grupo de Oberlies identificou novas casearinas nas folhas e caules da guaçatonga com citoxicidade contra um painel de linhagens celulares tumorais e, também, contra vários fungos patogênicos (Oberlies *et al.*, 2002). Desde então, o estudo de compostos químicos do gênero *Casearia* vem se avolumando, com o intuito de buscar agentes quimioterapêuticos efetivos (Beutler *et al.*, 2000).

Baseando-se em seu longo uso na medicina caseira no tratamento de úlceras, as propriedades antiulcerogênicas da planta (Basile *et al.*, 1990; Sertié *et al.*, 2000) e do óleo essencial preparado de suas folhas, além da sua atividade antiinflamatória (Esteves *et al.*, 2005), foram recentemente descritas. Foi demonstrado que o extrato aquoso desta espécie contém compostos que neutralizam proteases presentes no veneno de cobras do gênero *Bothrops* (Borges *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2001) e que seu extrato etanólico apresenta elevada atividade antioxidante (Menezes *et al.*, 2004).

1.1.2 Escada-de-macaco

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal estão as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais podem ser encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta. No Brasil, as plantas deste gênero são popularmente conhecidas como pata-de vaca, unha ou casco-de-boi. Dentre as espécies do gênero, pode-se citar a *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, na medicina popular conhecida como escada-de-macaco. Esta planta faz parte de uma coleção de quinze espécies, juntamente com o pau-pra-tudo, que foi selecionada pelo seu grande uso na medicina caseira como hipoglicemiante, analgésica e diurética, durante o trabalho etnofarmacobotânico realizado com a população residente na área da Usina Hidroelétrica de Salto Caxias, sudoeste paranaense, antes da inundação da região (Silva *et al.*, 2004).

Efeitos analgésicos foram demonstrados em camundongos para o extrato metanólico das folhas, sugerindo-se que compostos fenólicos poderiam estar associados a essa ação (Meyre-Silva *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram que o extrato hidroetanólico das folhas desta planta possui, além de intensa atividade antioxidante (Menezes *et al.*, 2004), ação estimulante sobre a

proliferação de linfócitos humanos (Machado Junior *et al.*, 2006), sugerindo potencial imunomodulador.

1.1.3 Pau-pra-tudo

As cascas de *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. (Apocynaceae), popularmente conhecida como pau-pra-tudo, são utilizadas como hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicas e anti-hipertensivas (Batista *et al.*, 1996) na medicina caseira. Porém, somente ação hipotensora e anti-hipertensiva (Pereira, 1956), e mais recentemente, atividade antioxidante intensa (Menezes *et al.*, 2004) com modesto efeito antiinflamatório (Presibella *et al.*, 2003) foram descritas.

1.1.4 Agoniada

Outra planta característica da flora brasileira é a *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, também da família Apocynaceae, que cresce nas regiões de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e Amazônia. Suas cascas têm sido utilizadas na medicina caseira como uma verdadeira panacéia, indo seu uso desde o tratamento de uma variedade de doenças da pele, asma, sífilis, febre, até como estimulante de contrações uterinas, auxiliando na concepção e regularizando as menstruações (Corrêa, 1984). Recentemente, sua fração alcaloídica demonstrou atividade antimicrobiana de amplo espectro contra microorganismos Gram positivos e negativos (Souza *et al.*, 2004), além de propriedades gastroprotetoras (Baggio *et al.*, 2005). Neste contexto, Rattman e colaboradores descreveram a capacidade de alguns alcalóides indólicos presentes nessa fração em alterar a responsividade dos músculos liso vascular e não vascular, através de eventos que parecem envolver o bloqueio da entrada de íons cálcio ou por mudanças na mobilização ou utilização do cálcio intracelular (Rattmann *et al.*, 2005).

Recentemente, relatou-se toxicidade elevada para linfócitos humanos para o extrato hidroetanólico preparado de suas cascas (Machado Junior *et al.*, 2006). Interessante neste contexto é o relato de que a uleína, alcalóide indólico extraído e purificado deste extrato, demonstrou potencial imunomodulatório, refletido na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos humanos induzida por mitógeno (Machado Junior, 2006), provavelmente por atuar nos mecanismos de ativação celular. Ainda, demonstrou interferir significativamente na adesão de leucócitos

humanos à fibronectina e à vitronectina purificadas de plasma humano por diminuir a expressão das integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ expressos nessas células (Nardin, 2006), demonstrando habilidades antiinflamatórias.

1.2 PLANTAS MEDICINAIS E CÂNCER

O câncer continua representando uma das maiores causas de mortalidade em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares, infecções e doenças parasitárias, responsáveis por, respectivamente, 30 e 19% das mortes. No ano de 2000, 10 milhões de novos casos de câncer foram registrados mundialmente. O crescimento da população, associado ao envelhecimento, às mudanças de hábitos e fatores ambientais que vêm se verificando no planeta, implicam em uma incidência progressiva de novos casos de câncer. Estudos indicam que, mesmo que os dados atuais permaneçam inalterados, cerca de 15 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes são esperados para o ano de 2020 (Parkin, 2001).

Devido ao flagelo que se verifica não só para o portador de neoplasia, mas também à família e à sociedade, é intensa a procura por novos agentes terapêuticos anti-tumorais derivados da natureza e, de fato, observa-se uma convergência nas aplicações clínicas de metabólitos secundários de plantas e seus derivados direcionados ao combate do câncer (Butler, 2004; Phillipson, 2001).

Entretanto, a quimioprevenção do câncer, definida como uma *estratégia do controle do câncer pela administração de compostos sintéticos ou naturais para previnir, reverter ou suprimir o processo de carcinogênese*, sempre foi um campo de grande interesse na investigação científica, uma vez que a carcinogênese é considerada como um processo formado por vários estágios, no qual uma célula normal é transformada em uma célula cancerosa (Sporn *et al.*, 1976), podendo, assim, sofrer intervenção em uma ou mais de suas etapas, inibindo sua progressão.

A formação de radicais livres tem sido associada ao desenvolvimento de neoplasias. Radicais livres são formados durante o metabolismo celular regular e, por serem substâncias eletronicamente instáveis e potencialmente reativas, são capazes de causar oxidação e danos irreversíveis à célula, comprometendo sua função. Muitos estudos têm sido realizados envolvendo o efeito protetor de uma

dieta rica em frutas e vegetais sobre o seu desenvolvimento, uma vez que esses alimentos constituem fonte importante de vitaminas, minerais, fibras, flavonóides, carotenóides, dentre outros fitoquímicos, todos com ação antioxidante.

De fato, revisão de vários estudos que examinaram a relação entre a ingestão desses alimentos e a incidência de vários tipos de câncer revelou que indivíduos com dieta pobre desses produtos têm o dobro de chances de desencadear um processo canceroso quando comparados àqueles que fazem uso de uma alimentação rica, mesmo controlando os fatores de risco principais (Block *et al.*, 1992). De modo geral, este tipo de dieta parece prevenir vários tipos de câncer (Park e Pezzuto, 2002; Steinmetz e Potter, 1996). Neste contexto, insere-se o valor de se estudar o potencial biológico das plantas medicinais, não só como agentes quimioprotetores por serem ricas em substâncias com poder antioxidante, como também como citotóxicas e/ou citostáticas.

Compostos isolados ou derivados de plantas medicinais, como os exemplos listados na Tabela 1, há muito têm contribuído para com o tratamento de diferentes tipos de neoplasias. Um dos exemplos mais bem conhecidos refere-se aos alcalóides vincristina e vimblastina, isolados da *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), utilizados na prática médica como agentes anti-neoplásicos.

TABELA 1. EXEMPLOS DE DROGAS CITOTÓXICAS DESENVOLVIDAS A PARTIR DE PLANTAS DE USO POPULAR.

DROGA	MECANISMO DE AÇÃO	FONTE NATURAL
Vimblastina Vincristina	inibição da polimerização da tubulina	*Catharantus roseus*
Etoposídio	inibição da topoisomerase	*Podophyllum peltatum* *Podophyllum emodi*
Paclitaxel	atuação da estabilidade da tubulina	*Taxus brevifolia*
Irinotecan Topotecan 9-aminocamptotecina 9-nitrocamptotecina	inibição das topoisomerase I	*Camptotheca acuminata*

Adaptado de Mans *et al.*, 2000.

Amplamente conhecidas são as contribuições do alcalóide vincristina, em associação com outros fármacos, no tratamento do Linfoma de Hodgkin e leucemia linfocítica aguda (Devita *et al.*, 1970; Johnson *et al.*, 1963) ou da

eficiente combinação do etoposídio epipodofilotoxina (extraído de *Podophyllum peltatum*) com bleomicina e cisplatina nos regimes curativos de câncer de próstata (Williams *et al.*, 1987). Outro composto, o flavopiridol, uma flavona cuja síntese foi inspirada no alcalóide rohitukina isolado das folhas e caules de *Amoora rohituka* (Harmos *et al.*, 1979), está entre os compostos cuja expectativa acerca de suas propriedades interferentes na progressão do ciclo generativo celular (Sedlacek *et al.*, 1996) são encorajadoras. Na última década, vários países aprovaram o uso do paclitaxel, originalmente isolado da *Taxus brevifolia*, no tratamento de câncer de ovário, de mama e do câncer pulmonar de células pequenas (McGuire *et al.*, 1996a; McGuire *et al.*, 1996b; Rustin *et al.*, 1996). Importante se faz mencionar os estudos com o alcalóide isolado de *Cephalotaxus harringtonia*, o qual demonstrou eficácia no tratamento de vários tipos de leucemias (Kantarjian *et al.*, 1996).

Evidências recentes de efeitos de extratos de plantas medicinais tradicionais de várias culturas sobre neoplasias do sistema hematopoiético, enfocando particularmente sua ação apoptótica sobre várias linhagens leucêmicas, vêm se acumulando rapidamente (Abaza *et al.*, 2007; Amirghofran *et al.*, 2006a; Jokhadze *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 2007; Shanafelt *et al.*, 2006; Suffredini *et al.*, 2007; Turan *et al.*, 2006).

Resultados obtidos em experimentos com o chá verde (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, da família Theaceae) demonstraram atividade inibitória da carcinogênese e sua eficácia quando administrado durante as suas fases de iniciação, promoção ou progressão (Landis-Piwowar *et al.,* 2007; Mantena *et al.,* 2005; Umemura *et al.,* 2003). Os polifenóis foram os compostos relacionados a esta ação, incluindo seu efeito antioxidante (Coimbra *et al.,* 2006), protetor do DNA contra possíveis danos (Morley *et al.,* 2005) e indutor da apoptose em tumores ou células transformadas (Chen *et al.,* 2003).

Compostos presentes em uvas vermelhas, como o resveratrol, também demonstraram atividade relacionada à quimoprevenção do câncer (Gao *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 1997), assim como indução da apoptose em células leucêmicas humanas (Zunino e Storms, 2006). Como já citado, as substâncias ativas em todas essas misturas de origem natural parecem ser os polifenóis, aos quais, juntamente ao seu efeito antiinflamatório, propriedades anti-carcinogênicas e anti-mutagênicas também têm sido atribuídas.

Esses são apenas alguns exemplos pelos quais suplementos dietéticos, plantas medicinais e comestíveis são considerados potencialmente importantes na quimioprevenção do câncer, ao longo de sua história dentro do consumo humano (Park e Pezzuto, 2002; Reddy *et al.*, 2003). Como conseqüência, vários compostos derivados de plantas estão em testes clínicos, incluindo as isoflavonas da soja, o resveratrol e várias formas do ácido retinóico (Kelloff *et al.*, 2000).

1.3 O SISTEMA HEMATOPOIÉTICO E AS NEOPLASIAS

Hematopoiese é o processo fisiológico complexo pelo qual ocorre a produção de todos os elementos celulares sangüíneos que trafegam na microcirculação e que, alguns, posteriormente, podem migrar para os tecidos. Esse mecanismo é melhor descrito como um sistema dinâmico, constituído de células em diferentes estágios de proliferação, diferenciação e maturação, resultando em um apropriado número de tipos celulares maduros produzidos para atender às funções biológicas que garantam a sobrevida do animal (Lee *et al.*, 1999).

Esta dinâmica pode ser representada esquematicamente com a compartimentalização do sistema, como ilustrado na Figura 1. Todas as células sangüíneas funcionais presentes no sangue periférico (eritrócitos, plaquetas e leucócitos, em seus cinco diferentes subtipos) são derivadas de células primitivas pluripotentes denominadas células tronco (*stem cells*), originadas durante o desenvolvimento embrionário, e residentes, após o nascimento, principalmente, na medula óssea.

Tais células são capazes de proliferar, produzindo mais células tronco, em um processo denominado *auto-renovação* ou *auto-replicação*, além de dar origem a células mais diferenciadas, denominadas células progenitoras multipotentes, comprometidas (ou comissionadas) com uma de suas duas linhagens hematopoiéticas, linfóide ou mielóide. Estas irão, independentemente, produzir células de linhagem mais restrita ou mesmo única, as quais, por sua vez, vão perdendo gradativamente a capacidade de proliferar e, governadas por complexos mecanismos de diferenciação e amadurecimento, muitos dos quais ainda não elucidados, passam a apresentar todas as características das células sangüíneas circulantes e que podem ser reconhecidas e quantificadas em um exame de medula óssea ou sangue periférico.

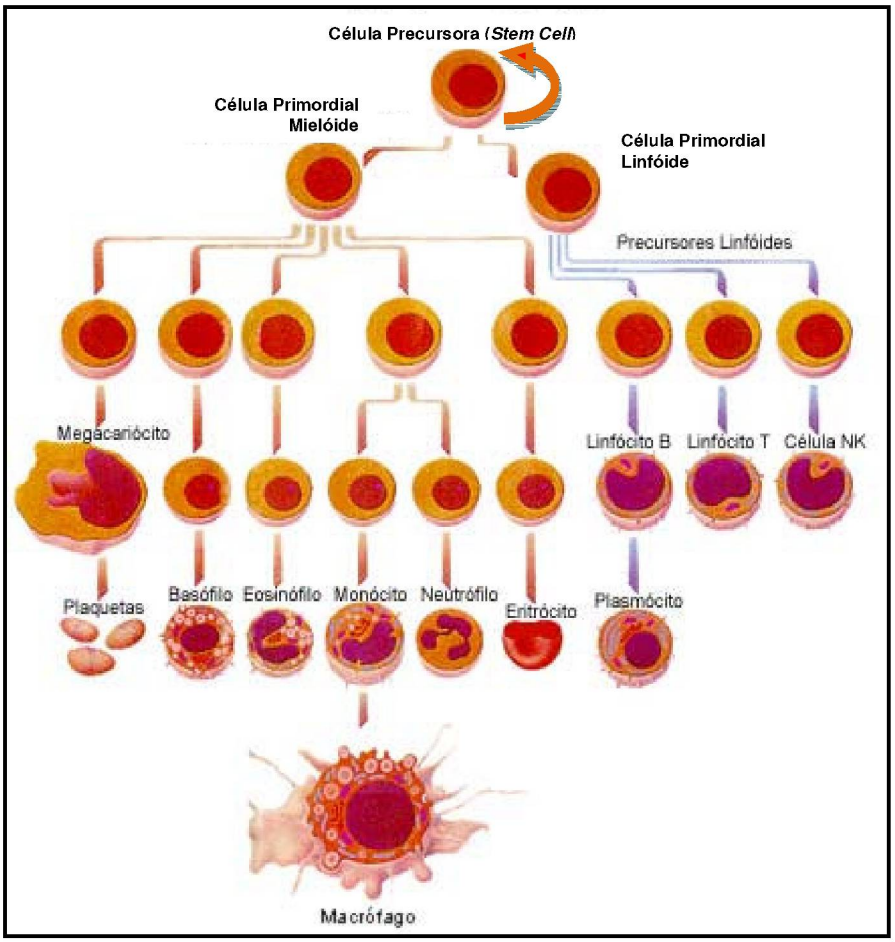


Figura 1. Representação esquemática da hematopoiese. Células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea podem se auto-regenerar ou dar origem às células progenitoras que geram precursores das linhagens linfóide e mielóide. Adaptado de: http://www.saude.pr.gov.br

O *turnover* dessas células provém de uma organização altamente especializada, governada por citocinas e células componentes do estroma medular, as quais asseguram que essa capacidade de renovação seja ininterrupta e que exista suficiente adaptabilidade na manutenção da produção celular.

Além disso, uma produção aumentada de um ou mais tipos celulares necessários durante regimes de estresse, tais como sangramentos, hipóxia ou infecções, pode ser facilmente atendida (Lee *et al.*, 1999). Neste contexto, a apoptose é um componente crítico da hematopoiese, pois ajuda a manter, homeostaticamente, o número das distintas populações celulares dentro de limites estreitos (Lowe e Lin, 2000).

As leucemias, assim como as mielodisplasias, síndromes mieloproliferativas e doenças relacionadas, são distúrbios neoplásicos do tecido hematopoiético. As leucemias são diferentes dos outros tipos de câncer do ponto de vista de sua evolução, uma vez que, para sua disseminação, são desnecessários os mecanismos de angiogênese, ruptura estrutural e de formação de metástase, comuns aos demais. Apesar dessas diferenças, elas se constituem em um exemplo de ruptura do desenvolvimento normal celular, pois se originam de uma somatória de mutações que afetam as células tronco hematopoiéticas, elementos centrais do sistema formador de sangue, comprometendo sua função e a dos seus descendentes (Franks e Teich, 1998).

Segundo as *Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para 2006,* disponível no sítio eletrônico do INCA, 5.330 homens e 4.220 mulheres seriam vítimas de leucemias. As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células, o qual permite dividir essas patologias em agudas ou crônicas. Enquanto as agudas caracterizam-se pela proliferação clonal acompanhada de um bloqueio variável na maturação celular, induzindo a um acúmulo de células imaturas (blastos) na medula óssea, as leucemias crônicas são definidas por hiperplasia de elementos celulares capazes de amadurecer, com comprometimento de suas funções biológicas normais. De acordo com o tipo celular envolvido, as leucemias são divididas em mielóides, quando a linhagem mielóide é afetada, podendo ocorrer em vários estágios da diferenciação celular, e linfóides, quando envolvem os elementos linfóides do sangue. Dessa forma, os quatro principais tipos são as leucemias mielóides agudas (LMA), as crônicas (LMC), as linfóides agudas (LLA) e, finalmente, as crônicas (LLC) (Lee *et al.*, 1999).

1.3.1 Hematopoiese e a cultura de células de medula óssea

Devido ao acesso facilitado ao tecido hematopoiético e a disponibilidade de modelos experimentais nos quais se podem cultivar *in vitro* suas células, muitos dos conhecimentos das bases celulares e moleculares que governam a hematopoiese e suas neoplasias, como as leucemias, por exemplo, têm sido desvendados. Ainda, o tecido hematopoiético tem sido utilizado como modelo para a elucidação dos mecanismos que envolvem a gênese de outros tipos de neoplasias (Parent-Massin, 2001), destacando-se os métodos que avaliam o

potencial quimioterapêutico de produtos naturais e aqueles que investigam a segurança para o seu uso popular.

Desde os trabalhos simultâneos e independentes de Bradley & Metcalf (1966) e Pluznik & Sachs (1965), o estudo dos mecanismos que controlam a proliferação, a diferenciação e a maturação de células tronco hematopoiéticas *in vitro*, bem como muitas das causas que provocam distúrbios desse sistema, resultando em doenças neoplásicas, têm se baseado nos ensaios clonogênicos .

Nesses ensaios, distintas populações de células progenitoras oriundas de órgãos hematopoiéticos, quando apropriadamente estimuladas pela presença de citocinas, desenvolvem colônias típicas das diferentes linhagens, denominadas genericamente células (ou unidades) formadoras de colônias, ou CFC/CFU, particularmente do ramo mielóide (Testa, 1985).

Como há provas formais de que essas colônias são clones puros, ou seja, derivadas de uma única célula (Testa, 1985), esses ensaios permitem estudos qualitativos e quantitativos dos diferentes progenitores hematopoiéticos envolvidos, desde aqueles com multipotencialidade, capazes de formar colônias com milhares de células de diferentes linhagens contendo granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e macrófagos (CFU-GEMM ou CFU-MIX) (Fauser e Messner, 1978; Fauser e Messner, 1979), até progenitores com limitada capacidade proliferativa, que culminam com a formação de colônias contendo um número mais reduzido de células, todas pertencentes a um ou, no máximo, dois tipos celulares. Dessa forma, usando-se esse sistema e adicionando-se fatores de crescimento de diferenciação celular específicos, é possível identificar-se os progenitores bipotentes CFU-GM (Células Formadoras de Colônias de Granulócitos e Macrófagos), além dos unipotentes eritróides BFU-E (*Burst Forming Unit – Erythroid*) e CFU-E (*Cell Forming Unit – Erythroid*), os formadores de colônias de granulócitos neutrófilos (CFU-G), de monócitos (CFU-M), de eosinófilos (CFU-Eo) e de basófilos (CFU-Bas) (Testa e Molineux, 1993).

1.3.2 Hematopoiese e toxicidade

Há uma incessante procura por novos medicamentos que possam de forma seletiva, combater as patologias que afetam o sistema hematopoiético, particularmente aqueles relacionados às neoplasias. Entretanto, o tecido hematopoiético é alvo constante de numerosos xenobióticos. Hematotoxicidade

pode ser devida ao aumento ou a diminuição periférica de células sanguíneas de uma ou mais linhagens, com o risco de um evento clínico adverso. A hematoxicologia *in vitro* tem, sob condições controladas, o objetivo de predizer os efeitos de substâncias em estudo, que podem limitar sua utilização clínica (Parchment, 1998).

A mielotoxicidade é um dos fatores limitantes para o uso das doses requeridas de medicamentos no tratamento de tumores, pois substâncias como os anti-neoplásicos destróem rapidamente os progenitores da medula óssea em divisão (Malerba *et al.*, 2002; Neelis *et al.*, 1997). Durante o desenvolvimento de uma nova droga ou agente terapêutico, um aspecto importante é, portanto, predizer se o agente em questão será tóxico para a medula óssea e se a toxicidade é específica para uma ou mais de suas linhagens celulares.

1.3.3 Ensaios para avaliação do perfil anti-neoplásico de plantas medicinais e seus compostos

Toxicidade é um evento complexo que pode causar diretamente um dano celular ou promover efeitos fisiológicos ou mesmo sistêmicos. Em contraste com esses últimos, que são difíceis de serem monitorados, os ensaios de toxicidade em nível celular podem ser mensurados por meio de metodologias especiais que examinam as células individualmente.

A demonstração de que tumores, particularmente os relacionados ao sistema hematopoiético, podem dar origem a linhagens celulares que podem ser mantidas em condições artificiais por longos períodos, tem favorecido o desenvolvimento de vários modelos, podendo-se determinar o potencial citotóxico de substâncias para serem utilizadas como medicamentos ou cosméticos, ou para demonstrar que agentes anti-neoplásicos são eficientes em suas ações. Neste contexto, a definição de citotoxicidade pode variar, dependendo da natureza do ensaio e se as células, de fato, morrem ou simplesmente têm seu metabolismo alterado.

A proliferação celular pode ser medida por intermédio da contagem do número de células após um período estabelecido de incubação com o agente em estudo e por meio de ensaios clonogênicos, que avaliam sua capacidade regenerativa. Estes têm sido empregados na hematologia experimental desde a década de 60, após os trabalhos independentes de Bradley e Metcalf (1966) e Pluznik e Sachs (1965) já citados, onde foi possível estabelecer os fundamentos

da hematopoiese, assim como avaliar a hematopoiese em situações adversas. São úteis para predizer a ação de drogas sobre a hematopoiese (Masubuchi, 2006) e sobre efeitos adversos (Parent-Massin, 2001). Na hematologia clínica, estes métodos são empregados para confirmar diagnóstico, associar a "pega" de transplantes de medula óssea ou, ainda, para predizer o tempo de recuperação medular em casos de falência deste órgão.

A utilização dos ensaios clonogênicos de forma investigativa em estudos pré-clinicos é mais recente (Pessina *et al.*, 2005). Entretanto, o *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), em conjunto com laboratórios internacionais, reconheceram e validaram essa metodologia como uma importante ferramenta na investigação preditiva de neutropenia clínica durante a fase pré-clínica investigativa de novas substâncias (Negro *et al.*, 2001), onde os resultados permitem observar (1) a dose - ou nível plasmático - da droga que é hematotóxica, (2) a dose que produz citopenia, (3) a dose em que mais provavelmente ocorrerá o restabelecimento celular, (4) a dose tolerada e (5) o potencial de novas substâncias produzirem sinais clínicos de neutropenia. Estas indicações justificariam esquemas de maior escalonamento de doses sem comprometer a saúde dos pacientes (Parchment, 1998).

O tipo de hematotoxicidade mais freqüentemente estudado *in vitro* relaciona-se aos efeitos agudos de drogas ou uma mistura de substâncias sobre os progenitores da medula óssea da série granulocítica/macrofágica (CFU-GM), porém se estendem aos da série eritróide e linfóide. A quantificação da mielotoxicidade pode ser obtida a partir do número de células e de colônias formadas por células progenitoras sobreviventes após exposição a substância em estudo em comparação a uma população não exposta (controle) em ensaios clonogênicos. Uma vez observada a presença de efeito, direcionamento apropriado para investigações mais específicas sobre o mecanismo de ação envolvido poderá ser realizado por meio de ensaios apropriados realizados subseqüentemente.

1.4 LINHAGENS LEUCÊMICAS E SUA UTILIDADE NA INVESTIGAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE SOBRE A HEMATOPOIESE

Neoplasias em geral são classificadas como idênticas com base em suas características histopatológicas. A atual classificação das neoplasias

hematológicas em particular, de acordo com a OMS, se baseia em critérios internacionais, que combinam características citogenéticas, citomorfológicas e a imunofenotipagem, agrupando-as de acordo com a linhagem hematopoiética envolvida (Vardiman *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 1999). Entretanto, como elas mantêm características que variam de paciente para paciente com relação à sensibilidade às drogas usadas nos protocolos terapêuticos, torna-se difícil predizer a resposta clínica que cada paciente irá demonstrar.

A existência de uma coleção crescente de linhagens celulares derivadas de tumores, as quais podem ser conveniente e continuamente mantidas *in vitro*, tem favorecido vários tipos de estudos, incluindo a elucidação de mecanismos de ação de substâncias ativas (Purves *et al.*, 1995). Em particular, o uso de linhagens celulares leucêmicas tem facilitado investigações mais objetivas quanto aos efeitos de agentes com potencial anti-neoplásico (Baguley *et al.*, 2002; Masters *et al.*, 2000). Há, ainda, a vantagem de se poder avaliar o comportamento de inúmeras substâncias complexas ou puras simultaneamente, uma vez que essas linhagens podem ser amplamente expandidas.

Um número de fatores referentes a essas substâncias, tais como solubilidade, estabilidade química e metabólica, biodisponibilidade, dentre outros, também pode ser avaliado nesses sistemas, os quais, em contrapartida com os ensaios *in vivo*, utilizam quantidades diminutas das substâncias em estudo. Outro aspecto importante é a possibilidade de se observar efeitos em algumas linhagens em detrimento de outras, implicando aspectos de seletividade por um tipo particular de neoplasia.

1.4.1 Linhagens celulares humanas

Denomina-se cultivo celular o processo de se manter *in vitro* a sobrevida de uma população de células semelhantes, provenientes de uma única fonte (tecido ou órgão) por algumas horas, dias ou meses em um meio de cultura sintético definido, em condições adequadas de temperatura, osmolaridade e pH.

Quando determinadas células podem ser mantidas indefinidamente nessas condições, sem alteração das características basais, só lhes renovando periodicamente o meio de cultura, obtêm-se linhagens celulares. Células com esta capacidade são, geralmente, provenientes de tumores malignos ou resultam de manipulação genética, onde genes que controlam seu crescimento são alterados

in vitro, permitindo-lhes sobreviver indefinidamente em condições artificiais, mas adequadas.

Como citado anteriormente, as linhagens celulares têm sido instrumento importante não apenas no entendimento de várias doenças, mas também como modelos *in vitro* úteis no estudo do desenvolvimento celular. Dentre elas, encontram-se várias linhagens celulares humanas leucêmicas.

1.4.1.1 Daudi

A linhagem Daudi é derivada de um paciente do sexo masculino, negro, de 16 anos de idade, acometido pelo Linfoma de Burkitt (Klein *et al.*, 1967). Esta linhagem é extensivamente utilizada em estudos que tentam elucidar os mecanismos de origem das leucemias, sendo bem caracterizada como uma linhagem linfoblástica do tipo B. Suas células dão reação positiva para o antígeno nuclear do vírus Epstein Barr (EBNA), assim como também para o antígeno do capsídeo viral do mesmo vírus (VCA) e imunoglobulinas de superfície, sendo negativa para β-2-microglobulina (Huber *et al.*, 1976; Klein *et al.*, 1968).

1.4.1.2 REH

A linhagem celular REH foi estabelecida a partir do sangue periférico de um paciente do sexo feminino, com 15 anos de idade, portador de leucemia linfóide aguda (LLA), com 100% e >95% de blastos em sua medula óssea e sangue periférico, respectivamente (Rosenfeld *et al.*, 1977). Células REH não contêm níveis detectáveis do vírus Epstein Barr (EBNA). As características clínicas e hematológicas, incluindo morfologia e histoquímica dos blastos leucêmicos corresponderam a LLA (Rosenfeld *et al.*, 1977).

Células REH estabelecidas *in vitro* mostraram claramente pertencer ao mesmo clone citogeneticamente anormal de células leucêmicas de pacientes não submetidos ao cultivo celular. Estas células também demonstraram negatividade na formação de rosetas com eritrócitos de carneiro e para imunoglobulinas de superfície, sendo consideradas como um tipo primitivo de LLA, do tipo não-T, não-B. O perfil fenotípico deste tipo celular é idêntico à forma comum de LLA e os marcadores característicos são o soro anti-LLA, soro anti-p28,33 e as enzimas hexosaminidase e deoxinucleotidil transferase terminal (Rosenfeld *et al.*, 1977).

1.4.1.3 HL-60

Isoladas do sangue periférico de um paciente de 36 anos, também do sexo feminino, acometido por uma leucemia promielocítica aguda, em cultura, células HL-60 são caracterizadas como mieloblastos ou promielócitos, embora 5-10% destas células podem se diferenciar espontaneamente em granulócitos mais maduros, incluindo mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes e segmentados (Gallagher *et al.*, 1979). Como descrito por Collins e colaboradores, a proporção de promielócitos que entram em estágio de diferenciação pode ser fortemente aumentada pela adição de compostos indutores da diferenciação, como o dimetilsulfóxido (DMSO), às células HL-60 cultivadas (Collins *et al.*, 1978).

Estas células coram-se fortemente com corantes específicos para células mielóides, incluindo mieloperoxidase, esterase cloroacetato ASD e Negro de Sudão B. Entretanto, não foi notada reação com fosfatase alcalina, um corante de positividade característica em granulócitos neutrofílicos normais.

Outra característica importante é que células HL-60 perdem marcadores específicos para células linfóides, mas expressam receptores de superfície para o fragmento Fc da imunoglobulina e o complemento (C3), os quais têm sido associados com granulócitos diferenciados. Também exibem atividade fagocítica e responsividade a estímulos quimiotáticos, atividade esta relacionada à porcentagem de granulócitos diferenciados em cultura (Gallagher *et al.*, 1979).

Como característica de células transformadas, células HL-60 formam colônias em meio semi-sólido (metilcelulose e ágar) e produzem tumores mielóides subcutâneos (cloromas) em camundongos geneticamente modificados (Gallagher *et al.*, 1979).

1.4.1.4 K-562

Células K-562 foram inicialmente isoladas de um paciente de 53 anos, sexo feminino, diagnosticado como leucemia mielóide crônica em sua fase blástica (Lozzio e Lozzio, 1975). O cariótipo de todas as células examinadas mostrou a presença do cromossomo Philadélfia, demonstrando que esta linhagem tem sua origem, de fato, a partir da leucemia mielóide crônica. Além disso, não apresentam imunoglobulinas em sua superfície, são negativas para os vírus Epstein Barr e herpes. As células K-562 são indiferenciadas, apresentam negatividade para reações com as enzimas fosfatase alcalina e peroxidase e

perdem a capacidade de ingestão de partículas inertes, uma propriedade conferida às células diferenciadas como granulócitos e macrófagos (Lozzio e Lozzio, 1975).

Através de estudos da superfície da membrana destas células, detectou-se a presença da glicoforina, uma proteína exclusivamente encontrada em eritrócitos presentes na medula óssea humana podendo-se, desta forma, caracterizar a linhagem celular K-562 como uma linhagem que pode diferenciar-se sob determinadas condições, em células da linhagem eritróide (Andersson *et al.*, 1979).

Quando cultivadas *in vitro* na presença de compostos como hemina ou butirato de sódio, estas células desencadeiam maturação eritróide (Andersson *et al.*, 1979). Este processo não envolve apenas a síntese de hemoglobina, mas também mudanças enzimáticas e de membrana, as quais são típicas da diferenciação eritróide embriônica-fetal humana normal (Hoffman *et al.*, 1979). Desta forma, células K-562 formam um sistema útil no estudo da dinâmica da eritropoiese humana e também na análise da expressão de genes específicos durante a diferenciação eritróide.

1.5 LINHAGENS CELULARES LEUCÊMICAS E PLANTAS MEDICINAIS

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a influência de extratos diferentes plantas medicinais sobre linhagens de células leucêmicas, na tentativa preliminar de se identificar agentes anti-tumorais eficientes derivados da natureza. Um exemplo é o extrato de *Emblica officinalis,* testado nas linhagens K-562 e Jurkat, onde demonstrou ser ativo na inibição da proliferação celular, sendo o pirogalol o composto mais comum presente nas frações estudadas, o qual foi, juntamente com outros testes, apontado como o principal ativo anti-tumoral nesta planta (Khan *et al.*, 2002).

O extrato etanólico de *Goldfussia psilostachys*, planta que cresce no sudoeste da China, exibiu atividade anti-proliferativa sobre células K-562 por estabilizar, semelhante às ações do paclitaxel anteriormente citadas, a dinâmica normal dos microtúbulos durante a mitose (Gao *et al.*, 2004).

Recentemente, extratos preparados de *Oplopanax horridus* (Tai *et al.*, 2006) e de *Pinus densiflora* (Kwak *et al.*, 2006) exibiram efeitos inibidores da proliferação de células HL-60 e K-562. Os extratos preparados das sete principais

variedades de oliva (*Olea europaea* L.) que predominam na Tunísia, assim como o de *Scutellaria baicalensis*, utilizada na medicina popular chinesa, demonstraram efeito anti-proliferativo sobre as linhagens HL-60 (Abaza *et al.*, 2007) e Daudi (Kumagai *et al.*, 2007).

O extrato aquoso das raízes de *Morus alba* L., utilizada na medicina chinesa popular, exibiu citotoxicidade sobre células K-562 e outras linhagens celulares cancerosas através da indução da apoptose pela inibição da montagem dos microtúbulos celulares (Nam *et al.*, 2002).

Extratos metanólicos de *Jatropha elliptica*, *Physalis angulata* e *Tephrosia cinerea,* três plantas medicinais brasileiras características do Ceará, expressaram sua propriedades citotóxicas sobre células HL-60 (Faria *et al.*, 2006). Outras duas plantas brasileiras, *Allamanda blanchetti* e *A. schottii,* Apocynaceae, por meio dos seus extratos etanólicos, exibiram efeitos citotóxico e citostático sobre células K-562 (F. Navarro *et al.*, 2006).

Uncaria tomentosa, popularmente conhecida como unha-de-gato e encontrada na Floresta Amazônica, na forma de extratos aquoso e de acetato de etila, demonstrou exercer potente inibição da proliferação de células HL-60 por indução da apoptose (Cheng *et al.*, 2007), confirmada em ensaios clonogênicos (Sheng *et al.*, 1998). Da mesma forma, os extratos etanólico, clorofórmico e hexânico de *Varthemia iphionoides,* planta utizada popularmente no Jordão, demonstraram citotoxicidade dependente da dose sobre essas células, sendo que este potencial terapêutico foi atribuído à presença de flavonóides (Al-Dabbas *et al.*, 2006).

1.6 INDUÇÃO DE APOPTOSE POR EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS

A apoptose, ou morte celular programada, é um tipo de "autodestruição celular" que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. O termo é derivado do grego, que se referia à queda das folhas das árvores no outono - um exemplo de morte programada fisiológica e apropriada que também implica em renovação. Ocorre no desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na atrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormônios,

na involução de alguns órgãos e, ainda, na regressão de tumores (Franks e Teich, 1998). Portanto, consiste em um tipo de morte desejável e necessária, que participa na formação dos órgãos e que persiste em alguns sistemas adultos, como a pele e o sistema imunológico.

Alguns dos ensaios mais clássicos utilizados atualmente para avaliar a apoptose em células hematopoiéticas incluem a detecção das mudanças morfológicas celulares por microscopia de luz, microscopia eletrônica ou através da citometria de fluxo, dentre outros métodos, usando corantes nucleares como Giemsa ou corantes fluorescentes (Dive *et al.*, 1992; Koopman *et al.*, 1994). Por exemplo, para o ácido ursólico, que está presente em uma grande variedade de alimentos, ervas medicinais e plantas, foi relatado diminuir a viabilidade de células Daudi e induzir mudanças morfológicas celulares características de apoptose (Lauthier *et al.*, 2000).

Muitas plantas exercem efeito anti-proliferativo, reduzindo a viabilidade e inibindo o crescimento e a proliferação de linhagens celulares leucêmicas através da indução do processo de apoptose. Neste sentido, algumas plantas e seus derivados já demonstraram exercer esse efeito sobre linhagens celulares leucêmicas. Por exemplo, o *Linum persicum* e a *Euphorbia cheiradenia* têm atividade citotóxica e induzem apoptose em células K-562, Jurkat, A-549 e Fen (Amirghofran *et al.*, 2006b).

Extratos de *Albizzia julibrissin,* utilizada na medicina tradicional oriental para o tratamento de insônia, diurese, astenia e confusão, induzem apoptose de forma mais efetiva sobre células Jurkat do que sobre monucleares normais isolados de sangue periférico (Won *et al.*, 2006). Estudos mais recentes demonstraram que extratos etanólicos da *Lactuca indica* L. exercem efeito apoptótico específico sobre células HL-60, não afetando a sobrevivência de linfócitos normais isolados do sangue periférico (Chen *et al.*, 2007).

A fração acetato de etila do extrato da erva medicinal chinesa *Sarcandra glabra* mostrou maior sensibilidade sobre a proliferação de células HL-60, com detenção do ciclo celular e com a regulação das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bcl-2 (Li *et al.*, 2007). De forma semelhante, o extrato dos rizomas de *Rhodiola rosea*, amplamente utilizada na medicina popular da Rússia e da China, inibiu a divisão celular destas células, onde se observou acúmulo de células na fase de prófase do ciclo celular e posterior indução de apoptose e necrose (Majewska *et*

al., 2006). Este mesmo efeito foi observado para o extrato de *Selaginella tamariscina*, com ativação da via das caspases (Ahn *et al*., 2006).

Outra planta estudada, de onde é proveniente o chá verde, *Camellia sinensis*, através do extrato metanólico de suas raízes expressaram efeito citotóxico e apoptogênico sobre células K-562, não exibindo o mesmo efeito sobre leucócitos normais (Ghosh *et al*., 2006).

1.7 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A variabilidade de climas e regiões geográficas no Brasil favorece o desenvolvimento de uma flora variadíssima, sendo que um grande número de plantas é usado na medicina popular com finalidade terapêutica específica. Dentre elas, somente cerca de 5% têm estudos farmacológicos descritos (Buss e Waigh, 1995). Somente há pouco tempo diversos sistemas de cultura de células sangüíneas vêm sendo utilizados para a investigação do potencial biológico de produtos naturais. Ou seja, a grande maioria das plantas constituintes de nossa flora não possui nenhum tipo de estudo que investigue seu potencial farmacológico sobre a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas primitivas ou linhagens celulares definidas.

Neste sentido, alguns estudos têm revelado um futuro promissor. Por exemplo, ação estimulatória na mielopoiese de camundongos hematopoieticamente debilitados por serem portadores de listeriose foi observada pelo aumento de progenitores de CFU-GM após tratamento com extratos etanólicos de *Pluchea quitoc* (Queiroz *et al*., 2000) e *Petiveria alliacea* (Quadros *et al*., 1999), indicando uma provável habilidade desses extratos em aumentar as reservas de precursores de neutrófilos e macrófagos. Naturin 2, uma bebida que contém uma mistura de ervas chinesas, demonstrou atividade estimulatória sobre progenitores $CD34^+$ de cordão umbilical, por estimular a liberação de citocinas como Interleucina 3 (IL3), IL1, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) no meio de cultivo (Lu e Jia, 2000).

Esses exemplos ilustram claramente que plantas usadas como medicamentos alternativos para o tratamento de doenças possuem, de fato, atividades biológicas variadas no sistema formador de sangue. No Brasil, há cerca de cem mil espécies vegetais catalogadas, mas somente cerca de 8 %

foram estudadas quanto à composição química, e estima-se que pouco mais de mil espécies tenham sido avaliadas quanto às propriedades terapêuticas (Calixto, 2000). Dessa forma, grande parte de fitoderivados, em especial aqueles provenientes de plantas nativas, não foi analisado cientificamente quanto aos seus efeitos sobre distúrbios neoplásicos do sistema hematopoiético, implicando claramente a necessidade de se investigar o potencial terapêutico da flora brasileira para seu tratamento, prevenção ou até mesmo cura.

2 *OBJETIVOS*

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a influência dos extratos de *Rauvolfia selowii* Müll. Arg., *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson, *Casearia sylvestris Sw.*, e *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride sobre o comportamento de linhagens celulares leucêmicas humanas HL-60, K-562, Daudi e REH e de progenitores hematopoiéticos normais e de portadores de doenças neoplásicas hematológicas *in vitro.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial biológico de doses crescentes dos extratos dessas plantas sobre:

- a proliferação das linhagens HL-60, K-562, Daudi e REH, em paralelo ao seu efeito tóxico
- o potencial clonogênico das linhagens HL-60, K-562 e Daudi
- a diferenciação das linhagens HL-60, K-562 e Daudi
- a proliferação, diferenciação e maturação de progenitores hematopoiéticos normais e de portadores de doenças hematológicas *in vitro* por meio de ensaios clonogênicos
- investigar os possíveis mecanismos dos efeitos observados.

3 *MATERIAL E MÉTODOS*

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho foram de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água obtida pelo sistema Puritech / Permution. Os ensaios com células humanas foram realizados em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar vertical TROX, modelo FLVQ TAM 12. As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121 ºC, 30 minutos, 1 atm) ou (2) por filtração (filtros de acetato de celulose ou poliétersulfona, com poros de 0,22 μm de diâmetro) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente – T.A., 4 - 8º C, –10º C ou a –30º C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

3.1 SOLUÇÕES

• Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se $NaH_2PO_4.2H_20$ (150 mmol/l), Na_2HPO_4 (150 mmol/l) e NaCl (154 mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8º C.

• Solução de azul de tripan a 0,4 % (p/v)

Azul de tripan em pó foi diluído em PBS, resultando em uma solução a 0,4 %.

• Meio RPMI 1640 *(Roswell Park Memorial Institute)*

Meio de cultivo RPMI 1640 (Himedia, Japão) foi dissolvido em água, conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com 200 mM de bicarbonato de sódio, 0,3 g de penicilina G e 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina. O pH 7,2 foi ajustado com solução de NaOH 1N. O meio foi esterilizado por filtração e armazenado a –10 ºC. Quando em uso, foi armazenado a 4 – 8 ºC por, no máximo 14 dias. Para a manutenção dos cultivos, RPMI 1640 foi suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal estéril (Gibco, São Paulo).

• Meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)

Meio de cultivo IMDM (Gibco, São Paulo) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com 200 mM

de bicarbonato de sódio, 0,3 g de penicilina G e 100 mg/ml sulfato de estreptomicina. A osmolaridade foi ajustada para 300 mOsm em osmômetro VAPRO (*Vapor Pressure Osmometer*) 5520, Wescor, esterilizado por filtração e armazenado a -10 ºC. Quando em uso, foi armazenado a 4 – 8 ºC por, no máximo 14 dias.

- Meio comercial apropriado para o cultivo de progenitores hematopoiéticos ou ensaios clonogênicos (*StemCell Technologies*, Vancouver, CA)

Meio semi-sólido, composto por metilcelulose em IMDM, citocinas humanas recombinantes (rh-SCF, rh-GM-CSF, rh-IL-3 e rh-eritropoietina), soro bovino fetal, 2-mercaptoetanol e L-glutamina foi armazenado a –30 ºC e descongelado apenas no momento do uso.

- Solução estoque a 1 % dos extratos das plantas medicinais (p/v)

Um grama dos extratos liofilizados das plantas *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson (agoniada), *Casearia sylvestris Sw.* (guaçatonga), *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg (pau-para-tudo) e *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (escada-de-macaco), gentilmente cedidos pelo laboratório de Farmacognosia, foram diluídos em 100 ml de meio de cultivo (IMDM ou RPMI 1640) e homogeneizados em agitador magnético para dissolução. As soluções estoques foram esterilizadas por meio de filtração, aliquotadas em microtubos estéreis e armazenadas a –30 ºC até o momento do uso.

- Solução fixadora de formaldeído 40% para coloração com Negro de Sudão B (v/v)

Formaldeído foi dissolvido em *q. s.* de água destilada para uma solução a 40%.

- Corante Negro de Sudão B 0,3% (p/v)

Corante Negro de Sudão B em pó foi dissolvido em *q. s.* de etanol absoluto para obter uma solução a 0,3%.

• Tampão de fenol (p/v)

Dezesseis gramas de fenol cristalino foram dissolvidos em 30 ml de etanol absoluto. Solução de $Na_2HPO_4.12\ H_2O_2$ (3 g/l) foi adicionada em água destilada em *q. s.* para 100 ml.

• Solução de trabalho do corante Negro de Sudão B

Quarenta mililitros de tampão de fenol foram adicionados a 60 ml de solução de Negro de Sudão B 0,3%.

• Solução de benzidina a 0,4 % (p/v)

Benzidina em pó (Fluka – CH 9470) foi dissolvida em *q. s.* para 100 ml etanol 70 % para obter uma solução a 0,4 %.

• Solução de nitroprussiato de sódio a 1 %

Nitroprussiato de sódio em pó foi dissolvido em água, formando uma solução a 1 % (p/v).

• Solução de cloreto de hemina 3 mM

Cloreto de hemina foi dissolvido em KOH 0,2 M e diluído em RPMI 1640, de forma a obter uma solução estoque a 20 mM. Esta foi esterilizada por filtração e armazenada aliquotada a –30 ºC.

• Solução de teofilina 0,07 M

Teofilina cristalina foi dissolvida em RPMI 1640 para fornecer uma solução estoque a 0,07 M. Para auxiliar na dissolução, a solução foi aquecida a 37 ºC e sonicada por 5 min em um instrumento MaxiClean, modelo 1400A, Unique. Em seguida, foi filtrada, aliquotada e armazenada a –30 ºC. A concentração final usada nos experimentos foi de 7 mM.

• Ágar 3,3 % (p/v)

Três gramas de ágar Noble (Difco) foram dissolvidos em 100 ml de água fervente, formando uma solução a 3,3 %. Após esterilizar por autoclavação (121 ºC, 20 minutos, 1 atm), a solução foi mantida a T.A. e em condições de esterilidade.

• Meio para ensaio clonogênico da linhagem Daudi

Meio RPMI 1640 foi suplementado com 10 % (v/v) de Meio para Cariótipo (Cultilab, Campinas, SP) e 30 % (v/v) de soro bovino fetal, e mantido congelado a -30ºC até o momento do uso.

• Tampão de ligação 1X (ensaios de apoptose por citometria de fluxo)

O tampão de ligação, composto por Hepes 0,01 M (pH 7,4), NaCl 0,14 M e $CaCl_2$ 0,25 mM em água, conforme instruções do fabricante (BD Pharmingen Biosciences), foi utilizado nos ensaios para avaliação da apoptose e necrose. A solução foi mantida em geladeira doméstica até o momento do uso.

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

As plantas utilizadas neste estudo foram coletadas, dessecadas e taxonomicamente identificadas como a seguir:

Parte usada	**Nome científico**	**Nome popular**	**Família**	**Identificação**
cascas	*Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson	agoniada	Apocynaceae	HLF-9
folhas	*Casearia sylvestris Sw.*	guaçatonga	Flacourtiaceae	31.362
cascas	*Rauvolfia sellowii* Müll.Arg	pau-para-tudo	Apocynaceae	42.384
folhas	*Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride	escada-de-macaco	Fabaceae	42.388

3.2.1 Preparo dos extratos

Todos os extratos das plantas utilizadas foram preparados e gentilmente cedidos para este trabalho pelo laboratório de Farmacognosia, Universidade Federal do Paraná. Solventes e reagentes de grau analítico foram utilizados para todas as extrações. De forma breve, cascas de pau-para-tudo e folhas de escada-de-macaco foram coletadas em Salto Caxias, PR, e folhas de guaçatonga foram coletadas em Curitiba, PR. Uma exsicata de cada planta foi encaminhada e cadastrada no herbário da Universidade Federal do Paraná para referência. Cascas de *Himatanthus lancifolius* foram adquiridas no mercado de plantas

medicinais formal na região metropolitana de São Paulo, SP, e a identificação da espécie foram feita através de análise farmacognóstica, segundo a Farmacopéia Brasileira I, e por comparações macroscópica e microscópica com amostra autêntica. Uma amostra da droga foi depositada na herboteca do Laboratório de Farmacognosia da UFPR. O material coletado foi submetido à extração por percolação com solução de etanol a 20 % até esgotamento total. Os extratos reunidos foram evaporados em rotaevaporador e concentrados até a secura. Para o preparo do extrato de *Himatanthus lancifolius*, cascas foram moídas, desengorduradas em Soxhlet com éter de petróleo e, em seguida, submetidas à maceração com solução aquosa de ácido clorídrico 1 % (v/v) e extraídas até reação negativa com o Reagente de Dragendorff; o produto obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (40 ºC) até aproximadamente 1/5 do volume inicial e, posteriormente, alcalinizado com carbonato de sódio e submetido à partição com clorofórmio. O extrato orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. Todos os extratos das plantas medicinais utilizadas foram liofilizados e, após a preparação das soluções estoque a 1 %, foram mantidos à temperatura de -30 ºC até o momento do uso.

3.3 AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, sob número 1278, em 14/03/2006 (Anexo I). O material de medula foi obtido por punção da crista ilíaca por hematologista autorizado e acondicionado em frascos contendo heparina. As fontes desse material foram: medula óssea de indivíduos com suspeita clínica de serem portadores de distúrbios neoplásicos do sistema hematopoético, coletadas com finalidades diagnósticas; medula óssea de indivíduos previamente diagnosticados com neoplasias do sistema hematopoiético e que foram submetidos à nova punção por indicação clínica; medula óssea de portadores de doença neoplásica, porém sem comprometimento do sistema hematopoiético, mas que por motivos clínicos tiveram que se submeter à punção medular; medula óssea de pacientes com suspeita de serem portadores de doença neoplásica hematológica, mas que tiveram diagnóstico negativo para a mesma; medula óssea de portadores de doença neoplásica, porém sem comprometimento do sistema hematopoiético; pacientes que tiveram sua medula óssea colhida para outros fins e que não possuíam comprometimento

medular. Todos os pacientes, antes da doação da medula, foram esclarecidos quanto ao uso de seu material em pesquisa e, quando concordaram em participar, assinaram o termo de compromisso livre e esclarecido (Anexo II).

3.3.1 Processamento das amostras de medula óssea e isolamento de células mononucleares

As amostras de medula óssea foram diluídas em PBS (10m ml) e as células mononucleares (MNC) separadas do restante por meio de centrifugação (equipamento Sigma 4K15) a 400 *g* por 25 minutos, usando-se *Ficoll-Paque*^{TM}*PLUS* 1,077g/cm^3 (Amersham, Biosciences) como gradiente de densidade (3 ml). Após a centrifugação, o anel de MNC foi lavado duas vezes com 10 ml com PBS (800*g* por 5min), ressuspenso em RPMI 1640 ou IMDM, e a concentração celular ajustada para 10^6 MNC/ml com auxílio de hemocitômetro.

3.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade de todas as células de medula óssea utilizadas neste estudo foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste de exclusão com azul de tripan, segundo Merchant e colaboradores (1964), onde MNC foram diluídos apropriadamente (1/2; 1/10; 1/50) em solução a 0,4% de azul de tripan e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. Procedimento semelhante foi utilizado para observação da viabilidade das linhagens celulares incluídas neste estudo.

3.5 PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS

Para observação morfológica das linhagens celulares e da composição das frações de MNC das amostras, citocentrifugados contendo 8x10^4 células foram preparados por centrifugação a 1500 rpm por 5 min em T.A., sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro™ (Wescor). Em seguida, as lâminas secas ao ar foram coradas com o corante apropriado e as células diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico. Fotografias foram obtidas

usando-se o programa IMAGE PRO PLUS, versão 3.0.01.00 para Windows, acoplado ao microscópio.

3.6 COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWALD-GIEMSA (MGG)

Lâminas contendo citocentrifugados secos ao ar foram recobertas completamente com corante de May-Grünwald por 3 min; posteriormente, o corante foi diluído com gotas de água destilada tamponada pH 6.8 por 1 min. Em seguida, as lâminas foram recobertas com corante de Giemsa diluído em água tamponada (1:20) por 15 min, e, finalmente, lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.7 COLORAÇÃO NEGRO DE SUDÃO B (Dacie e Lewis, 1995)

Citocentrifugados secos ao ar foram fixados em vapor de formaldeído a 40% por 10 minutos e secos ao ar por 15 minutos; as lâminas foram mergulhadas na solução de trabalho do corante Negro de Sudão B por 1 hora; em seguida, recobertas completamente com etanol 70%. Após 30 segundos, o etanol foi desprezado. Este processo foi repetido por mais duas vezes e as lâminas foram, então, lavadas gentilmente em água corrente e secas ao ar. A contra-coloração dos citocentrifugados foi feita com May-Grünwald-Giemsa.

3.8 COLORAÇÃO COM BENZIDINA

A coloração de benzidina foi adaptada para as condições do laboratório como a seguir: em cuba de vidro revestida com papel alumínio, citocentrifugados secos ao ar foram submersos por 10 minutos em solução contendo 17,5 ml da solução de benzidina 0,4%, 3,5 ml de solução de nitroprussiato de sódio 1% e 3,5 ml de água oxigenada 3%; em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, secas ao ar e contra-coradas com May-Grünwald-Giemsa.

3.9 ENSAIOS CLONOGÊNICOS DE AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA EM MEIO SEMI-SÓLIDO

Para o estabelecimento dos ensaios clonogênicos, MNC ($5x10^4$) foram adicionadas a 1 ml do meio comercial apropriado para o cultivo de progenitores hematopoéticos, distribuídas em placas de 24 poços (TPP, Suíça) e incubadas em estufa a 37 ºC, em atmosfera úmida, com 5% de CO_2 (*Thermo Electron Corporation*), por 14-20 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os

mononucleares isolados foram incubados com doses finais crescentes dos extratos (1 – 1000 μg/ml). Células mononucleares incubadas nas mesmas condições, porém na ausência dos extratos, formaram o grupo controle.

3.9.1 Identificação, contagem e caracterização de colônias hematopoiéticas

Seguindo critérios semelhantes previamente estabelecidos (Testa, 1985), agrupamentos de 50 ou mais células foram considerados como colônias, enquanto grupos com 49 células ou menos foram considerados como agrupamentos. O reconhecimento e a enumeração das colônias ou agrupamentos foram realizados com auxílio de um microscópio de luz invertida Bioval, modelo XDS-1B. Foram contadas e diferenciadas as colônias eritróides (BFU-E e CFU-E) e de CFU-GM (incluindo CFU-G e CFU-M). Para caracterização das colônias, observou-se a morfologia das mesmas sob microscópio invertido e a composição de suas células em citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa, Negro de Sudão B e benzidina, quando necessário.

3.10 LINHAGENS CELULARES HUMANAS

As linhagens celulares leucêmicas humanas HL-60, K-562 e Daudi foram obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. A linhagem linfóide REH foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, do Departamento de Saúde Comunitária, UFPR. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 ou 20% de soro bovino fetal, a 37 ºC. As linhagens HL-60, K-562 e Daudi foram sub-cultivadas a cada 3-4 dias e a linhagem REH, a cada 7 dias, todas na concentração de 10^5 células/ml.

3.11 ENSAIOS COM LINHAGENS CELULARES HUMANAS

3.11.1 Ensaios de proliferação celular

Para cada linhagem celular, doses finais de 0,1 a 1000 μg/ml dos extratos foram adicionadas após 24 horas do sub-cultivo, e re-incubadas por mais 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em placas de fundo chato contendo 96 poços (TPP, Suíça), em um volume final de 200 μl. Após o período de incubação, a viabilidade das células foi determinada pelo teste de exclusão com azul de tripan; a morfologia foi avaliada em citocentrifugados contendo $8x10^4$

células corados com May-Grünwald-Giemsa, Negro de Sudão ou Benzidina quando necessário e a contagem realizada em hemocitômetro.

3.11.2 Potencial clonogênico

• Linhagens HL-60 e K-562

Células HL-60 (500/ensaio) e K-562 (1000/ensaio) foram adicionadas, juntamente com as doses indicadas dos extratos, a 1 ml do meio comercial apropriado para o cultivo de progenitores hematopoéticos, distribuídas em placas de 24 poços (TPP, Suíça) e incubadas a 37ºC em atmosfera úmida, com 5% de CO_2, por 7 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata. As concentrações dos extratos usadas foram somente aquelas que apresentaram resultado significativo nos ensaios de proliferação celular. As colônias foram quantificadas sob microscópio ótico invertido.

• Linhagem Daudi

Células Daudi (10^4 células/ml) foram adicionadas ao meio para ensaio clonogênico próprio para linhagens linfóides em volume final de 1,5 ml por ensaio. Em seguida, 150 µl de ágar 3,3 % foram adicionados, misturados e imediatamente distribuídos em placas de petri de 40x11mm (TPP, Suíça). As placas foram incubadas a 37 ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2 por 7 dias. As concentrações dos extratos usadas foram somente aquelas que apresentaram resultado significativo nos ensaios de proliferação celular. As colônias foram quantificadas sob microscópio ótico invertido.

3.11.3 Ensaios de diferenciação/maturação celular

Os ensaios de diferenciação/maturação celular foram realizados em placas de 24 poços (TPP, Suiça) contendo 10^6 células/ml. As doses dos extratos usadas foram as que apresentaram resultado significativo nos ensaios de proliferação celular, as quais foram adicionadas somente após 24 horas do subcultivo. Nos experimentos considerados controles positivos, foram utilizados agentes indutores da diferenciação para cada linhagem celular, sendo teofilina (7 mM), hemina (30 – 40 µmol) ou DMSO (1,25 %) para as linhagens Daudi (Sandlund *et al.*, 1993); K-562 (Huo *et al.*, 2006) e HL-60 (Collins *et al.*, 1978) respectivamente. A diferenciação celular foi observada em citocentrifugados corados com May-

Grünwald-Giemsa, Negro de Sudão B (para células HL-60) ou benzidina (para células K-562), sendo que para a linhagem Daudi a diferenciação foi monitorada através da morfologia das células tratadas com os extratos em comparação com aquelas tratadas com a teofilina, a qual induz à diferenciação das células Daudi em plasmócitos produtores de imunoglobulinas, os quais são característicos pelo seu núcleo excêntrico e cromatina condensada, citoplasma vacuolizado e altamente basófilo. Os ensaios de diferenciação/maturação celular foram monitorados durante 7 dias para cada linhagem celular avaliada.

3.12 AVALIAÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células HL-60 expostas ao extrato de pau-pra-tudo (100 μg/ml) e células K-562 tratadas com os extratos de agoniada (10 μg/ml) e guaçatonga (1 μg/ml), por 48 horas a 37 °C, foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas no tampão de ligação 1X ($1x10^6$ células/ml). Cem microlitros de suspensão celular foram transferidos para tubos apropriados, adicionados de 2 μl de anexina V-FITC (BD Pharmingen, Biosciences) ou 5 μl de 7-AAD (BD Pharmingen, Biosciences) e incubados por 15 minutos em T.A., ao abrigo da luz. Em seguida, 400 μl de tampão de ligação 1X foram adicionados e as células analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton & Dickinson, San Diego, California, USA), equipado com laser de Argônio (488 nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna. Para cada análise, 10^5 eventos foram adquiridos, e gráficos baseados na emissão de fluorescência do FITC (FL1-H) e do 7-AAD (FL3-H) foram construídos em escala logarítmica. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima da linha limite de fluorescência, a qual foi negativa para o controle (população não tratada com os corantes). Os resultados foram analisados com auxílio do programa WIN MDI 2.8.

3.13 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células HL-60 após exposição ao extrato de pau-pra-tudo (100 μg/ml) e células K-562 tratadas com os extratos de agoniada (10 μg/ml) e guaçatonga (1 μg/ml) por 48 horas a 37 °C, foram lavadas, ressuspensas em PBS e avaliadas por citometria de fluxo. Para cada análise, 10^5 eventos foram adquiridos, e gráficos baseados no tamanho (FSC - *forward light scatter*) e na complexidade interna

(SSC - *side light scatter*) das células foram construídos em escala linear. Os resultados foram analisados com auxílio do programa WIN MDI 2.8.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como a média ± 1 erro padrão da média (EPM) ou 1 desvio padrão (DP). Para análise estatística dos resultados, usou-se a Análise de Variância (ANOVA – *one way*); o teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey quando apropriado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa *Statistica*. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências bibliográficas deste trabalho foram formatadas com auxílio do programa EndNOTE, versão 9.0, usando o periódico *The Journal of Cell Biology* como modelo.

4 *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

De acordo com o Ministério da Saúde, a *"fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal".* Desde a Declaração de Alma-Ata, de 1978, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar recursos disponíveis, locais, nacionais e outros. Neste contexto, insere-se a utilização de plantas medicinais, tendo em conta que 80% da população mundial utiliza essas plantas ou suas preparações no que se refere à atenção primária à saúde (Mans *et al.*, 2000).

Várias drogas são utilizadas na quimioterapia do câncer, mas a maioria delas exibe toxicidade celular, podendo induzir genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos teratogênicos em células não tumorais (Hellmann-Blumberg *et al.*, 2000; Philip, 2005). Apesar de sua elevada eficácia sobre células malignas, alvos do tratamento, estes efeitos colaterais limitam o uso de agentes quimioterapêuticos. Assim, a procura por drogas alternativas de baixa toxicidade, que sejam eficazes no tratamento dos vários tipos de câncer, forma uma importante linha de base para investigações científicas referentes à flora brasileira.

De acordo com dados recentes, o uso de extratos de plantas medicinais é efetivo na terapia de combate ao câncer, cuja ação está atribuída ao efeito sinérgico ou complementar de compostos presentes no extrato (Li *et al.*, 2000), uma vez que o efeito citostático observado sobre células cancerosas parece ser mais eficaz do que o efeito de seus compostos isolados e biologicamente ativos (Vickers, 2002).

Como revisado na introdução deste trabalho, muitos aspectos que influenciam o uso popular do pau-pra-tudo (*R. sellowii*), agoniada (*H. lancifolius*), guaçatonga (*C. sylvestris*) e da escada-de-macaco (*B. microstachya*) vêm sendo comprovados cientificamente, porém seus efeitos sobre linhagens leucêmicas humanas são escassos na literatura, corroborando para com a relevância deste estudo. Considerando que grande parte da população consome na atenção primária à saúde e para o tratamento de diversas patologias, plantas medicinais na forma de chá, ou seja, como extrato aquoso, este trabalho procurou avaliar, sob vários aspectos, a influência dos extratos preparados dessas plantas sobre o comportamento de células leucêmicas.

É notório o fato de que o Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento dessa terapêutica, como a maior diversidade vegetal do mundo, ampla sociodiversidade, uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional, tecnologia e cientistas para validar cientificamente esse conhecimento. Inseridos neste conjunto, passamos a relatar os resultados obtidos ao se investigar alguns aspectos do comportamento, em um primeiro momento, de diferentes linhagens leucêmicas de origem hematopoiética e, em seguida, com progenitores de medula óssea de pacientes portadores de neoplasias hematopoiéticas, quando expostas aos extratos de *Rauvolfia sellowii*, *Himatanthus lancifolius*, *Casearia sylvestris* e *Bauhinia microstachya* em sistemas de cultivo *in vitro*.

4.1. LINHAGENS LEUCÊMICAS DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA

4.1.1 Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre a proliferação de linhagens leucêmicas

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a influência dos extratos de pau-pra-tudo (*R. sellowii*), agoniada (*H. lancifolius*), guaçatonga (*C. sylvestris*) e de escada-de-macaco (*B. microstachya*) sobre o comportamento de linhagens celulares leucêmicas humanas. Para tanto, primeiramente, avaliou-se sua influência sobre a proliferação de células HL-60 e K-562, de origem mielóide, e das linhagens linfóides Daudi e REH e, em seguida, seus efeitos tóxicos.

Os resultados para a linhagem HL-60 estão apresentados sob a forma de curvas dose-resposta, ilustradas nas Figuras 2 (A-D), juntamente com a porcentagem média de viabilidade, avaliada pelo teste de exclusão com azul de tripan após incubação por 48 horas com os respectivos extratos. De modo semelhante, as Figuras 3 (A-D) ilustram os resultados para a linhagem K-562, enquanto as Figuras 4 (A-D) demonstram os dados para a linhagem Daudi, e as Figuras 5 (A-D), com as células REH.

Face aos resultados obtidos, observou-se que, primeiramente, para as células HL-60 (Figura 2), nenhum dos extratos avaliados influenciou sua proliferação nas doses de 0,1 a 10 μg/ml, permanecendo o número de células recuperadas nas culturas muito próximo daquele obtido para a população não tratada, aqui e doravante denominada população controle ($2,75 \pm 0,12 \times 10^6$).

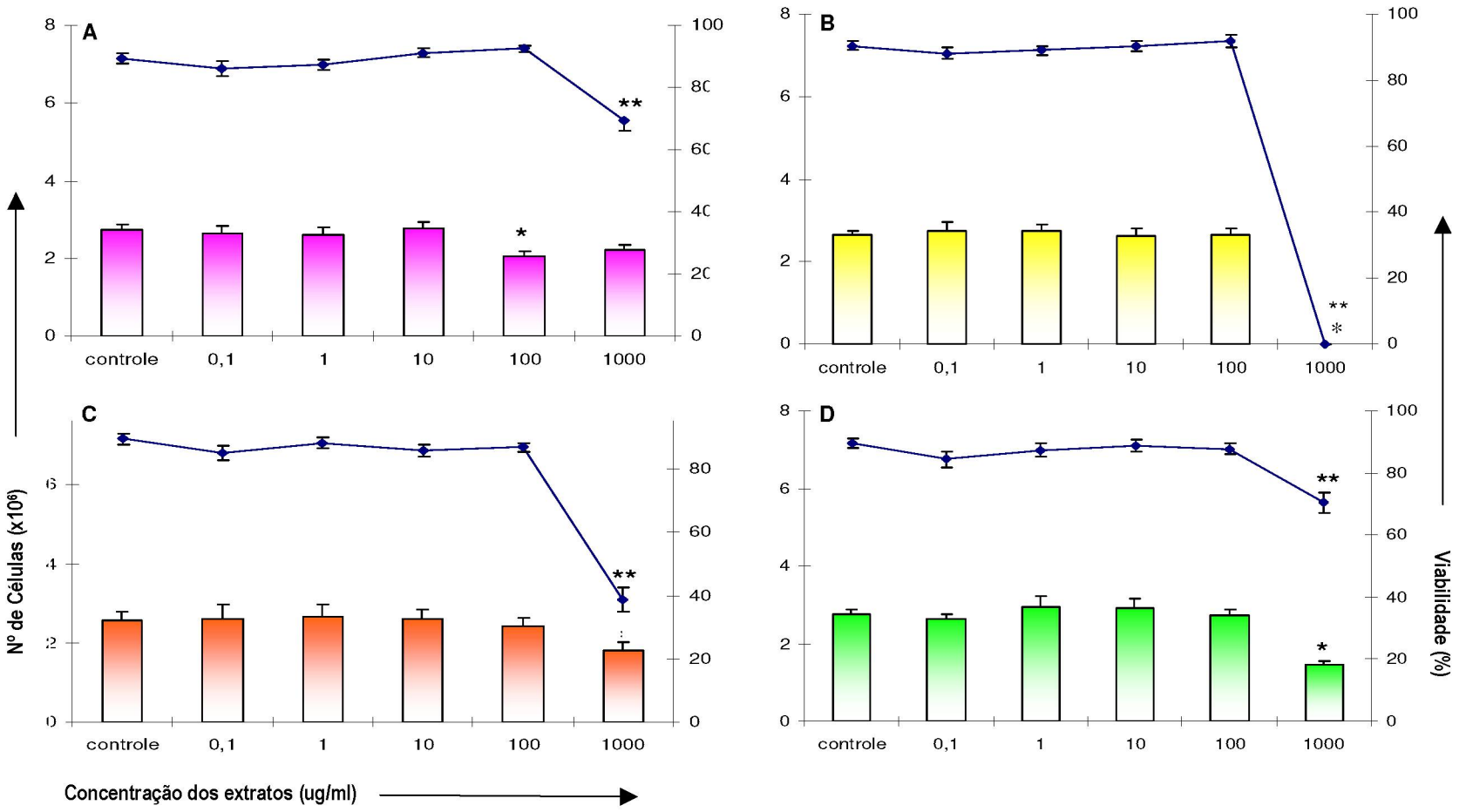


Figura 2. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii* (A), *Himatanthus lancifolius* (B), *Casearia sylvestris* (C) e *Bauhinia microstachya* (D) sobre a proliferação e a viabilidade de células HL-60. Cada barra representa a média±1EPM do número de células recuperadas para as concentrações indicadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata, enquanto a curva representa a viabilidade média±1EPM dessas células, expressa em porcentagem. *p<0,05; **p<0,001.

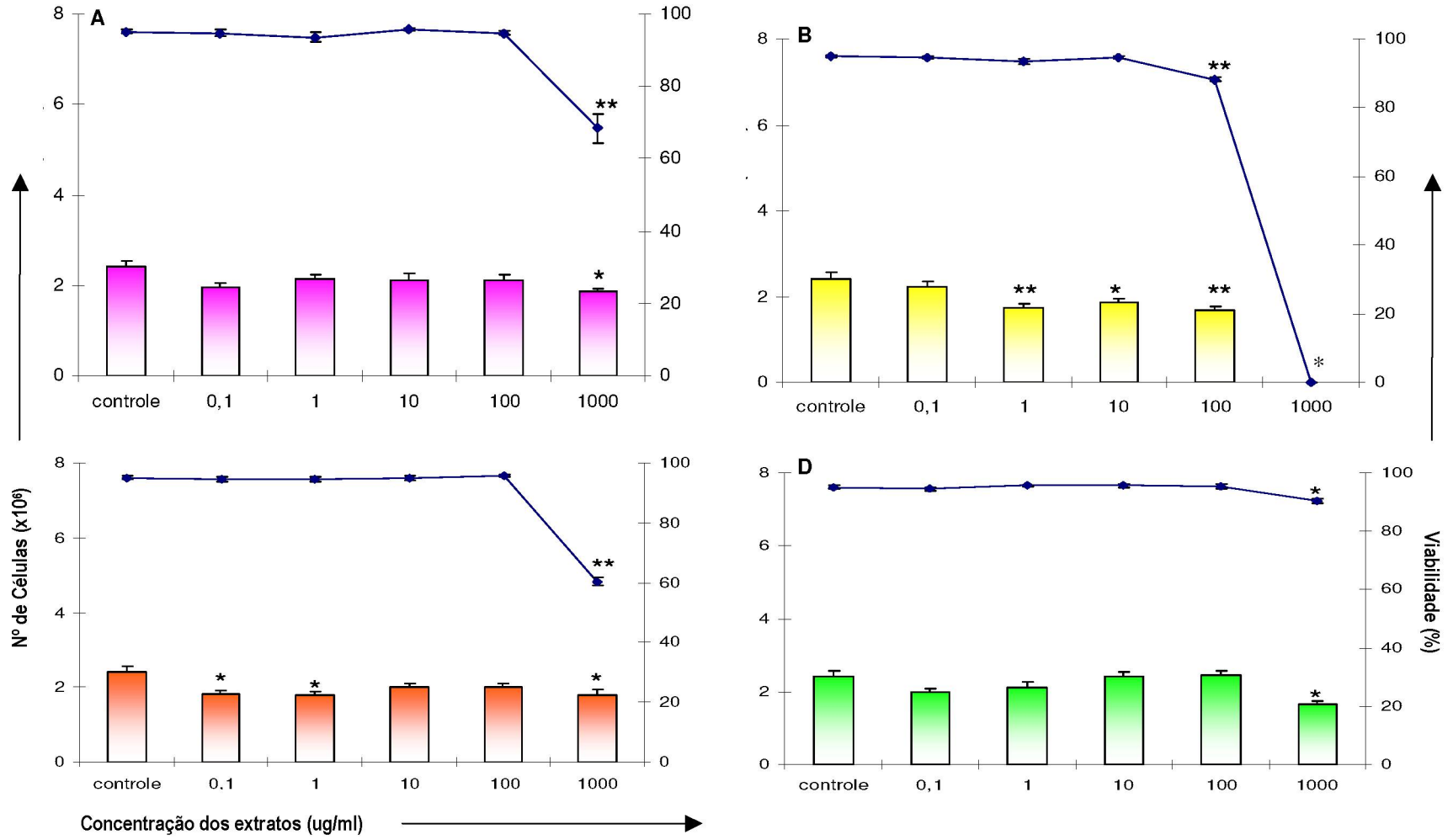


Figura 3. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii* (A), *Himatanthus lancifolius* (B), *Casearia sylvestris* (C) e *Bauhinia microstachya* (D) sobre a proliferação e a viabilidade de células K-562. Cada barra representa a média±1EPM do número de células recuperadas para

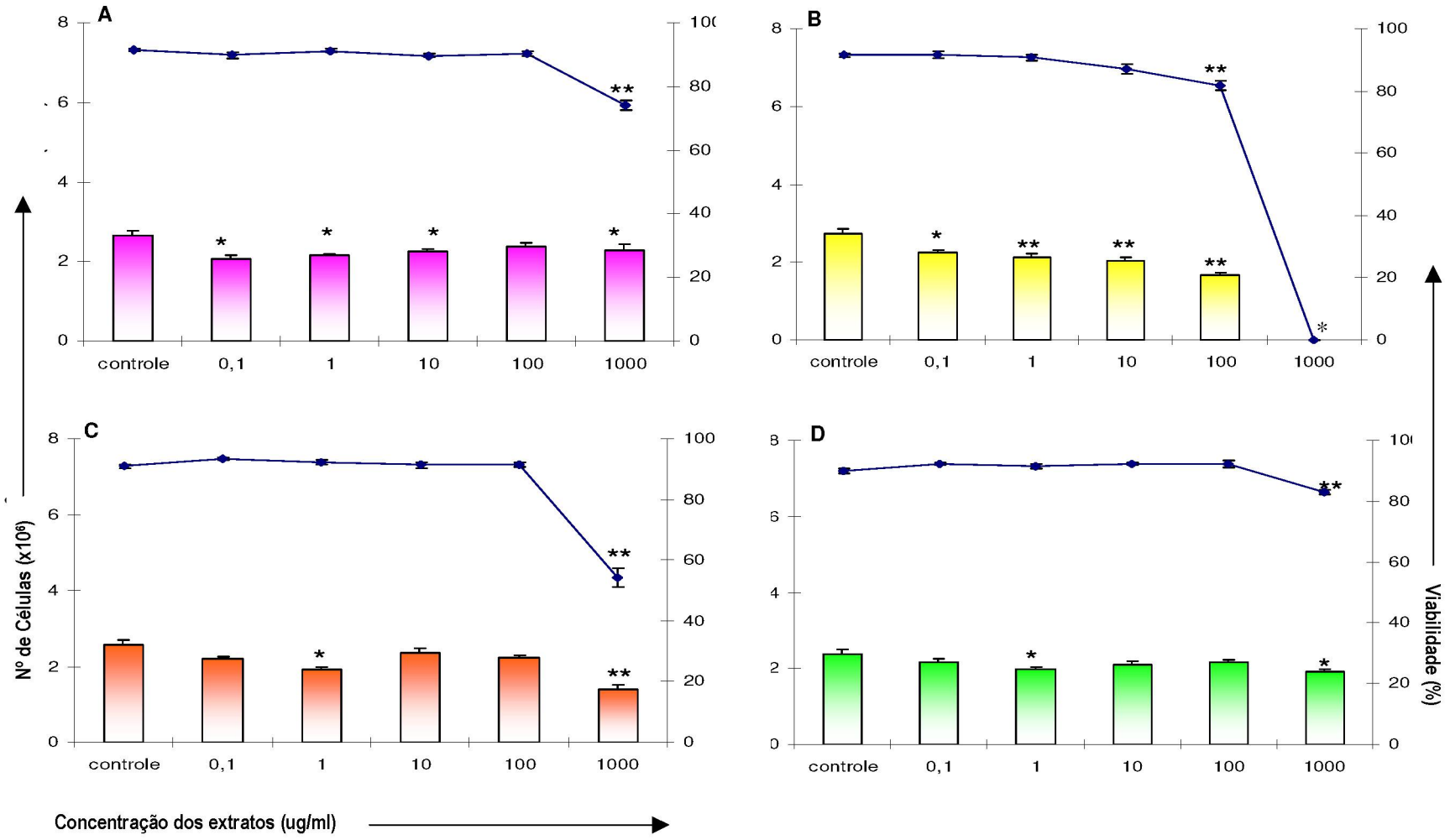


Figura 4. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii* (A), *Himatanthus lancifolius* (B), *Casearia sylvestris* (C) e *Bauhinia microstachya* (D) sobre a proliferação e a viabilidade de células Daudi. Cada barra representa a média±1EPM do número de células recuperadas para as concentrações indicadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata, enquanto a curva representa a viabilidade média±1EPM dessas células, expressa em porcentagem. *p<0,05; **p<0,001.

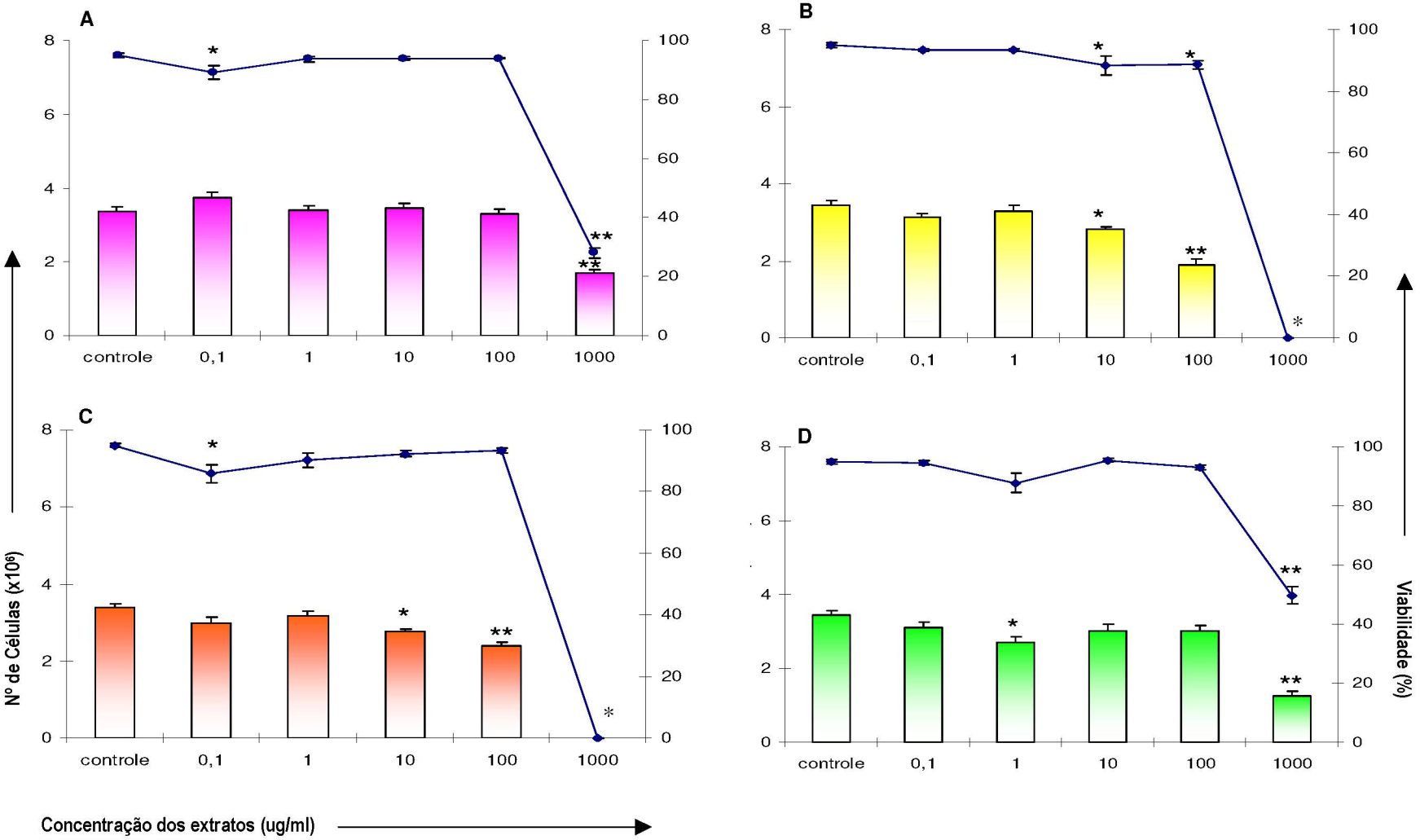


Figura 5. Efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Rauvolfia sellowii* (A), *Himatanthus lancifolius* (B), *Casearia sylvestris* (C) e *Bauhinia microstachya* (D) sobre a proliferação e a viabilidade de células REH. Cada barra representa a média±1EPM do número de células recuperadas para as concentrações indicadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata, enquanto a curva representa a viabilidade média±1EPM dessas células, expressa em porcentagem. *p<0,05; **p<0,001.

Já na dose de 100 μg/ml, o único extrato a promover significativa queda na proliferação de células HL-60 em relação ao grupo controle foi o de pau-pra-tudo (Figura 2A), com 2,07 ± 0,11 x10^6 (p<0,05) células recuperadas. A 1000 μg/ml, observou-se, para todos os extratos (Figura 2A-D), redução significativa no número dessas células quando comparados ao controle. Ou seja, nesta concentração, o número de células recuperadas para o extrato de pau-pra-tudo foi de 2,22 ± 0,14 x10^6 (p<0,05); de 1,82 ± 0,19 x10^6 (p<0,05) para o de guaçatonga, e de 1,45 ± 0,10 x10^6 (p<0,05) para o de escada-de-macaco (Figura 2D), enquanto que para o extrato de agoniada não foi possível a recuperação de células.

Ao se investigar mais detalhadamente essa atividade, observou-se que a 1000 μg/ml, a mesma estava associada a um efeito tóxico dos extratos sobre as células leucêmicas, evidenciado pelo teste de exclusão com azul de tripan. Ou seja, para o extrato de agoniada (Figura 2B), nenhuma célula viável pode ser recuperada (p<0,001). Já para os extratos de escada-de-macaco (Figura 2D) e de pau-pra-tudo (Figura 2A), o efeito citotóxico, embora significativo (p<0,001 para todos; n=4), não exerceu a mesma intensidade, pois, nesta mesma dose, 70,4 ± 3,2 % e 69,5 ± 3,2 % das células, respectivamente, permaneceram viáveis, quando comparado ao efeito mais drástico demonstrado pelo extrato de guaçatonga (Figura 2C), onde somente 38,7 ± 3,7 % das células não incorporaram o corante.

Em contraste com o relevante efeito tóxico observado para esses extratos a 1000 μg/ml, 92,5 ± 1,0 % de células viáveis foram observadas para o extrato de pau-pra-tudo a 100 μg/ml, sugerindo um efeito inibidor real deste extrato sobre a proliferacão de células HL-60 (Figura 2A).

Com relação às células K-562, efeito citotóxico também na concentração de 1000 μg/ml foi observado para todos os extratos, com viabilidade inferior a <1% (p<0,001) para o de agoniada (Figura 3B), de onde também não foi possível recuperar células viáveis, e de 60,4 ± 1,5 % (p<0,001), 68,4 ± 4,1 % (p<0,001) e 90,4 ± 0,9 % (p<0,05), respectivamente, para os de guaçatonga (Figura 3C), pau-pra-tudo (Figura 3A) e escada-de-macaco (Figura 3D). O número de células recuperadas nesta mesma dose, respectivamente para os outros extratos, foi de 1,79 ± 0,15 x10^6, 1,87 ± 0,07 x10^6 e 1,67 ± 0,07 x10^6 (p<0,05 para todos).

Para o extrato de agoniada (Figura 3B), nas doses entre 1 μg/ml e 100 μg/ml observou-se redução significativa na proliferação de células K-562 em relação ao controle (2,42 ± 0,13 x10^6 células), com 2,22 ± 0,12 x10^6, 1,75 ± 0,09 x10^6 (p<0,001), 1,87 ± 0,08 x10^6 (p<0,05) e 1,69 ± 0,07 x10^6 (p<0,001) células recuperadas, respectivamente. Para as doses 1 e 10 μg/ml, 93,5 ± 0,8 %, 94,8 ± 0,4 % e 88,3 ± 0,7 %, respectivamente, das células reagiram negativamente com o corante azul de tripan, implicando estarem vivas. Em contraste com a ausência de efeito observada para os extratos de pau-pra-tudo (Figura 3A) e de escada-de-macaco (Figura 3D), o extrato de guaçatonga (Figura 3C), a 0,1 e 1 μg/ml, reduziu significativamente o número de células K-562 recuperadas em relação ao controle (2,42 ± 0,14 x10^6; 95,1 ± 0,5 %), com 1,83 ± 0,09 x10^6 (p<0,05) e 1,8 ± 0,09 x10^6 células (p<0,05), respectivamente, com viabilidade de 94,7 ± 0,7 e 94,6 ± 0,6 %.

Ao investigar o efeito desses extratos sobre a proliferação de células Daudi (Figura 4A-D), de modo semelhante ao relatado para as linhagens HL-60 e K-562, a dose de 1000 μg/ml de todos os extratos incluídos neste trabalho inibiu significativamente sua proliferação por efeito tóxico, sendo que o de agoniada foi o que demonstrou atividade mais potente (Figura 4B), eliminando todas as células, seguido pelo de guaçatonga (54,2 ± 3,2 %; p<0,001), pau-pra-tudo (74,2 ± 1,5 %; p<0,001) e, finalmente, o de escada-de-macaco (83 ± 0,6 %; p<0,001).

Em doses inferiores, entretanto, observou-se inibição da proliferação para todos os extratos, uma vez que a viabilidade média das células permaneceu muito próxima àquela encontrada para os respectivos controles (>90 %). Neste contexto, o extrato de pau-pra-tudo inibiu a proliferação celular nas doses de 0,1 a 100 μg/ml (Figura 4A), sendo inclusive significativa entre 0,1 e 10 μg/ml, com 2,07 ± 0,10 x10^6, 2,15 ± 0,05 x10^6 e 2,24 ± 0,08 x10^6 células recuperadas, respectivamente, em relação ao valor de 2,66 ± 0,13 x10^6 células observado para a população controle (p<0,05 para todos).

Para o extrato de agoniada (Figura 4B), o efeito inibidor observado foi dependente da dose e significativo para as concentrações de 0,1 a 100 μg/ml, com 2,24 ± 0,07 x10^6 (p<0,05), 2,12 ± 0,10 x10^6 (p<0,001), 2,05 ± 0,07 x10^6 (p<0,001), e 1,66 ± 0,08 x10^6 (p<0,001) células recuperadas, respectivamente, em relação a 2,73 ± 0,13 x10^6 células observadas para a população controle. Porém, o efeito observado a 100 μg/ml foi de natureza tóxica, pois somente 1,66 ± 0,08 % das células permaneceram viáveis.

Para os extratos de guaçatonga (Figura 4C) e de escada-de-macaco (Figura 4D), inibição significativa foi observada somente na concentração de 1 μg/ml, com 1,91 ± 0,07 $x10^6$ e 1,98 ± 0,07 $x10^6$ células recuperadas, respectivamente, em relação a 2,56 ± 0,14 $x10^6$, 2,38 ± 0,12 $x10^6$ células observadas em relação aos respectivos controles (p<0,05 para todos).

Com relação à linhagem linfóide REH (Figura 5A-D), citotoxicidade evidente com os extratos de agoniada (Figura 5B) e de guaçatonga (Figura 5C) foi observada, com queda da viabilidade celular a < 1 % na concentração de 1000 μg/ml. O extrato de agoniada (Figura 5B) ainda reduziu, de forma significativa em relação ao controle (3,44 ± 0,12 $x10^6$ células), a proliferação de células REH nas concentrações de 10 (2,81 ± 0,08 $x10^6$ células; p<0,05) e 100 μg/ml (1,90 ± 0,15 $x10^6$ células; p<0,001), acompanhada na queda significativa da viabilidade celular, com valores de 88,3 ± 3,2 % e 88,6 ± 1,4 %, respectivamente (p<0,05 para ambos).

Os extratos de pau-pra-tudo (Figura 5A) e de escada-de-macaco (Figura 5D) também inibiram a proliferação celular a 1000 μg/ml devido a efeito tóxico, porém de forma menos pronunciada, observando-se viabilidades médias de 28,0 ± 1,9 e 49,8 ± 2,8 %, respectivamente. Em contraste, o extrato de guaçatonga (Figura 5C) inibiu de fato a proliferação de células REH nas doses de 10 μg/ml e 100 μg/ml, com somente 2,76 ± 0,09 $x10^6$ (p<0,05) e 2,40 ± 0,10 $x10^6$ (p<0,001) células recuperadas, respectivamente, em relação a 3,38 ± 0,12 $x10^6$ células observadas para o controle.

Nesta série de experimentos foi possível observar que concentrações elevadas dos extratos investigados têm a habilidade de inibir a proliferação celular das linhagens leucêmicas incluídas neste estudo, independente de sua origem linfóide ou mielóide por serem tóxicos. Entretanto, em concentrações inferiores, essa atividade foi diferenciada entre as linhagens. Por exemplo, enquanto a linhagem K-652 sofreu efeitos significativos dos extratos de agoniada e guaçatonga, as células HL-60 demonstraram serem as menos sensíveis à ação de todos os extratos. Em contraste, as células de origem linfóide demonstraram maior sensibilidade à ação desses extratos.

Dos extratos investigados, o extrato de escada-de-macaco foi o que teve ação menos pronunciada sobre a proliferação celular das linhagens estudadas, enquanto o de agoniada, agindo significativamente sobre todas elas, foi o que

demonstrou ter maior habilidade em inibir essa atividade. Além disso, sua ação tóxica também foi a mais evidente, corroborando com o trabalho recente de Machado Junior e colegas (2006), que relataram ação semelhante sobre leucócitos humanos. Em concentrações inferiores, inibiu de forma significativa a proliferação e o potencial clonogênico de maneira dose-dependente da linhagem K-562, inibindo também as linhagens Daudi e REH. Como não há relatos sobre o potencial biológico deste extrato, de compostos isolados desta espécie ou mesmo de plantas do gênero *Himatanthus* sobre células cancerosas, estes resultados vêm, pela primeira vez, apontar o *H. lancifolius* como uma planta medicinal com potencial ação farmacológica sobre células leucêmicas, a qual deve ser melhor explorada.

Estudos que relacionam a atividade biológica do extrato da planta *R. sellowii* (pau-pra-tudo) sobre células cancerosas também são inexistentes. Entretanto, alcalóides isolados de *R. serpentina* já demonstraram atividade citotóxica contra a linhagem HL-60 (Itoh *et al.*, 2005). Mais recentemente, estudo com o extrato padronizado para alcalóides β-carbolínicos de *R. vomitoria* demonstrou sua capacidade em suprimir o crescimento de uma linhagem de células de câncer de próstata humano (Bemis *et al.*, 2006). Em nosso estudo, de forma particular, o extrato hidroetanólico de pau-pra-tudo exibiu citotoxicidade contra as linhagens linfóides Daudi e REH, e inibiu significativamente a proliferação de células provenientes de leucemia promielocítica aguda (HL-60).

Em contraste, relatos das propriedades anti-neoplásicas de *C. sylvestris* (guaçatonga) tiveram início já na década de 80, quando atividades anti-tumorais e citotóxicas sobre sarcomas de camundongos de seus diterpenos clerodanos foram descritas (Itokawa *et al.*, 1990; Itokawa *et al.*, 1988), como já citado na introdução deste trabalho. Em trabalhos posteriores, foi demonstrado que casearinas isoladas da planta também exibiam atividades anti-tumorais e citotóxicas contra tumores cancerosos humanos (Morita *et al.*, 1991). Mais recentemente, Oberlies e colaboradores descreveram três novas casearinas isoladas das folhas e do caule da guaçatonga com toxicidade sobre células tumorais ovarianas, de pulmão e de cólon (Oberlies *et al.*, 2002). Citotoxicidade de compostos isolados de *C. arborea* foi demonstrada sobre células SF 539 e LOX IMVI (Beutler *et al.*, 2000), assim como de diterpenos clerodanos de *C. lucida,* sobre células A-2780 (Sai Prakash *et al.*, 2002); compostos isolados da fração clorofórmica de *C. membranacea*, além de induzirem apoptose em células

PC-3, de câncer de próstata humano (Huang *et al.*, 2004), exerceram toxicidade sobre células HT-29, provenientes de adenocarcinoma de cólon humano, e sobre células P-388, derivadas de leucemia linfocítica de camundongo (Chang *et al.*, 2003). Glicosídeos fenólicos isolados de *C. multinervosa* foram testados em ensaios de citotoxicidade sobre células P-388, demonstrando atividade moderada (Ashik *et al.*, 2006), e compostos isolados de *C. nigrescens* (Williams *et al.*, 2007) e de *C. grewiifolia* (Kanokmedhakul *et al.*, 2007) sobre linhagens cancerosas humanas como a A-2780, também já foram relatadas. Os resultados aqui apresentados para a *C. sylvestris*, além do fato de estarem sendo relatados pela primeira vez, vêm adicionar novas linhagens tumorais sensíveis à ação do gênero, aumentando ainda mais o seu já amplo repertório de atividades relacionadas ao potencial anti-neoplásico.

Como citado anteriormente, algumas plantas do gênero *Bauhinia* exibem citotoxicidade sobre células cancerosas. Por exemplo, atividade anti-tumoral já foi descrita para as espécies *B. tomentosa* e *B. purpurea* (Hartwell, 1982). Ensaios realizados com compostos isolados das raízes de *B. saccocalyx* auxiliaram na descoberta das propriedades citotóxicas sobre células cancerosas humanas de pulmão, mama e cavidade oral (Apisantiyakom *et al.*, 2004). O extrato etanólico de *B. variegata* foi capaz de suprimir tumores hepáticos induzidos em ratos, além de exercer citotoxicidade contra linhagens cancerosas humanas, como HEp2 (câncer de laringe) e HBL-100 (câncer de mama) (Rajkapoor *et al.*, 2006). Um composto isolado das folhas da planta *B. forficata,* conhecida popularmente como pata-de-vaca, exibiu efeito antiproliferativo sobre células HeLa (câncer cervical humano), alterando o ciclo celular, mantendo-as na fase G1 (Lim *et al.*, 2006). Compostos isolados de *B. purpurea* com atividade inibitória do crescimento de células cancerosas de camundongo (P-388) e humanas (pancreáticas - BXPC3; de mama - MCF7; de pulmão - NCIH460; sistema nervoso central - SF268; cólon - KM20L2; e próstata -DU145) (Pettit *et al.*, 2006) também já foram relatados.

Entretanto, para a *B. microstachya* (escada-de-macaco), mesmo tendo recentemente sido considerada como uma importante fonte de antioxidantes naturais pelo seu rico conteúdo em polifenóis (Silva *et al.*, 2007), nenhuma referência quanto ao seu potencial anti-neoplásico foi encontrado. Portanto, os resultados com referência ao seu efeito tóxico somente sobre células leucêmicas de origem linfóide, pela primeira vez relatado, demonstra um potencial seletivo que deve ser melhor explorado.

4.1.2 Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre o potencial clonogênico de linhagens leucêmicas

Quando se avalia o potencial de um agente ou de misturas complexas, como os extratos neste trabalho, sobre linhagens celulares, é necessário estar alerta para o fato de que, muitas vezes, o efeito pode demorar horas, dias ou mesmo semanas para ser observado, havendo assim a necessidade de ensaios de período mais prolongado, onde se avaliem eventos não só sobre a sobrevivência da população sob estudo, mas também sobre sua capacidade funcional.

Ensaios de proliferação celular, medidos através da contagem do número de células após um período de incubação pré-estabelecido com o agente em estudo, são úteis para indicar o potencial das células em questão em termos de sobrevivência. Já os ensaios de viabilidade são usados para medir a proporção de células viáveis após um procedimento traumático, de natureza física, biológica ou química, e em geral se baseiam na ruptura da integridade da membrana celular, a qual é determinada pela incorporação de um corante, como o azul de tripan usado neste estudo, ao qual a célula íntegra é refratária.

Entretanto, o fato de uma célula estar viável não é suficiente para atestar sua capacidade funcional. Neste contexto, quando se estuda uma população de células primitivas que têm a capacidade de exercer diferentes funções quando inseridas em um sistema metodológico apropriado, efeitos sobre a proliferação celular devem ser também investigados por meio de experimentos que avaliem a capacidade regenerativa (ou replicativa) dessas células, como os ensaios clonogênicos.

Como já referido na introdução deste estudo, esses ensaios são sistemas de cultura *in vitro*, onde células progenitoras, na presença de uma combinação de citocinas específicas para cada linhagem celular, formam colônias distintas morfologicamente, cuja composição celular é variada, podendo originar células em diferentes estágios de maturação, desde as mais primitivas até aquelas fenotipicamente diferenciadas.

Tendo em vista o fato de que os extratos inibiram de forma variada, mas significativa, a proliferação de células leucêmicas e objetivando uma análise mais detalhada sobre a ação desses extratos sobre a funcionabilidade dessas células, investigou-se sua ação sobre o potencial clonogênico das linhagens HL-60, K-562

e Daudi. É preciso destacar o fato de que, por problemas de natureza técnica, somente para as linhagens mielóides foi possível estabelecer condições experimentais adequadas que promovessem a geração de colônias *in vitro*, permitindo inclusive análise estatística dos resultados. Por outro lado, para a linhagem Daudi, foi desenvolvido um protocolo experimental específico, uma vez que não foi possível encontrar, na literatura consultada, protocolos experimentais que direcionassem tais ensaios. Entretanto, não foi possível desenvolver um número mínimo de ensaios que permitissem avaliar a significância dos resultados. Portanto, os resultados referentes aos efeitos dos extratos sobre o potencial clonogênico para esta linhagem, embora apresentados, sua análise manteve-se em nível de tendências dos efeitos observados.

Assim, o efeito dos extratos sobre a capacidade dessas linhagens em formar colônias típicas foi avaliado através do seu cultivo em meio semi-sólido enriquecido com citocinas recombinantes, e exposição aos extratos somente nas concentrações que promoveram inibição significativa da proliferação nos ensaios anteriores. Ou seja, enquanto as células HL-60 foram expostas, por sete dias, ao extrato de pau-pra-tudo a 100 μg/ml, as células K-562 foram tratadas com 1, 10 e 100 μg/ml do extrato de agoniada e com 0,1 e 1 μg/ml do extrato de guaçatonga pelo mesmo período. Já as células Daudi foram expostas às doses de 0,1, 1 e 10 μg/ml do extrato de pau-pra-tudo, a 0,1 a 10 μg/ml do de agoniada, a 1 μg/ml do de guaçatonga, e a 1 μg/ml do de escada-de-macaco. Após o período de cultivo, as colônias formadas foram visualizadas e enumeradas em microscópio invertido e os resultados estão apresentados na Figura 6 para células HL-60, Figuras 7 e 8 para células K-562, e Figuras 9 à 12, para células Daudi .

Para as células HL-60 tratadas com o extrato de pau-pra-tudo (Figura 6), observou-se redução significativa do número de colônias formadas (104 ± 19,8; $p<0,05$) em relação ao controle (124,2 ± 23,5 colônias). Da mesma forma, o número de colônias observado para células K-562 tratadas com o extrato de agoniada (Figura 7), quando comparado à população controle, para a qual 176,6 ± 13,3 colônias foram observadas, diminuiu de forma significativa, de acordo com a dose. Ou seja, enquanto a 1 e 10 μg/ml, somente 138,8 ± 12,1 ($p<0,05$) e 105,3 ± 2,0 colônias ($p<0,001$), respectivamente, foram geradas (n=3), a 100 μg/ml não se observou a presença de colônias ($p<0,001$). Para o extrato de guaçatonga

(Figura 8), embora de modo não significativo, observou-se também diminuição no número de colônias de células K-562 formadas.

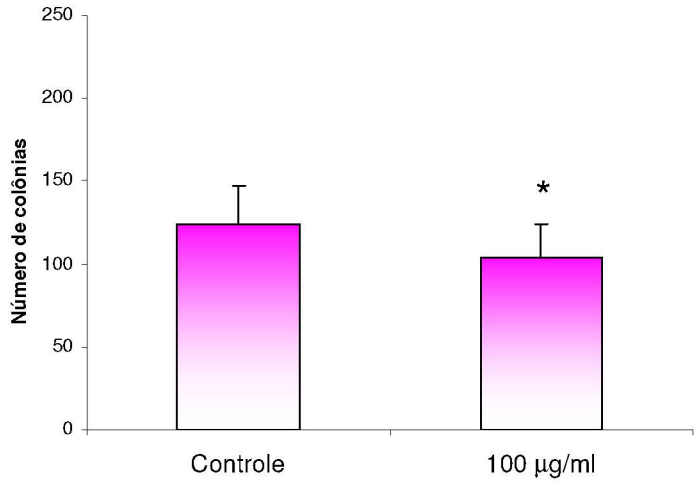


Figura 6. Efeito do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre o potencial clonogênico de células HL-60. Células HL-60 foram expostas ao extrato de pau-pra-tudo em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5% CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias geradas para as concentrações indicadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. *p<0,05.

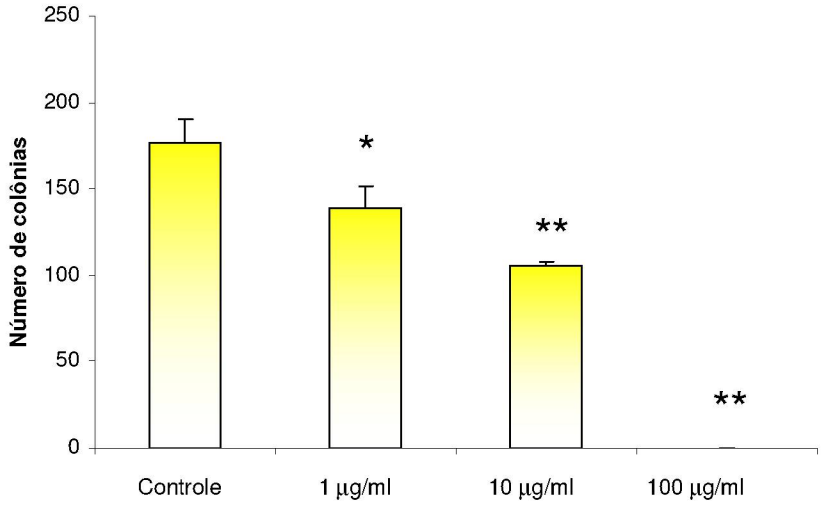


Figura 7. Efeito do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre o potencial clonogênico de células K-562. Células K-562 foram expostas, por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2.ao extrato de agoniada nas doses indicadas, em meio semi-sólido. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias formadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.*p<0,05, **p<0,001.

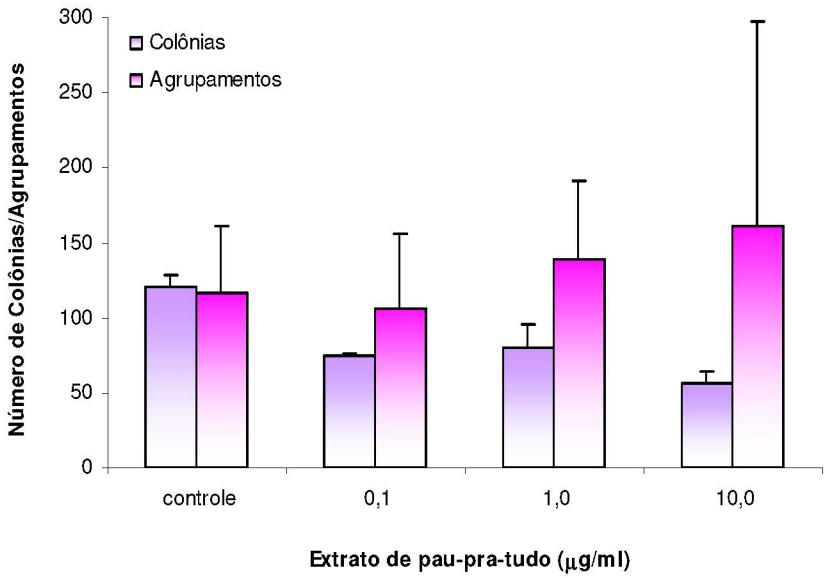


Figura 8. Efeito do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o potencial clonogênico de células K-562. Células K-562 foram expostas ao extrato de guaçatonga nas doses indicadas em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias formadas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Em contraste com as linhagens mielóides, para as células Daudi, a metodologia empregada levou à formação não só de colônias, mas também de pequenos aglomerados contendo <50 células, os quais foram enumerados como agrupamentos.

Como ilustrado na Figura 9, enquanto para a população controle observou-se 120,5 ± 7,8 colônias e 116,5 ± 44,5 agrupamentos, tratamento com doses crescentes do extrato de pau-pra-tudo levou a uma diminuição proporcional desse valor, com 74,5 ± 2,1, 80,5 ± 14,8 e 56,5 ± 7,8 colônias, respectivamente, para 0,1, 1 e 10 μg/ml do extrato, e aumento do número de agrupamentos (106,0 ± 49,5; 139,0 ± 52,3; 160,6 ± 136,5).

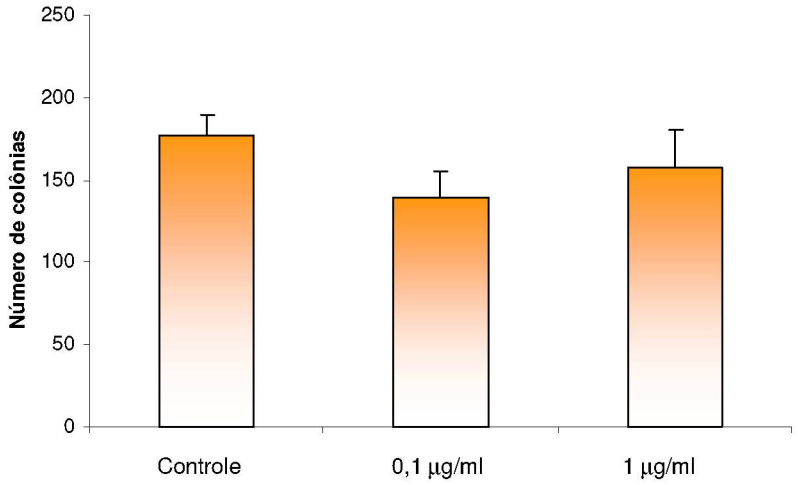


Figura 9. Efeito do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre o potencial clonogênico de células Daudi. Células Daudi foram expostas ao extrato de pau-pra-tudo nas doses indicadas em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias e agrupamentos formados de dois experimentos independentes.

Já o tratamento dessas células com o extrato de agoniada (Figura 10) levou a redução do número de colônias (e de agrupamentos), com somente 19 ± 4,2 (121,5 ± 94), 9,0 ± 4,2 (64,5 ± 65,8) e 7,0 ± 4,2 colônias (58,5 ± 50,2) a 0,1, 1 e 10 µg/ml do extrato, respectivamente. Na dose de 100 µg/ml, este extrato foi capaz de inibir completamente a formação de colônias ou agrupamentos.

Da mesma forma, os extratos de guaçatonga (Figura 11) e escada-de-macaco (Figura 12) inibiram a formação de colônias (51,0 ± 26,9 colônias), sem influenciar o número de agrupamentos formados.

Recapitulando alguns dos perfis demonstrados com os ensaios iniciais de proliferação e mesmo com um número pequeno de experimentos, os extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco também foram capazes de inibir a formação de colônias de progenitores leucêmicos em meio semi-sólido, demonstrando ter também influência sobre o potencial clonogênico das linhagens leucêmicas estudadas.

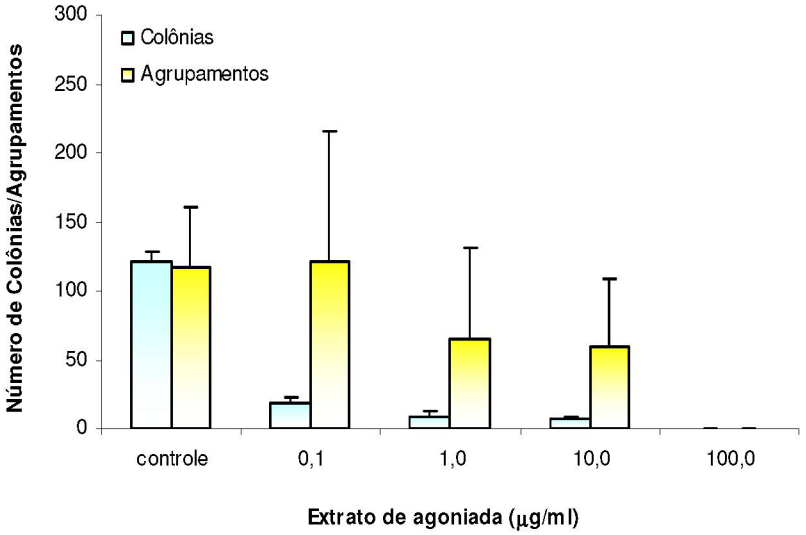


Figura 10. Efeito do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre o potencial clonogênico de células Daudi. Células Daudi foram expostas ao extrato de agoniada nas doses indicadas em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias e agrupamentos formados de dois experimentos independentes.

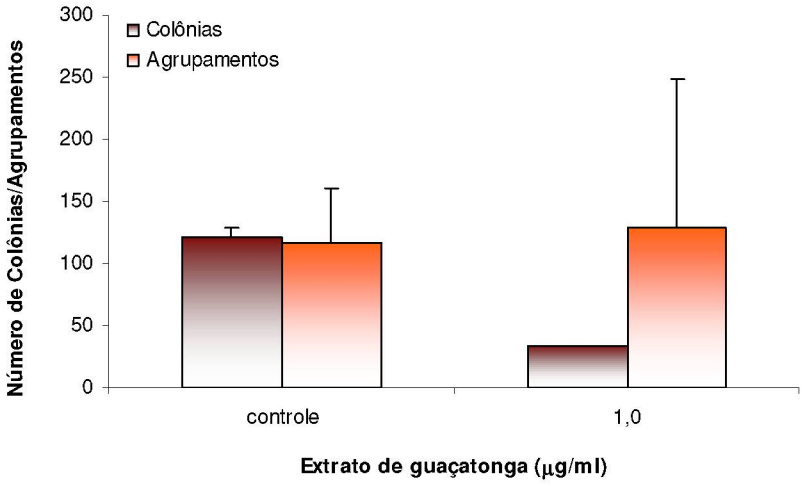


Figura 11. Efeito do extrato de *Casearia sylvestris* sobre o potencial clonogênico de células Daudi. Células Daudi foram expostas ao extrato de guaçatonga nas doses indicadas em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias e agrupamentos formados de dois experimentos independentes.

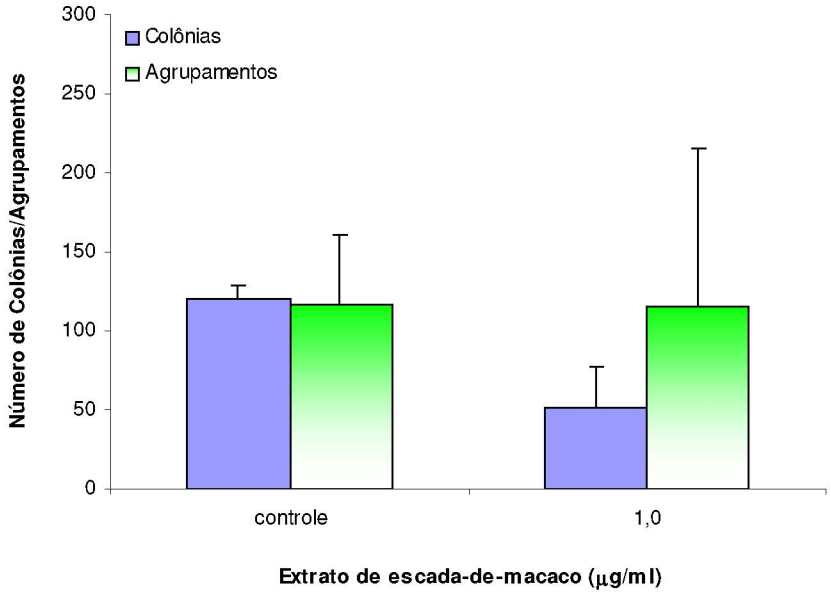


Figura 12. Efeito do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre o potencial clonogênico de células Daudi. Células Daudi foram expostas ao extrato de escada-de-macaco nas doses indicadas em meio semi-sólido por 7 dias, a 37ºC, em atmosfera úmida e 5 % CO_2. Cada barra representa a média±1EPM do número de colônias e agrupamentos formados de dois experimentos independentes.

Entretanto, em nenhum dos experimentos realizados para as linhagens mielóides foi possível notar alteração do tamanho, da cor ou da morfologia das colônias, independente do extrato avaliado. Da mesma forma, citocentrifugados preparados das células dessas colônias corados com MGG não demonstraram alterações perceptíveis em sua morfologia. Ao contrário, observou-se a presença de células que se assemelhavam às do inóculo original. Este aspecto se repetiu ao se analisar citocentrifugados preparados das mesmas células tratadas com os extratos, mas mantidas em suspensão (aqui denominados ensaios de proliferação).

Este conjunto de informações nos levou a observar a topografia dessas células por citometria de fluxo, uma metodologia bastante útil que permite análises múltiplas e independentes das características físicas e químicas das células, as quais são individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida que intercepta um ou mais feixes de luz provenientes de um raio laser. As células, ao passarem pelos raios, causam dispersão da luz em várias direções, as quais dependem do tamanho/volume e da estrutura interna de cada célula (Macey,

1994). Dessa forma, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado ao tamanho da célula (*FSC – forward light scatter*), enquanto aquele que capta o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do raio laser (*SSC – side light scatter*) relaciona-se com a complexidade interna celular, em particular a granularidade e a forma nuclear (Macey, 1994; Shapiro, 1985). Ainda, esta técnica analisa rapidamente, com maior acuracidade, um número muito superior de células.

Assim, células mielóides foram submetidas ao mesmo protocolo experimental de tratamento, onde células HL-60 foram expostas a 100 μg/ml de extrato de pau-pra-tudo, enquanto células K-562 foram tratadas com 10 μg/ml de extrato de agoniada e com 1 μg/ml do extrato de guaçatonga, por 48 horas, a 37 ºC, em atmosfera úmida com tensão de 5% de CO_2. Após incubação, seus atributos referentes ao volume/tamanho (*FSC*) e complexidade interna (*SSC*) foram analisados em um citômetro de fluxo FACS Calibur, conforme descrito na seção de Material e Métodos, cujos dados obtidos para três experimentos independentes compõem a Tabela 2.

Tabela 2. INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE PAU-PRA-TUDO, AGONIADA E GUAÇATONGA SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS LEUCÊMICAS, AVALIADA POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Exp.	HL- 60				K-562					
	Controle (M1)		***R. sellowii*** 100 μg/mL **(M2)**		**Controle (M1)**		***H. lancifolius*** 10 μg/mL **(M2)**		***C. sylvestris*** 1 μg/mL **(M2)**	
	FSC	*SSC*	*FSC*	*SSC*	*FSC*	*SSC*	*FSC*	*SSC*	*FSC*	*SSC*
1	424,41	610,89	490,67	607,24	411,26	547,53	385,56	553,59	370,11	565,39
2	713,45	728,52	808,90	743,54	820,78	455,85	NR	NR	807,00	459,30
3	809,40	712,79	930,52	706,91	794,98	680,29	774,60	709,13	756,55	689,42

Cada valor representa a média geométrica (M) do volume das linhagens celulares, obtida por citometria de fluxo, de três experimentos independentes, após exposição por 48 h, a 37 ˚C, aos extratos indicados. NR: não realizado. *FSC*: tamanho/volume celular; *SSC*: complexidade celular interna.

Para a linhagem HL-60, a exposição ao extrato de pau-pra-tudo levou ao aumento do volume das células, evidenciado não só pelo aumento da média geométrica dos picos (M), mas também graficamente, ao se observar o

deslocamento sofrido pelas células tratadas para a direita dos histogramas (Figura 13-A). Entretanto, este tratamento não alterou sua complexidade interna, cujas curvas ilustradas nos histogramas na mesma figura (B) aparecem sobrepostas.

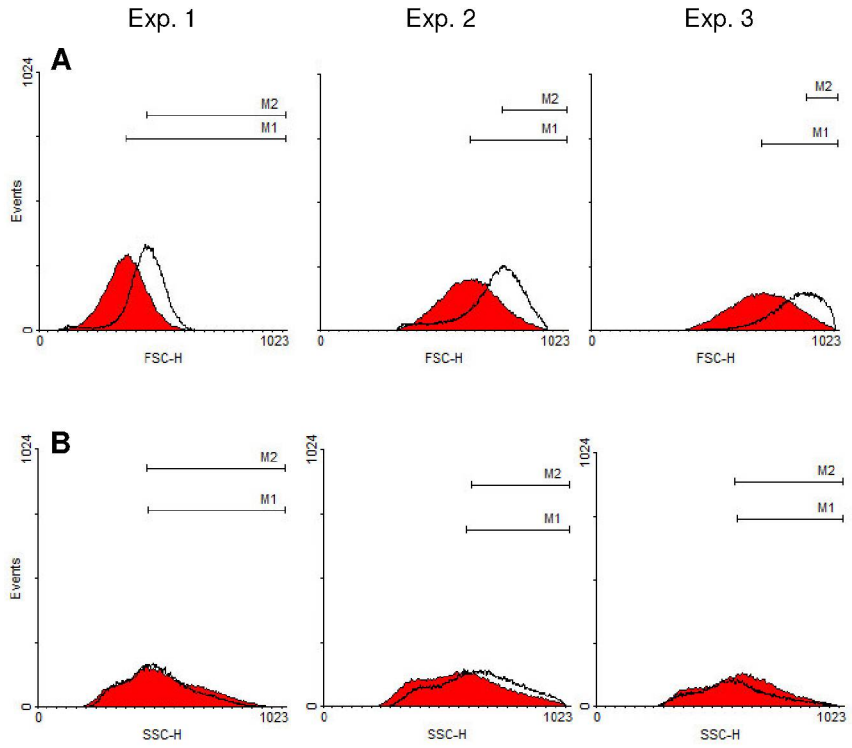


Figura 13. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a morfologia de células HL-60. Células HL-60 foram tratadas por 48 h, a 37 ˚C, com 100 µg/ml de extrato de pau-pra-tudo e seu tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC-B) comparados com células não-tratadas (vermelho), observados em histogramas (preto) obtidos em um citômetro de fluxo FACS Calibur, onde um mínimo de 10^4 eventos, obtidos de três experimentos independentes (Exp.) foram analisados. M1 e M2 representam a média geométrica dos picos relativos às populações controle e tratada, respectivamente.

Em contraste, para as células K-562, tanto a exposição ao extrato de guaçatonga (Figura 14) como ao de agoniada (Figura 15) promoveram diminuição do tamanho celular, com praticamente nenhuma alteração de sua complexidade interna, corroborando com as observações citomorfológicas descritas.

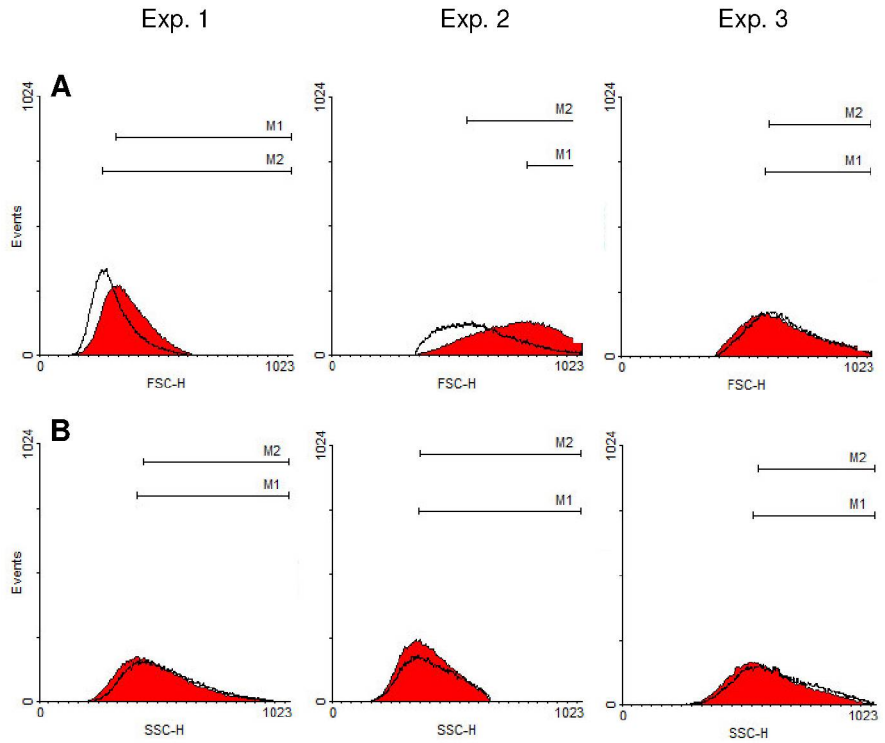


Figura 14. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a morfologia de células K-562. Células K-562 foram tratadas por 48 h, a 37 ˚C, com 1 µg/mL de extrato de guaçatonga e seu tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC) comparados com células não-tratadas (vermelho), observados em histogramas (preto) obtidos em um citômetro de fluxo FACS Calibur, onde um mínimo de 10^4 eventos, obtidos de três experimentos independentes (Exp.) foram analisados. M1 e M2 representam a média geométrica dos picos relativos às populações controle e tratada, respectivamente.

4.1.3 Ensaios de diferenciação/maturação celular

O conjunto de experimentos realizados e os resultados obtidos indicaram que os extratos estudados têm influência, de fato, na proliferação celular das linhagens leucêmicas incluídas neste trabalho e que as mesmas mantêm-se funcionalmente viáveis, confirmada pela capacidade de gerar colônias *in vitro* quando devidamente estimuladas.

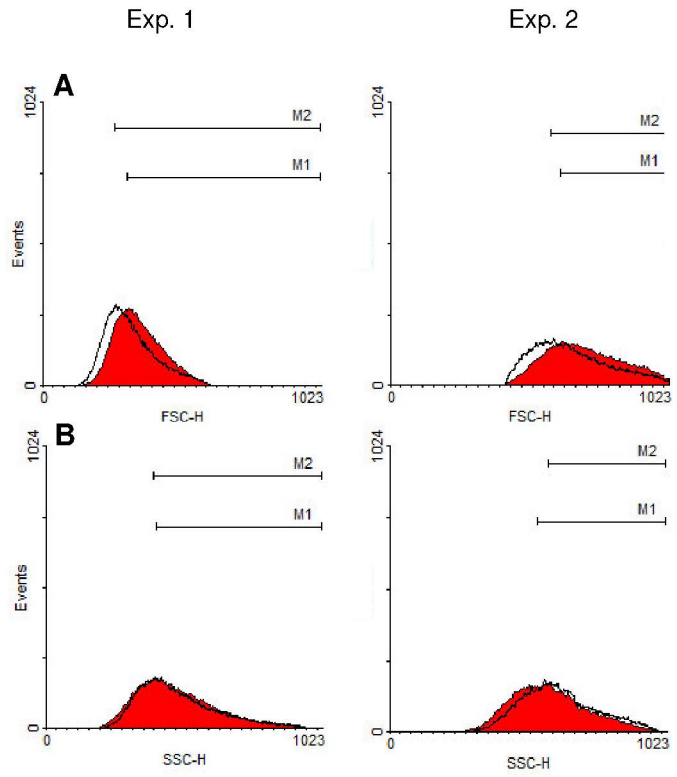


Figura 15. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* na morfologia de células K562. Células K562 foram tratadas por 48 h, a 37 °C, com 10 µg/mL de extrato de agoniada e seu tamanho (FSC-A) e complexidade interna (SSC-B) comparados com células não-tratadas (vermelho), observados em histogramas (preto) obtidos em um citômetro de fluxo FACS Calibur, onde um mínimo de 10^4 eventos, obtidos de dois experimentos independentes (Exp.) foram analisados. M1 e M2 representam a média geométrica dos picos relativos às populações controle e tratada, respectivamente.

Entretanto, apesar de que pequenas alterações relacionadas ao volume celular foram observadas nos ensaios por citometria de fluxo, na análise morfológica dessas populações em citocentrifugados corados observou-se manutenção do aspecto morfológico semelhante ao do inóculo inicial, independente do tratamento com os extratos, sugerindo que os mesmos não têm a habilidade de induzir diferenciação/maturação nessas populações, ou seja, que estimulem essas células a estágios maturacionais mais avançados, que possam ser morfologicamente reconhecidos.

É importante lembrar que a diferenciação celular constitui-se de um mecanismo complexo que envolve a ação seletiva de genes, resultando no aparecimento de células fenotipicamente diferentes, com características de células maduras funcionais *in vivo,* a partir de um precursor genotipicamente comum (Freshney, 2000). Neste contexto, células HL-60, na presença de

dimetilsulfóxido (Collins *et al.*, 1978), ácido retinóico (Breitman *et al.*, 1980) ou actinomicina D (Collins *et al.*, 1980), adquirem a capacidade de se diferenciar em células da linhagem granulocítica.

Células K-562, por sua vez, possuem muitas características de precursores eritróides e expressam proteínas presentes em eritrócitos humanos, incluindo a espectrina e a glicoforina A (Gahmberg *et al.*, 1979; Yurchenco e Furthmayr, 1980). Estimuladas com hemina, butirato ou timidina, produzem as hemoglobinas dos tipos fetal e embrionária (Benz *et al.*, 1980; Rutherford *et al.*, 1979). Já a linhagem Daudi, quando cultivada na presença de teofilina, sofre diferenciação em plasmócitos produtores de imunoglobulinas (Sandlund *et al.*, 1993).

Baseando-se nessas propriedades e com a finalidade de se observar mais detalhamente essa indicação de manutenção de características de células semelhantes ao inóculo inicial, uma nova série de experimentos utilizando essas linhagens em suspensão foi realizada, usando-se em paralelo agentes indutores de diferenciação para cada uma das linhagens, como o DMSO, a hemina e a teofilina como controle dos procedimentos.

Os resultados mostraram que, de fato, tratamento de células HL-60 com o extrato de pau-pra-tudo (100 μg/ml) não foi capaz de induzir a diferenciação/maturação destas células em nenhum tipo celular pertencente à linhagem granulocítica, em contraste com a população tratada com DMSO, cujas características histoquímicas de células pertencentes à linhagem mielóide estão ilustradas na Figura 16. Após coloração com Negro de Sudão B, observou-se a presença de grânulos lipofílicos no citoplasma da maioria das células tratadas em comparação à clássica morfologia de blastos da população controle.

De forma semelhante, os extratos de agoniada (1, 10 e 100 μg/ml) e de guaçatonga (0,1 e 1μg/ml) não foram capazes de induzir diferenciação eritróide em células K-562, como observado para as tratadas com cloreto de hemina (3 mM), onde a presença de hemoglobina, característica exclusiva de células eritróides, foi revelada após coloração com benzidina (Figura 17).

Resultados semelhantes foram observados para as células Daudi quando expostas aos extratos de pau-pra-tudo (0,1- 10 μg/ml), agoniada (0,1- 100 μg/ml), guaçatonga (1 μg/ml) e escada-de-macaco (1 μg/ml), onde somente o tratamento com teofilina (7 mM) promoveu sua diferenciação em plasmócitos (Figura 18).

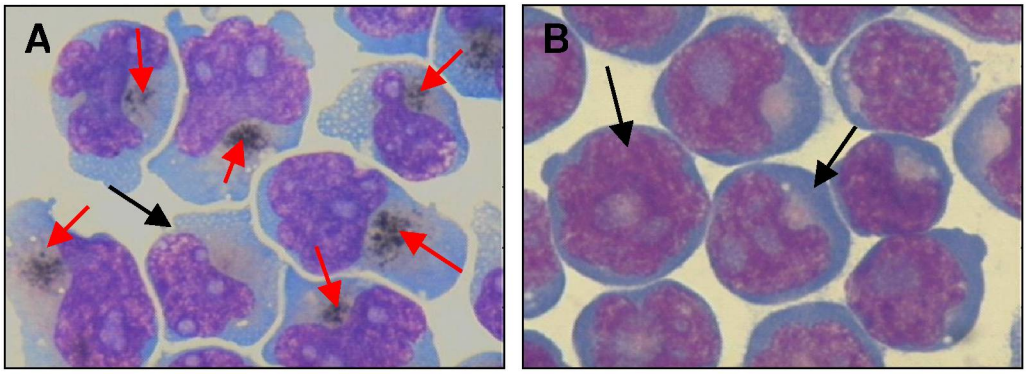


Figura 16. Ação do dimetilsulfóxido sobre células HL-60. Células HL-60 foram cultivadas na presença de dimetilsulfóxido (1,25 %) por 4 dias, a 37 °C e 10% de CO_2 (A). Citocentrifugados corados com Negro de Sudão B e contra-corados com MGG demonstraram a presença de grânulos lipofílicos característicos dispersos no citoplasma da maioria das células (setas vermelhas), indicando sua diferenciação granulocítica, em meio a blastos indiferenciados (setas negras), abundantes na população controle (B).

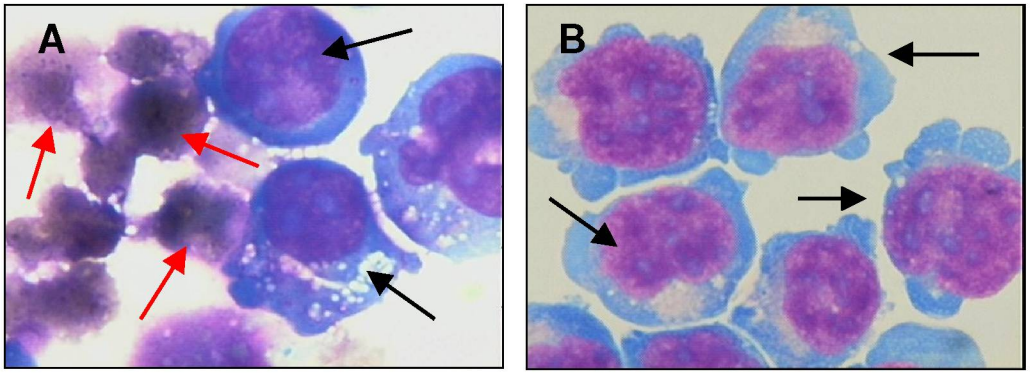


Figura 17. Ação da hemina sobre células K-562. Células K-562 foram cultivadas na presença de cloreto de hemina (3 mM) por 4 dias, a 37 °C e 10% de CO_2 (A). Citocentrifugados corados com Benzidina e contra-corados com MGG demonstraram a presença de células eritróides, caracterizadas pela presença de pigmento marrom da hemoglobina no citoplasma das células (setas vermelhas), indicando sua diferenciação eritróide, em meio a blastos indiferenciados (setas negras), abundantes na população tratada com os extratos (B).

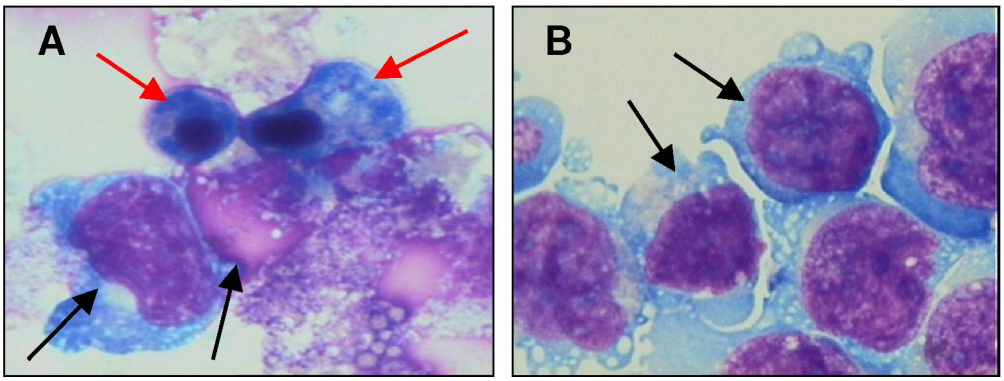


Figura 18. Ação da teofilina sobre células Daudi. Células Daudi foram cultivadas na presença de teofilina (7 mM) por 4 dias, a 37 °C e 10% de CO_2 (A). Citocentrifugados corados com MGG demonstraram a presença de células com morfologia característica de plasmócitos (setas vermelhas), com cromatina condensada em um núcleo excêntrico, circundado por citoplasma intensamente basófilo, que se desenvolveram em meio a blastos indiferenciados (setas negras), abundantes na população tratada com os extratos (B).

Coletivamente esses resultados confirmaram que nenhum dos extratos estudados foi capaz de modificar a morfologia celular do inóculo inicial apresentado pelas linhagens leucêmicas selecionadas para este trabalho.

4.1.4 Avaliação de apoptose por citometria de fluxo

Interessante se faz ressaltar que, para as células das linhagens mielóides mantidas em suspensão, ao lado de poucas figuras de mitose, algumas células apresentaram características apoptóticas, particularmente com relação à condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, como ilustrado para as células HL-60 na Figura 19, após exposição ao extrato de pau-pra-tudo. Esta observação nos levou a investigar se os extratos não estariam interferindo no metabolismo dessas células a ponto de induzi-las a sofrer apoptose.

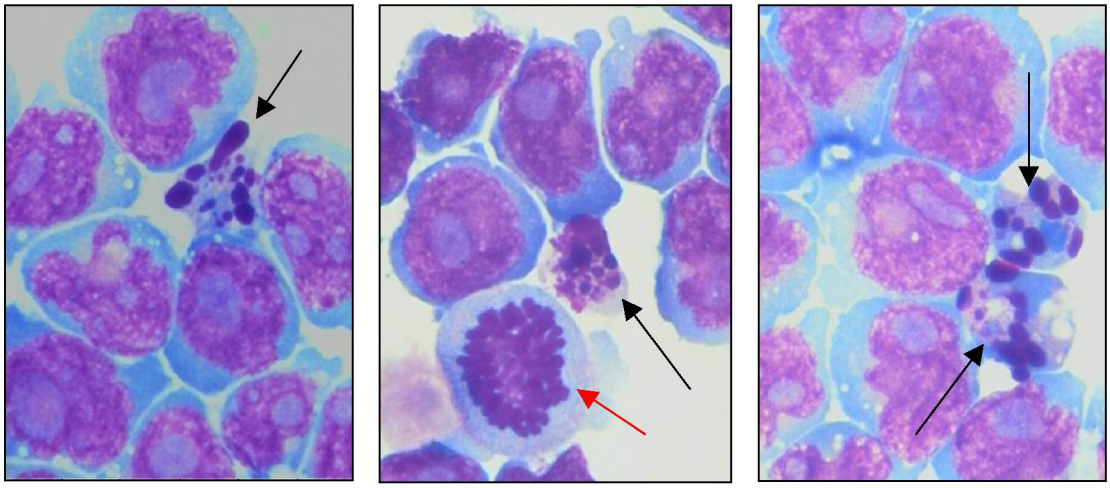


Figura 19. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a morfologia de células HL-60. Citocentrifugados de células HL-60 tratadas com extrato de pau-pra-tudo por 48 horas, a 37 ºC, corados com May-Grünwald-Giemsa revelaram a presença de figuras de mitose (seta vermelha) e células com aspecto apoptótico (setas pretas) (x1000).

Para tanto, células tratadas com os extratos por 48 horas foram marcadas com a proteína anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC) e com o corante 7-AAD e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo.

Essas duas substâncias foram usadas porque permitem analisar, respectivamente, os fenômenos de apoptose e de necrose numa população em

estudo simultaneamente. Isso está relacionado ao fato de que a anexina V tem elevada afinidade pela fosfatidilserina presente na porção interna da membrana citoplasmática de células íntegras. Considerando que a externalização da fosfatidilserina ocorre nos estágios precoces da apoptose, a marcação das células com anexina V-FITC poderia identificar o fenômeno da apoptose mais precocemente do que ensaios baseados em alterações nucleares, como a fragmentação do DNA, por exemplo (Koopman *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995). Assim, a marcação com anexina V-FITC precede a perda da integridade da membrana que acompanha os estágios mais precoces de morte celular, resultando em apoptose e/ou necrose.

Já o 7-AAD é um corante que se intercala entre as bases guanidina e citosina do DNA, podendo ser utilizado para exclusão de células não viáveis nos ensaios que utilizam a citometria de fluxo. O uso simultâneo desses agentes é possível pela ausência de sobreposição espectral entre as emissões fluorescentes do 7-AAD e do FITC, pois este emite fluorescência em 513-530 nm (Vermes *et al.*, 1995), sendo detectada no canal FL1-H dos citômetros, enquanto o 7-AAD emite fluorescência em 650 nm, na faixa vermelho do espectro (Cowden e Curtis, 1981; Schmid *et al.*, 1992; Zelenin *et al.*, 1984), sendo detectado no canal FL3-H.

A Figura 20 mostra os dados, obtidos por citometria de fluxo, de três experimentos independentes, onde se observa, em gráficos de pontos, a distribuição de células HL-60 após 48 horas de exposição ao extrato de pau-pra-tudo a 100 μg/ml e, em seguida, marcadas com anexina V-FITC e 7-AAD.

Para os três experimentos realizados, foi possível observar semelhança entre o padrão apresentado pelas células não tratadas (controle) com o daquelas expostas ao extrato, tanto com relação a apoptose quanto à necrose. Ou seja, a porcentagem de células tratadas com o extrato que estão em apoptose ou em necrose é muito semelhante à das células pertencentes à população controle em pelo menos dois dos experimentos realizados.

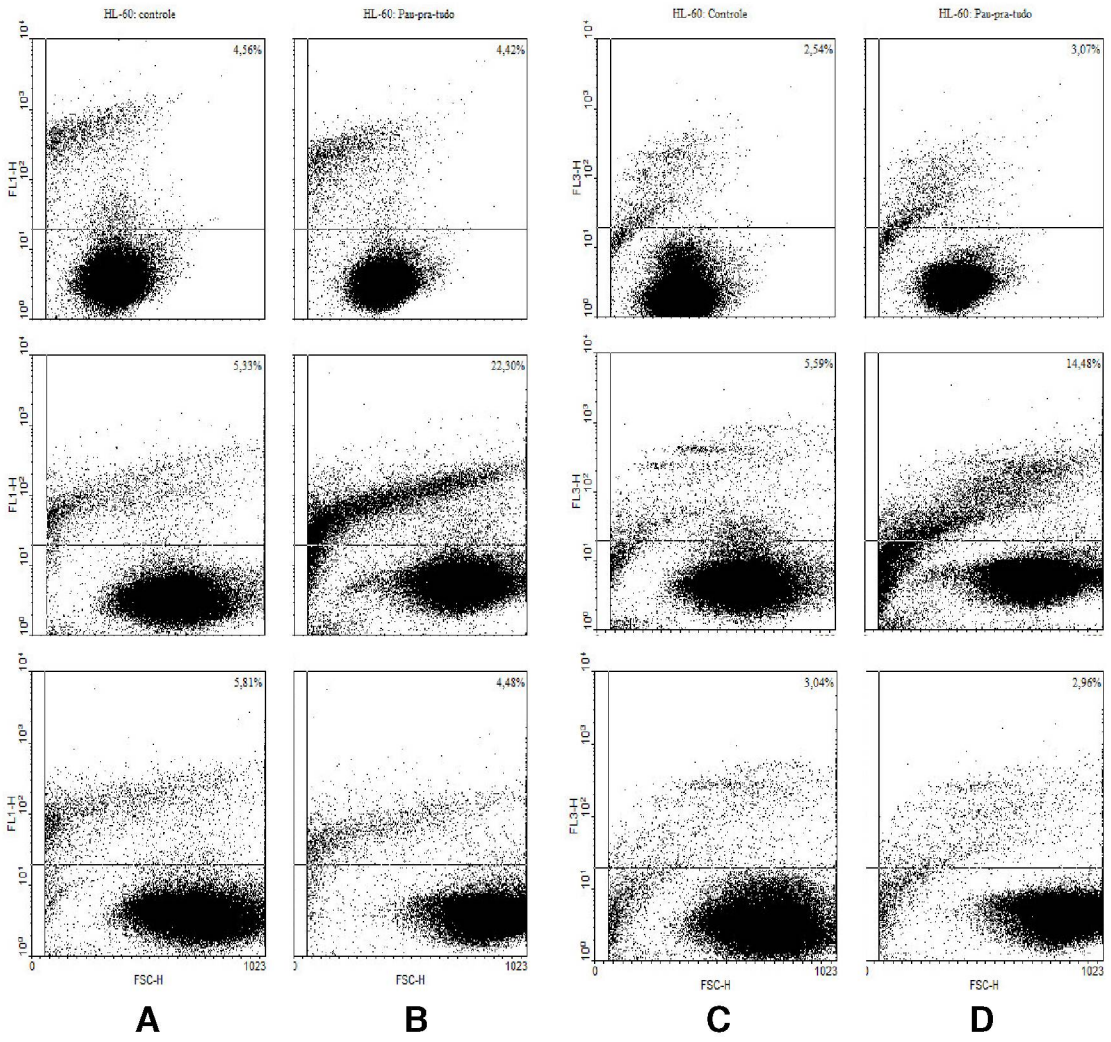


Figura 20. Extrato de *Rauvolfia sellowii* e células HL-60: apoptose ou necrose? Células HL-60 foram tratadas com 100 µg/ml do extrato de pau-pra-tudo por 48 horas, a 37 °C e, em seguida, marcadas simultaneamente com anexina V-FITC (FL-1) e 7-AAD (FL-3), e analisadas por citometria de fluxo. Os valores nos quadrantes superiores indicam a porcentagem de células em apoptose (A e B) ou em necrose (C e D). (A e C) Controle (células não tratadas); (B e D) Células tratadas. FSC-H: corresponde a distribuição celular por volume. Cada ponto denota uma célula.

O mesmo padrão de comportamento foi observado nos três experimentos realizados com as células K-562, porém tratadas com os extratos de agoniada (10 µg/ml) e de guaçatonga (1 µg/ml), conforme ilustram os gráficos das Figuras 21 e 22.

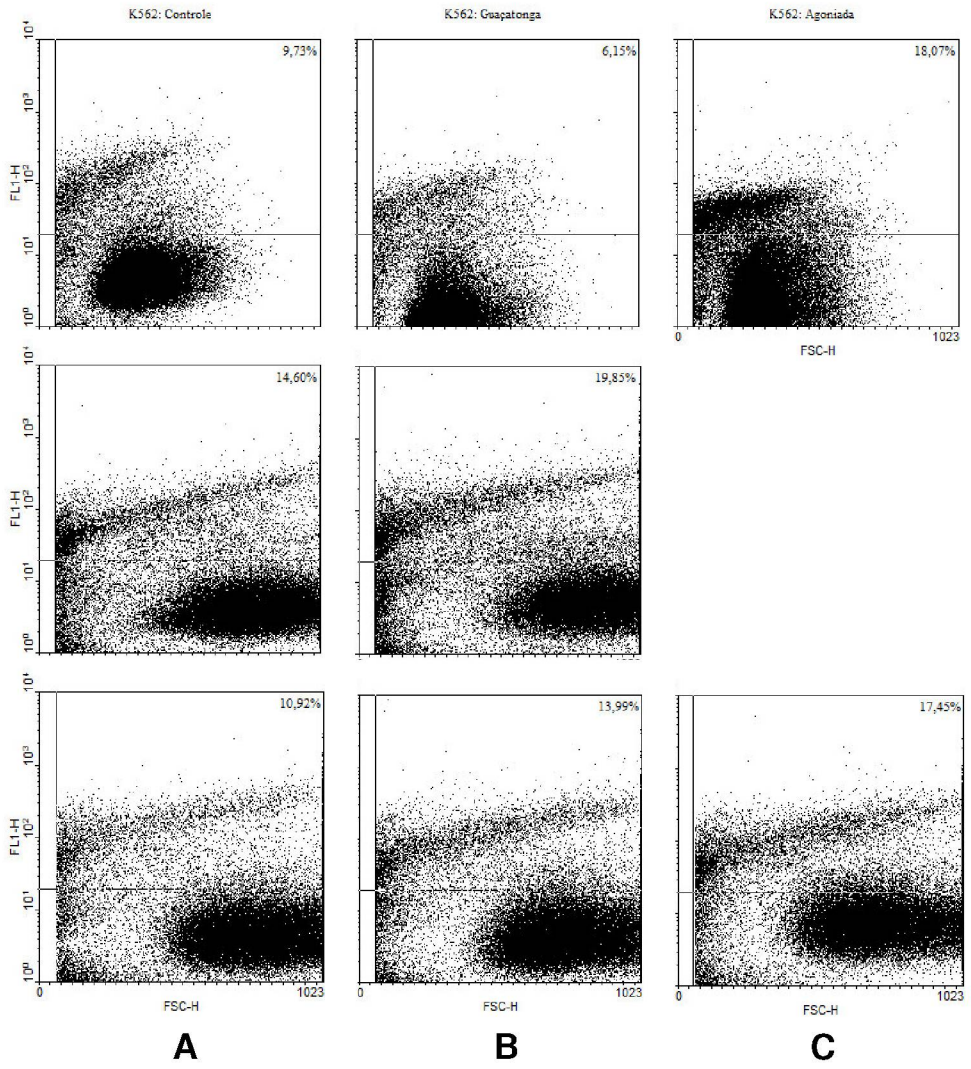


Figura 21. Extrato de *C. sylvestris* e *H. lancifolius* e células K-562: apoptose? Células K-562 foram tratadas com 1 e 10 µg/ml, por 48 horas, a 37 ºC, dos extratos de *Casearia sylvestris* (B) ou de *Himatanthus lancifolius* (C), respectivamente, marcadas com anexina V-FITC (FL1-H) e analisadas por citometria de fluxo. Os valores nos quadrantes superiores indicam a porcentagem de células em apoptose. (A) Controle (células não tratadas). FSC-H: corresponde a distribuição celular por volume. Cada ponto denota uma célula.

Vários estudos envolvendo extratos de diferentes plantas relatam a morte celular programada como o mecanismo responsável pela inibição da proliferação de linhagens cancerosas de diferentes origens (Amirghofran *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2007; Jimenez-Medina *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2005; Majewska *et al.*, 2006;

Sheng *et al.*, 1998; Won *et al.*, 2006), onde pelo menos 30% das células encontram-se em apoptose.

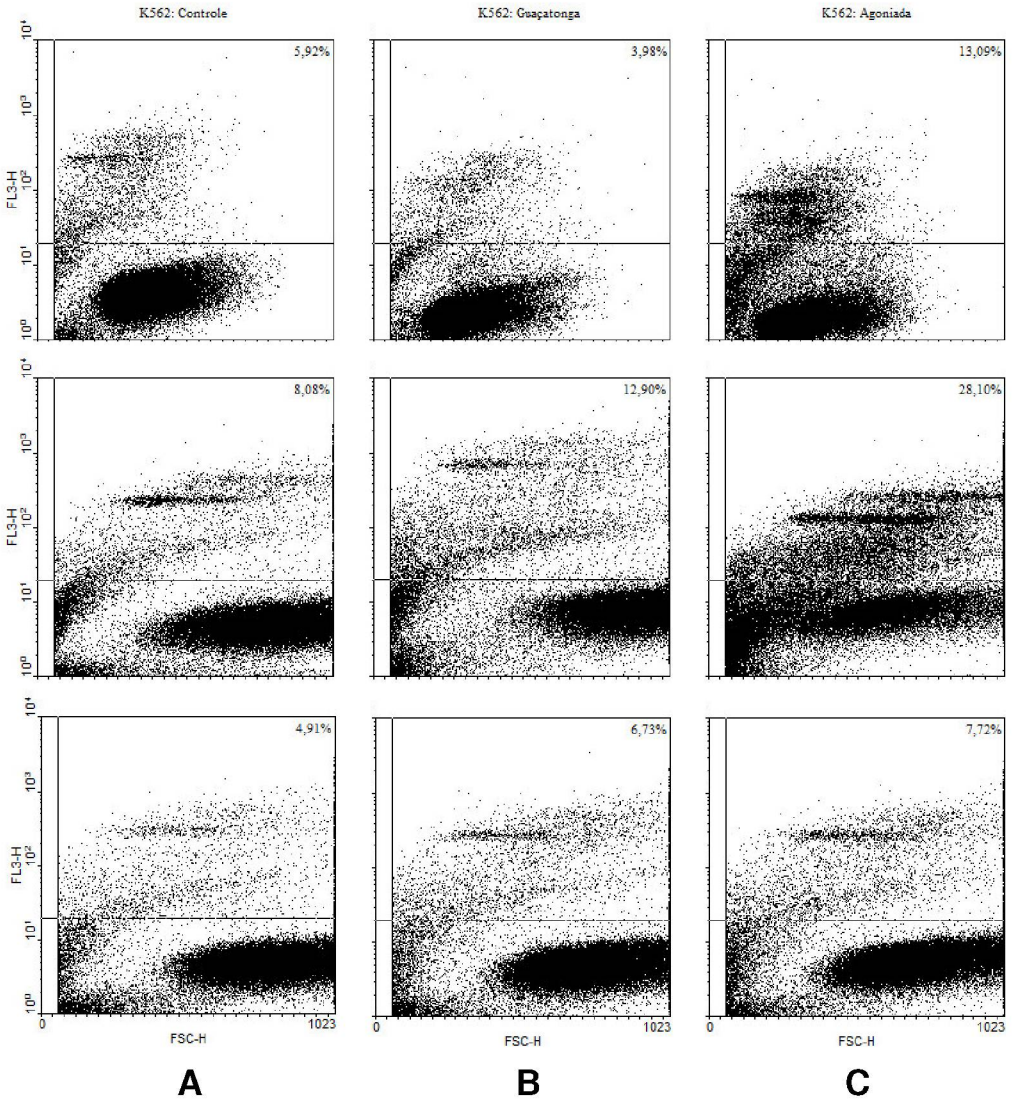


Figura 22. Extrato de *C. sylvestris* e *H. lancifolius* e células K-562: necrose? Células K-562 foram tratadas com 1 µg/ml e 10 µg/ml, por 48 horas, a 37 ºC, com os extratos de *Casearia sylvestris* (B) ou de *Himatanthus lancifolius* (C), respectivamente, marcadas com 7-AAD (FL3-H) e analisadas por citometria de fluxo. Os valores nos quadrantes superiores indicam a porcentagem de células em necrose. (A) Controle (células não tratadas). FSC-H: corresponde a distribuição celular por volume. Cada ponto denota uma célula.

Esta série de experimentos demonstrou claramente que os extratos de pau-pra-tudo, agoniada e guaçatonga não induzem as linhagens mielóides estudadas e, por apresentarem comportamento similar, também as linfóides, ao processo de apoptose. Muito pelo contrário, o fato de elas não estarem também

sofrendo processo de necrose, evidenciado pela presença de poucas células coradas pelo 7-AAD, confirma os dados anteriormente descritos com relação à baixa toxicidade desses extratos sobre as células HL-60 e K-562. Entretanto, com esses experimentos, a ação tóxica do extrato de agoniada ficou melhor demonstrada, confirmando alguns dos dados obtidos com os experimentos de proliferação.

Os resultados dos ensaios realizados com linhagens leucêmicas comerciais indicaram que os extratos das plantas medicinais utilizadas neste trabalho são tóxicos somente em doses elevadas; em menor concentração, inibem a proliferação celular, observado tanto para condições experimentais que as mantêm em suspensão, como também naquelas que promovem a formação de colônias *in vitro;* ainda, que a morfologia inicial foi mantida em todas as condições experimentais utilizadas, comprovada por meio da presença de formas blásticas observadas durante análise morfológica de citocentrifugados e de provas citoquímicas pertinentes, ao lado da ausência de indicadores de apoptose. Este conjunto de dados nos leva a discutir sobre a utilidade desses extratos na expansão do número de células hematopoiéticas primitivas normais.

Há pelo menos duas décadas, vários estudos têm sido propostos com o objetivo de expandir as células hematopoiéticas primitivas de pacientes sem comprometimento medular em condições sintéticas (denominadas *ex vivo*), ou seja, aumentar o seu número sem, no entanto, promover-lhe diferenciação, favorecendo transplantes de medula óssea em pacientes que não possuem doadores compatíveis, ou de sangue de cordão umbilical, pelo pequeno número de progenitores que possuem. Por exemplo, a literatura relata que o tratamento de progenitores $CD34^+$ provenientes de sangue de cordão umbilical com a substância FRIL, extraída dos grãos de *Phaseolus vulgaris* (Kollet *et al.*, 2000) ou de *Dolichos lablab* (Xie e Pei, 2003; Colucci *et al.*, 1999), foi capaz de mantê-las indiferenciadas por mais de 30 dias, enquanto que os ensaios clonogênicos demonstraram sua capacidade de gerar colônias filhas, também indiferenciadas (Kollet *et al.*, 2000), confirmando atividade não só expansora da população, como também inibidora da diferenciação celular.

Dos pacientes que precisam de um transplante de medula óssea, independente de sua condição patológica, somente cerca de 25% têm doadores compatíveis. O sucesso de um transplante desta natureza está no número de células hematopoiéticas primitivas capazes de migrar para a medula óssea do

receptor, nela encontrar condições que permitam o desenvolvimento de todas as suas habilidades funcionais, restaurando o sistema linfo-hematopoiético do paciente em poucas semanas.

Células hematopoiéticas primitivas são dotadas de capacidades biológicas distintas, que envolvem amplo espectro de opções funcionais como (a) quiescência (implicando sua sobrevivência em G_0, no ciclo celular), (b) auto-renovação (proliferação com manutenção da condição de indiferenciada), (c) capacidade de gerar descendentes mais maduros, (d) habilidade para amadurecer, originando células terminais funcionais de diferentes linhagens, (e) transdiferenciação e (f) plasticidade para originar células de outros tecidos quando em condições apropriadas (Kondo *et al.*, 2003). Embora esta última opção só tenha sido demonstrada em modelos *in vitro*, ainda se desconhece como essas várias funções são excercidas em uma mesma célula ou mesmo se elas acontecem simultaneamente ou em grupos.

É importante ressaltar que a proliferação celular descontrolada é característica do câncer, e que células tumorais exibem mutações adquiridas nos genes que controlam diretamente seu ciclo celular (Sherr, 1996). Portanto, investigações que incluam observações referentes à influência desses extratos sobre o ciclo celular destas células se tornam fundamentais, uma vez que os resultados são sugestivos de que esses extratos possam atuar como agentes anti-tumorais dependentes do ciclo celular, como já descrito para outros extratos (Jimenez-Medina *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Majewska *et al.*, 2006) e compostos isolados de plantas medicinais (Lee *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2006; Mata-Greenwood *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2004).

4.2 PROGENITORES DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS

Um dos maiores problemas com agentes antiproliferativos é o seu efeito tóxico sobre células saudáveis. O fato de uma substância ou extrato ser citostático pode ser benéfico clinicamente, no sentido de que ele inibiria a proliferação celular com concomitante diminuição dos efeitos tóxicos para o paciente.

Os ensaios realizados com linhagens leucêmicas, cujos resultados foram demonstrados e discutidos nos itens anteriores, demonstraram claramente que os

extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco exercem efeito citostático, ou seja, impedem a reprodução celular.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico dessas plantas sobre a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos de pacientes normais, ou sem comprometimento medular, e de portadores de distúrbios neoplásicos hematopoiéticos. Para tanto, utilizou-se a metodologia dos ensaios clonogênicos, sistemas de cultivo que simulam a hematopoiese por permitirem que, em condições apropriadas, células hematopoiéticas progenitoras dêem origem a colônias características, compostas por descendentes morfologica e funcionalmente distintos, que incluem unidades formadoras de colônia comprometidas com a linhagem de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), com a linhagem eritróide (BFU-E/CFU-E) e, quando pertinente, com a megacariocítica (CFU-MK) (Malerba *et al.*, 2004; Parent-Massin, 2001).

Assim, neste segundo momento, serão relatados os resultados obtidos quando células mononucleares (MNC) obtidas de amostras de medula óssea (M.O.) de pacientes portadores de diferentes tipos de leucemias foram expostas a doses crescentes desses extratos em condições experimentais ideais para o desenvolvimento de colônias hematopoiéticas mielóides. Os doadores que concordaram em participar deste estudo, assim como seus dados clínico-laboratoriais, estão listados na Tabela 3.

TABELA 3. DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES DOADORES DAS AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA.

Paciente/(Patologia*)	Idade/ Sexo	Hb (g/dL)	Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	Plaquetas ($x10^3/mm^3$)
ILS / (LLA-T)	46/M	8,7	3,30	14,8	-
MKS / (LLA-T)	8/F	11,2	4,98	13,9	362
AF / (LMA)	39/F	12,0	3,97	4,9	286
SMO / (LMA)	45/F	9,8	3,30	5,2	134
RCSL / (LMA)	9/F	12,3	4,12	7,1	109
AMWS / (normal)	49/F	13,9	4,20	3,9	230
ACM / (MM)	50/M	7,1	2,39	7,6	61

As amostras de medula óssea, provenientes de pacientes do Hospital Erasto Gaertner, foram processadas no laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Paraná. (*) Classificação FAB/MIC. LLA-T: Leucemia Linfóide Aguda de células T; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; MM: Mieloma Múltiplo.

O grupo constituiu-se de sete pacientes, sendo dois do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com idade variando entre oito e 50 anos (mediana: 45 anos). As amostras foram obtidas por punção da crista ilíaca, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Do total de pacientes, dois foram diagnosticados com Leucemia Aguda Linfocítica do tipo T (LLA), três com Leucemia Aguda Mielóide (LMA), um com Mieloma Múltiplo (MM) e somente um não apresentava comprometimento medular. Dessa forma, três grupos foram formados: LLA, LMA e Normal, sendo este último representado pelo paciente sem envolvimento medular e o portador de MM, por ter este comprometimento da linhagem B.

4.2.1 Efeito dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco sobre progenitores Eritróides e de CFU-GM

Da mesma forma como descrito para as linhagens leucêmicas, MNC obtidos de M.O. foram expostos a doses crescentes (1 - 100 μg/ml) dos extratos preparados de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco, e cultivadas em meio semi-sólido enriquecido com fatores de crescimento e citocinas, por 14-20 dias a 37 ºC, em atmosfera úmida e sob 5% de tensão de CO_2. Após incubação, as colônias formadas por progenitores eritróides e de granulócitos e macrófagos, cujos aspectos morfológicos estão ilustrados nas Figuras 23 e 24, respectivamente, foram enumeradas sob microscópio invertido, usando critérios previamente estabelecidos (Testa, 1985). Devido à demanda reduzida de amostras de medula óssea recebidas, não foi possível analisar estatisticamente os resultados obtidos.

Apesar do pequeno número de amostras para cada grupo, o número de colônias formadas, independente do tipo de progenitor envolvido, foi sempre maior para aqueles grupos envolvidos com neoplasias hematológicas quando comparado com o de doadores normais, aqui e doravante denominado grupo controle. Estes resultados eram de se esperar, uma vez que uma cinética diferenciada das células progenitoras leucêmicas, com desenvolvimento aberrante e descontrolado de funções celulares críticas, como proliferação, diferenciação e morte celular, é característico das leucemias agudas. Assim, há acúmulo de formas imaturas (blastos) na medula óssea, com diminuição da progressão das células tronco neoplásicas a tipos celulares sangüíneos maduros funcionais como conseqüência.

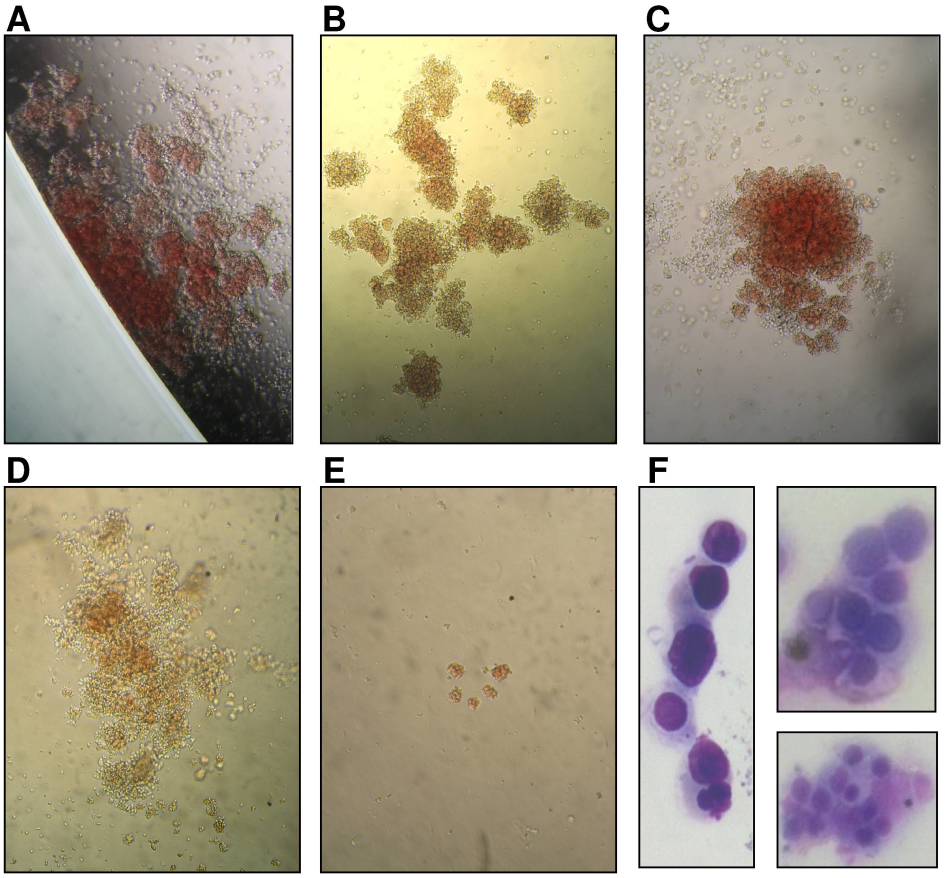


Figura 23. Colônias de progenitores eritróides. Citocentrifugados preparados das células de colônias características de BFU-E (A-D) e de CFU-E (E), que se desenvolveram após 14-20 dias de cultivo em meio semi-sólido contendo fatores de crescimento apropriados além de eritropoietina, corados com May-Grünwald-Giemsa demonstraram a presença de eritroblastos em vários estágios de maturação (F).

O tratamento com o extrato de pau-pra-tudo levou a uma diminuição do número de colônias eritróides dependente da dose, tanto para o grupo controle como para o de portadores de LLA, em contraste com o grupo LMA, onde o extrato pareceu não interferir (Figura 25). Esses perfis se repetiram para as colônias de CFU-GM (Figura 26) e corroboram com alguns dos resultados observados com as linhagens celulares, onde, para as células HL-60 (Figura 2) e K-562 (Figura 3), ambas mielóides, também se observou pouco ação desta planta, em contraste com a linhagem linfóide Daudi, onde o extrato inibiu significativamente a proliferação celular (Figura 5) e a formação de colônias (Figura 9) em praticamente todas as doses avaliadas.

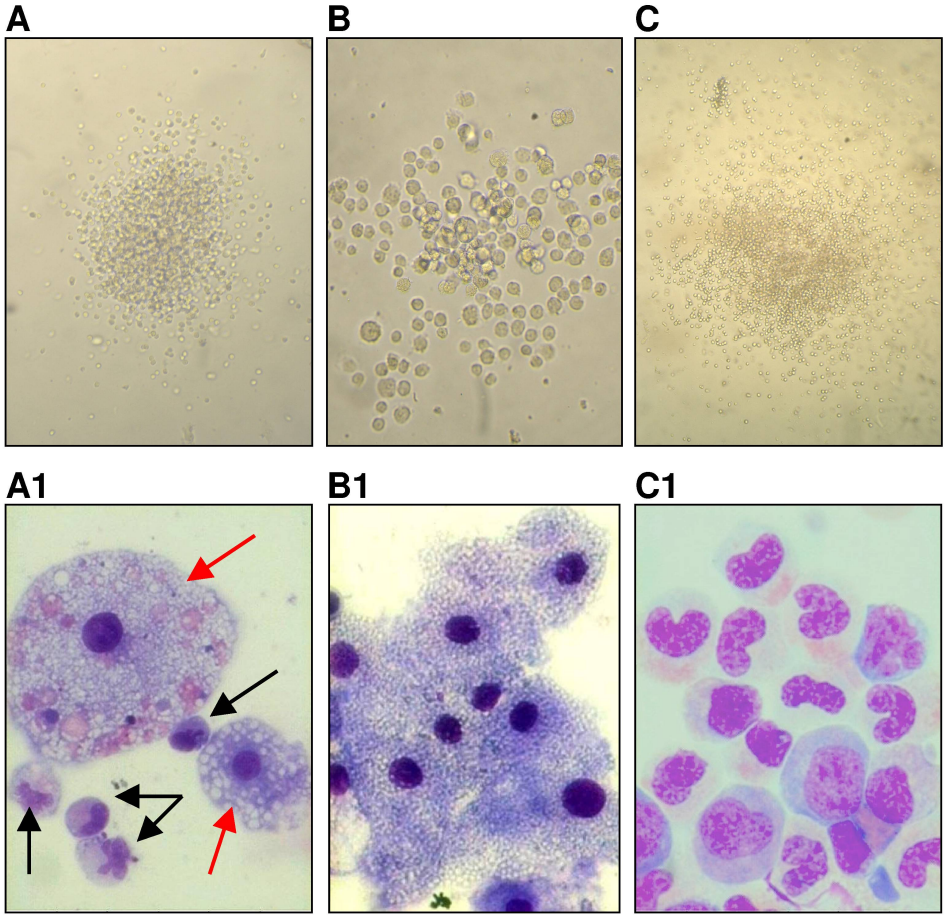


Figura 24. Colônias de progenitores de granulócitos e macrófagos. Citocentrifugados preparados das células de colônias típicas de CFU-GM (A), CFU-M (B) e CFU-G (C), que se desenvolveram após 14 dias de cultivo em meio semi-sólido contendo fatores de crescimento apropriados, corados com May-Grünwald-Giemsa demonstraram a presença de granulócitos em vários estágios de diferenciação (setas negras; painéis A1 e C1) e macrófagos (setas vermelhas; painéis A1 e B1).

Já o extrato de agoniada interferiu de forma mais evidente nas colônias de progenitores eritróides dos grupos controle e LLA (Figura 27), diminuindo o número de ambos, de forma dependente da dose. Relevante é o fato de que este extrato foi inibidor significativo tanto para a formação de colônias eritróides de M.O. de pacientes com neoplasias hematológicas como também para as da linhagem eritroleucêmica K-562 (Figura 7). Da mesma forma, diminuiu a formação de colônias de CFU-GM no grupo LLA (Figura 28), assim como o fez nos ensaios realizados com as linhagens Daudi (Figura 10).

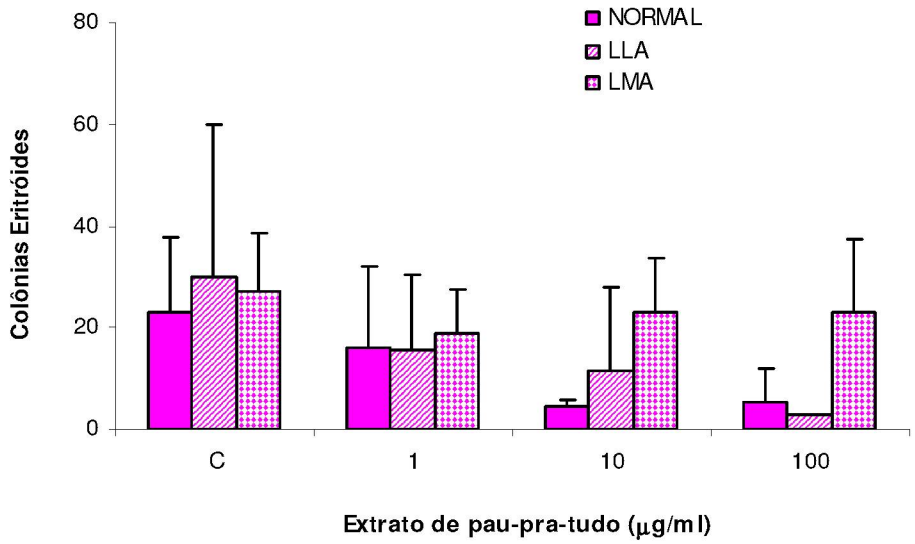


Figura 25. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a formação de colônias eritróides. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de pau-pra-tudo nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas e eritropoietina, e incubados por 14-20 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias eritróides características, que foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias eritróides formadas.

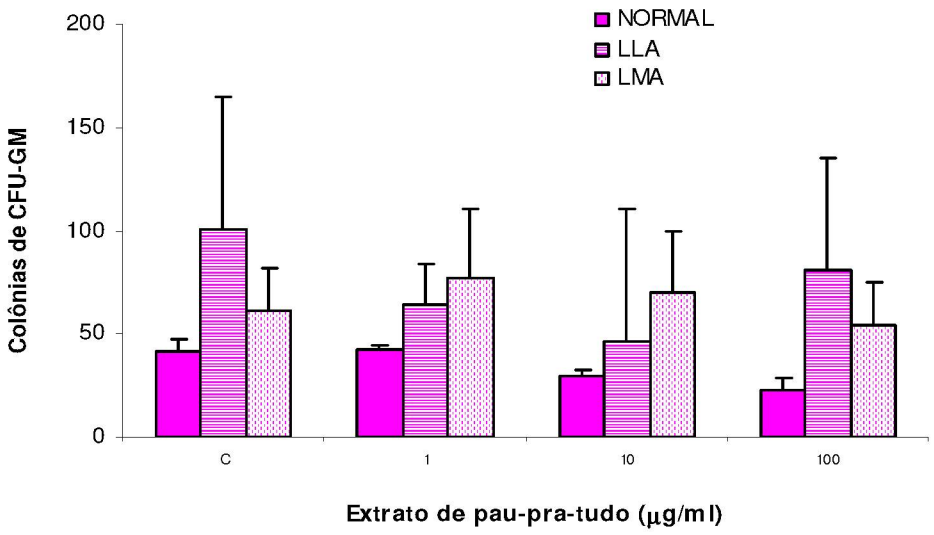


Figura 26. Influência do extrato de *Rauvolfia sellowii* sobre a formação de colônias de CFU-GM. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de pau-pra-tudo nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas, e incubados por 14 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) características, as quais foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou 1EPM do número de colônias formadas.

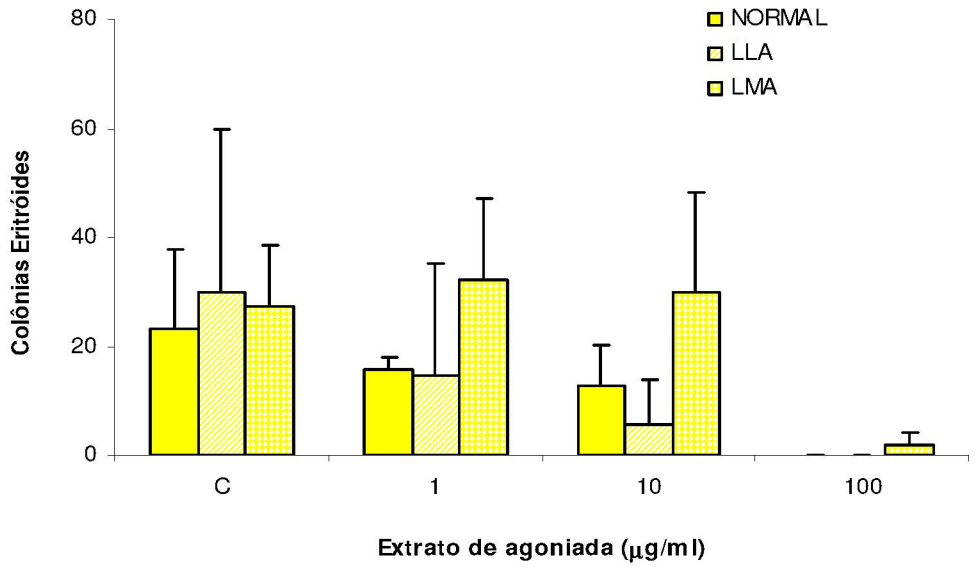


Figura 27. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* sobre a formação de colônias eritróides. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de agoniada nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas e eritropoietina, e incubados por 14-20 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias eritróides características, que foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias eritróides formadas.

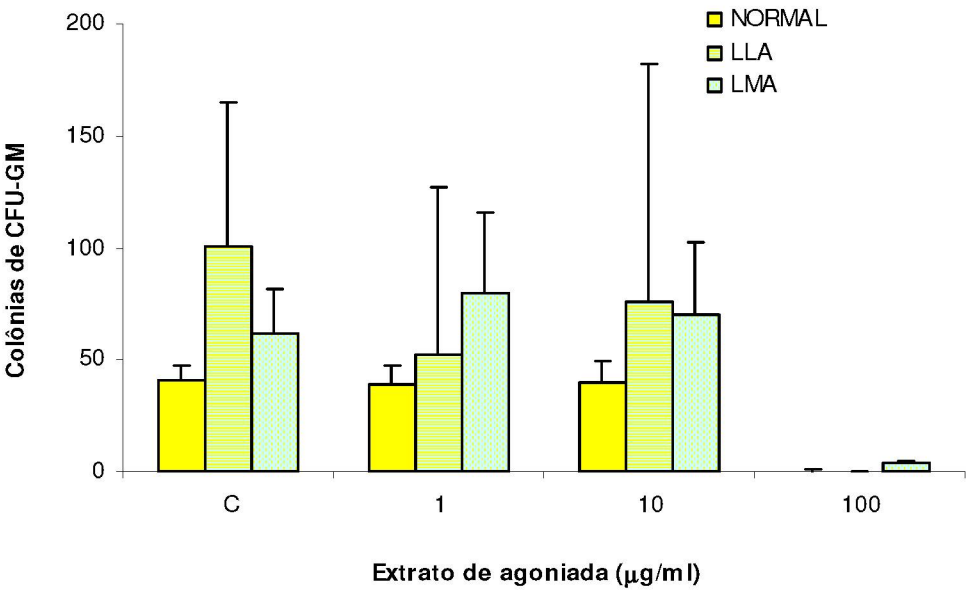


Figura 28. Influência do extrato de *Himatanthus lancifolius* obre a formação de colônias de CFU-GM. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de agoniada, nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas, e incubados por 14 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) características, as quais foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias formadas.

Interessante ainda é o fato de que, a 100 μg/ml, este extrato foi eficiente em reduzir, de forma drástica, não só o número de colônias de progenitores eritróides e de CFU-GM de todos os grupos estudados, como também inibiu a formação de colônias de células Daudi (Figura 10).

Já o extrato de guaçatonga diminuiu a formação do número de colônias de CFU-GM somente do grupo controle (Figura 30), não interferindo na formação de colônias eritróides de todos os grupos estudados (Figuras 29), repetindo a ação pouco pronunciada quando se avaliou seu efeito sobre a formação de colônias de células K-562 (Figura 8).

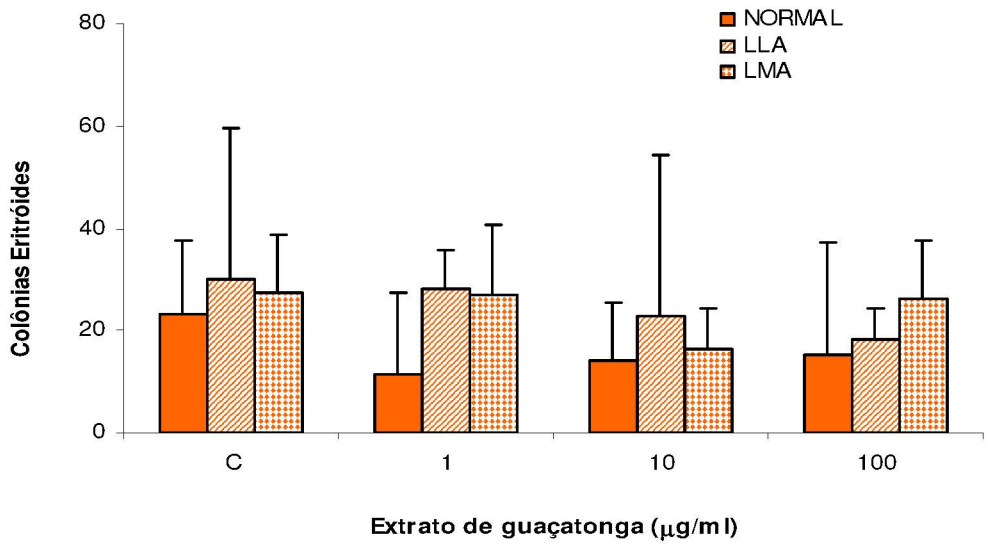


Figura 29. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a formação de colônias eritróides. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de guaçatonga nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas e eritropoietina, e incubados por 14-20 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias eritróides características, que foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias eritróides formadas.

Com o extrato de escada-de-macaco, um perfil diferenciado foi observado, com diminuição de todos os progenitores, independente das doses avaliadas (Figuras 31e 32).

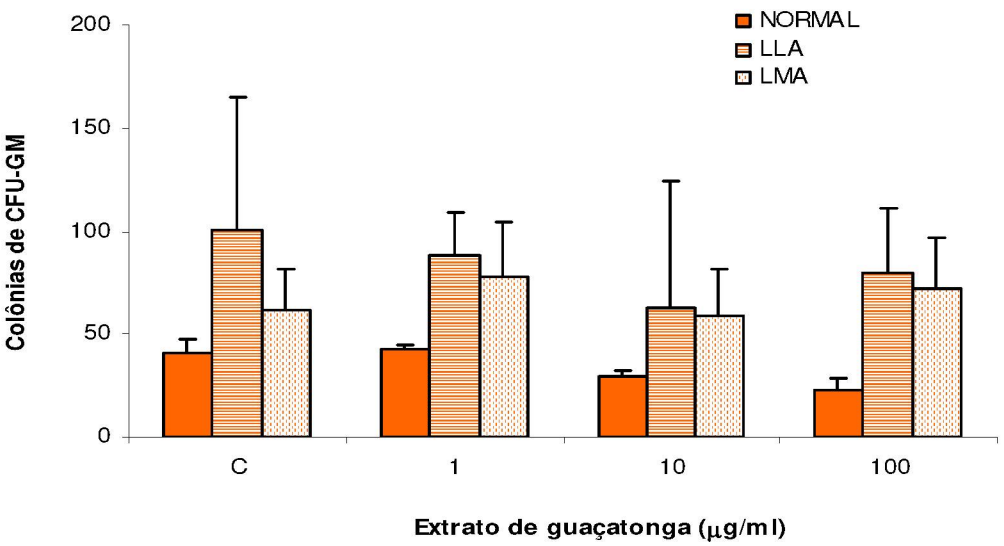


Figura 30. Influência do extrato de *Casearia sylvestris* sobre a formação de colônias de CFU-GM. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de guaçatonga, nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas, e incubados por 14 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) características, as quais foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias formadas.

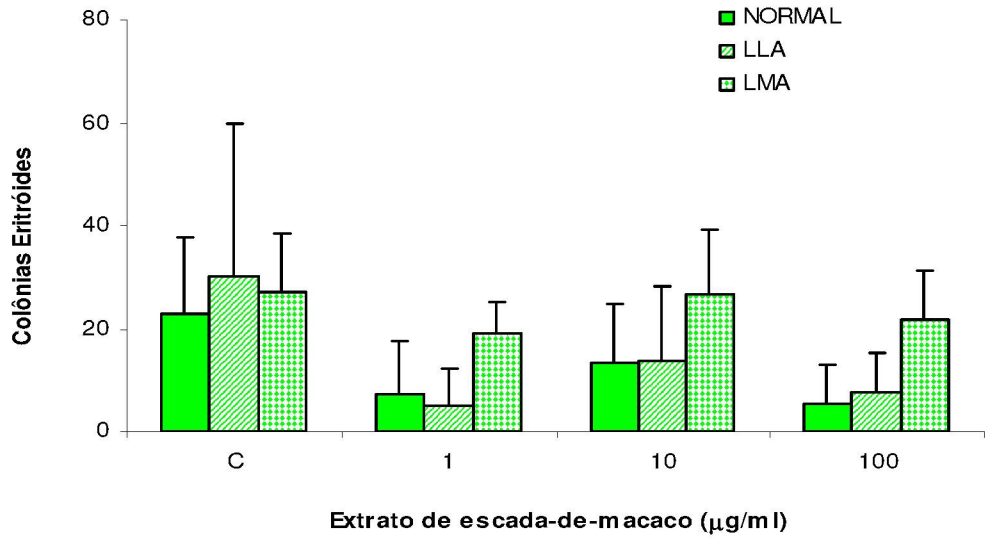


Figura 31. Influência do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre a formação de colônias eritróides. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de escada-de-macaco nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas e eritropoietina, e incubados por 14-20 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias eritróides características, que foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias eritróides formadas.

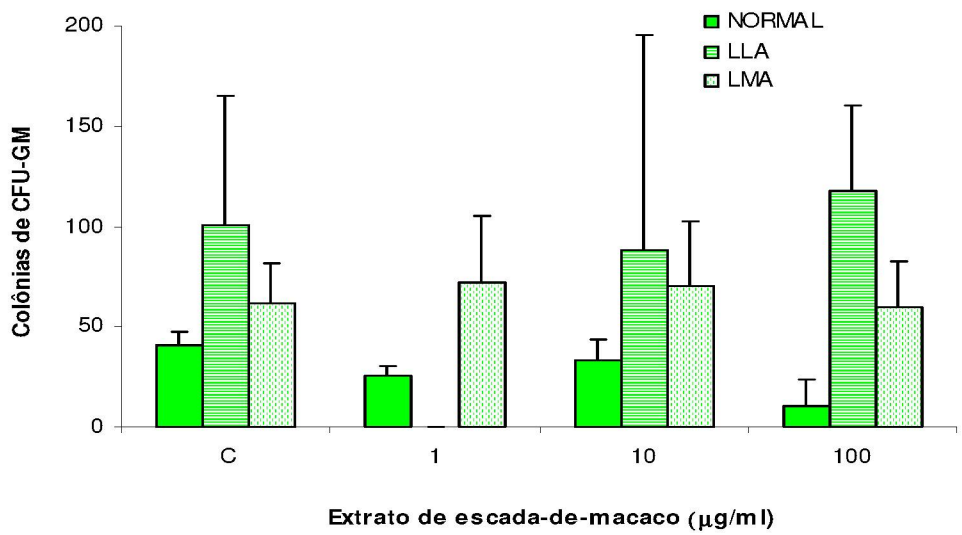


Figura 32. Influência do extrato de *Bauhinia microstachya* sobre a formação de colônias de CFU-GM. Células mononucleares de medula óssea de pacientes sem comprometimento medular (NORMAL), de portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) foram expostas ao extrato de escada-de-macaco, nas concentrações indicadas, em meio semi-sólido enriquecido com citocinas, e incubados por 14 dias a 37°C, 5% de CO_2, originando colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) características, as quais foram enumeradas com auxílio de microscópio invertido. Cada barra representa a média±1DP ou EPM do número de colônias formadas.

Neste momento, é necessário esclarecer que, em função do pequeno número de amostras em cada grupo estudado, nenhuma análise estatística foi efetuada nesta série de experimentos e que as discussões se limitaram a descrever as tendências observadas.

Os resultados obtidos com os ensaios clonogênicos mostraram que os progenitores hematopoiéticos formadores de colônias provenientes de LMA foram, de uma maneira geral, menos sensíveis à ação dos extratos testados, não havendo variação evidente do número de colônias formadas em relação ao grupo de células não tratadas. Em contrapartida, as células progenitoras formadoras de colônias dos pacientes com LLA demonstraram maior sensiblidade aos efeitos dos extratos testados, particularmente pela redução do número de colônias eritróides, na maioria das vezes, de maneira dependente da dose.

Esses resultados eram de certa forma, esperados, pois estão relacionados com a própria condição dessas doenças. Leucemias e linfomas não são doenças hiperproliferativas, como a princípio se pode supor; esses tipos de câncer são fatais não porque suas células malignas dividem-se muito rapidamente, mas

porque elas nunca param de se dividir. Expansão clonal abundante geralmente ocorre como conseqüência de uma aberração cromossomal adquirida, a qual detém as células em um determinado estágio de maturação (Jandl, 1991).

Relevante se faz lembrar que os ensaios clonogênicos usados neste trabalho, pelas substâncias presentes em sua composição, são culturas empregadas para avaliação do sistema mielóide, o qual envolve a produção de todos os elementos figurados do sangue, à exceção de linfócitos.

As LMA são doenças malignas clonais que se originam de uma célula primitiva pluripotente mielóide transformada, onde se tem expansão do clone maligno. O defeito proliferativo pode, então, se expressar nos precursores dos granulócitos, macrófagos, eritrócitos e plaquetas, simultânea ou isoladamente, em contraste com os progenitores de LLA, cujo comprometimento é linfóide.

Portanto, não foi surpresa o fato das células formadoras de colônias desses pacientes, tanto de granulócitos e macrófagos como de eritrócitos, terem se mostrado mais refratárias, ou menos sensíveis, pelo menos nas condições de ensaios propostas, à ação desses extratos, uma vez que nos experientos com as linhagens mielóides HL-60 e K-562 observaram-se efeitos menores quando comparados aos das células de linhagens linfóides.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho fundamentou-se em avaliar a influência dos extratos de *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg) Woodson, *Casearia sylvestris Sw.*, *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg. e *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, conhecidas popularmente como pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco, respectivamente, sobre o comportamento das linhagens celulares leucêmicas humanas HL-60, K-562, Daudi e REH, e de progenitores hematopoéticos normais e de portadores de doenças neoplásicas hematológicas *in vitro.*

Os ensaios realizados com as linhagens leucêmicas, independente de sua origem linfóide ou mielóide, demonstraram claramente que os extratos hidroetanólicos preparados dessas plantas exercem efeito citostático, ou seja, impedem a reprodução celular quando em doses até 100 μg/ml. Entretanto, esta atividade foi particular para cada extrato e dependente da linhagem estudada. Neste sentido, dos extratos investigados, o extrato de escada-de-macaco foi o que apresentou atividade menos pronunciada sobre a proliferação celular das linhagens incluídas neste estudo, em contraste com o de agoniada, o qual demonstrou ter maior habilidade em inibir essa atividade. Além disso, o de agoniada foi aquele que demonstrou maior ação tóxica, agindo de forma significativa sobre a proliferação e o potencial clonogênico de todas as linhagens. As células de origem linfóide demonstraram ser mais sensíveis à ação dos extratos avaliados, em contraste com as células HL-60, bastante resistentes à ação de todos eles.

Não se observou influência dessas plantas sobre a diferenciação/maturação celular dessas mesmas linhagens em nenhum dos experimentos realizados, com manutenção de seu estado morfológico inicial. Ainda, esses extratos, pelo menos com relação à metodologia utilizada, não induzem essas células a sofrer apoptose.

O conjunto de estudos apresentados neste trabalho revelou alguns aspectos interessantes e desconhecidos com relação às atividades biológicas dos extratos de pau-pra-tudo, agoniada, guaçatonga e escada-de-macaco. Embora algumas destas plantas já tenham sido amplamente estudadas, como a guaçatonga, por exemplo, os relatos referentes à sua ação sobre linhagens leucêmicas hematopoiéticas e progenitores de medula óssea são escassos, quando existentes. Por outro lado, como compostos com atividades biológicas

definidas já foram isolados dessas plantas, de particular interesse seria investigar quais corresponderiam aos efeitos aqui relatados para o extrato aquoso.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, particularmente para esclarecer os mecanismos responsáveis pelas atividades biológicas aqui investigadas em níveis celular e molecular, muitos dos resultados apresentados neste estudo são inéditos e constituem uma base rica de dados científicos referentes às atividades farmacológicas dessas plantas, que pode servir como fonte preliminar de informações científicas importantes que estimulam investigações futuras.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abaza, L., T.P. Talorete, P. Yamada, Y. Kurita, M. Zarrouk e H. Isoda. 2007. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71:1306-12.

Ahn, S.H., Y.J. Mun, S.W. Lee, S. Kwak, M.K. Choi, S.K. Baik, Y.M. Kim e W.H. Woo. 2006. *Selaginella tamariscina* induces apoptosis via a caspase-3-mediated mechanism in human promyelocytic leukemia cells. *J Med Food*. 9:138-44.

Al-Dabbas, M.M., T. Suganuma, K. Kitahara, D.X. Hou e M. Fujii. 2006. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. *J Ethnopharmacol*. 108:287-93.

Amirghofran, Z., M. Bahmani, A. Azadmehr e K. Javidnia. 2006a. Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines. *Neoplasma*. 53:428-33.

Amirghofran, Z., M. Bahmani, A. Azadmehr e K. Javidnia. 2006b. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 132:427-32.

Andersson, L.C., M. Jokinen e C.G. Gahmberg. 1979. Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*. 278:364-5.

Apisantiyakom, S., P. Kittakoop, T. Manyum, K. Kirtikara, J.B. Bremner e Y. Thebtaranonth. 2004. Novel biologically active bibenzyls from *Bauhinia saccocalyx* Pierre. *Chem Biodivers*. 1:1694-701.

Arunkumar, A., M.R. Vijayababu, N. Srinivasan, M.M. Aruldhas e J. Arunakaran. 2006. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Biochem*. 288:107-13.

Ashik, M., M.A. Flowers, G. Karagianis e P.G. Waterman. 2006. New phenolic glycosides from the stems and leaves of *Casearia multinervosa*. *Nat Prod Res*. 20:641-7.

Baggio, C.H., G. De Martini Otofuji, W.M. de Souza, C.A. de Moraes Santos, L.M. Torres, L. Rieck, M.C. de Andrade Marques e S. Mesia-Vela. 2005. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. *Planta Med*. 71:733-8.

Baguley, B.C., K.O. Hicks e W.R. Wilson. 2002. Tumor cell cultures in drug development. *In*: Anticancer Drug Development. Academic Press Auckland. p.397.

Basile, A.C., J.A. Sertie, S. Panizza, T.T. Oshiro e C.A. Azzolini. 1990. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J Ethnopharmacol*. 30:185-97.

Batista, C.V.F., S.B. Rech, A.T. Henriques, J. Schripsema e R. Verpoorte. 1996. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii Phytochemistry*. 41:969-73.

Bemis, D.L., J.L. Capodice, P. Gorroochurn, A.E. Katz e R. Buttyan. 2006. Anti-prostate cancer activity of a beta-carboline alkaloid enriched extract from *Rauwolfia vomitoria*. *Int J Oncol*. 29:1065-73.

Benz, E.J., Jr., M.J. Murnane, B.L. Tonkonow, B.W. Berman, E.M. Mazur, C. Cavallesco, T. Jenko, E.L. Snyder, B.G. Forget e R. Hoffman. 1980. Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:3509-13.

Beutler, J.A., K.L. McCall, K. Herbert, D.L. Herald, G.R. Pettit, T. Johnson, R.H. Shoemaker e M.R. Boyd. 2000. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. *J Nat Prod*. 63:657-61.

Block, G., B. Patterson e A. Subar. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*. 18:1-29.

Borges, M.H., A.M. Soares, V.M. Rodrigues, S.H. Andriao-Escarso, H. Diniz, A. Hamaguchi, A. Quintero, S. Lizano, J.M. Gutierrez, J.R. Giglio e M.I. Homsi-Brandeburgo. 2000. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 127:21-30.

Borges, M.H., A.M. Soares, V.M. Rodrigues, F. Oliveira, A.M. Fransheschi, A. Rucavado, J.R. Giglio e M.I. Homsi-Brandeburgo. 2001. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon*. 39:1863-9.

Bradley, T.R. e D. Metcalf. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 44:287-99.

Breitman, T.R., S.E. Selonick e S.J. Collins. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:2936-40.

Brown, M.D. 1999. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern Med Rev*. 4:360-70.

Buss, A.D. e R.D. Waigh. 1995. Natural compounds as leads for new pharmaceuticals. *In* Burger's medical chemistry and drug discovery. John Woley & Sons, Inc, Oxford. 983-1033.

Butler, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod*. 67:2141-53.

Calixto, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*. 33:179-189.

Chang, K.C., C.Y. Duh, I.S. Chen e I.L. Tsai. 2003. A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chroman and a benzoquinol derivative formosan *Casearia membranacea*. *Planta Med*. 69:667-72.

Chen, C., G. Shen, V. Hebbar, R. Hu, E.D. Owuor e A.N. Kong. 2003. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 24:1369-78.

Chen, Y.H., H.Y. Chen, C.L. Hsu e G.C. Yen. 2007. Induction of apoptosis by the *Lactuca indica* L. in human leukemia cell line and its active components. *J Agric Food Chem*. 55:1743-9.

Cheng, A.C., C.B. Jian, Y.T. Huang, C.S. Lai, P.C. Hsu e M.H. Pan. 2007. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chem Toxicol*. 45:2206-18.

Civin, C.I. e S.D. Gore. 1993. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother*. 2:137-44.

Coimbra, S., E. Castro, P. Rocha-Pereira, I. Rebelo, S. Rocha e A. Santos-Silva. 2006. The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr*. 25:790-6.

Collins, S.J., A. Bodner, R. Ting e R.C. Gallo. 1980. Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by componuds which induce differentiation of murine leukemia cells. *Int J Cancer*. 25:213-8.

Collins, S.J., F.W. Ruscetti, R.E. Gallagher e R.C. Gallo. 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75:2458-62.

Colucci, G., J.G. Moore, M. Feldman e M.J. Chrispeels. 1999. cDNA cloning of FRIL, a lectin from *Dolichos lablab*, that preserves hematopoietic progenitors in suspension culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:646-50.

Corrêa, P. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.

Cowden, R.R. e S.K. Curtis. 1981. Microfluorometric investigations of chromatin structure. I. Evaluation of nine DNA-specific fluorochromes as probes of chromatin organization. *Histochemistry*. 72:11-23.

Dacie, J. e S.M. Lewis. 1995. Practical Haematology. Churchill Livingstone, Edinburg. 453 pp.

de, F.N.S.D., R.A. Yunes, E.H. Schaab, A. Malheiros, V. Cechinel Filho, G.C. Franchi, Jr., A.E. Nowill, A.A. Cardoso e J.A. Yunes. 2006. Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetti* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells. *J Pharm Pharm Sci*. 9:200-8.

Devita, V.T., Jr., A.A. Serpick e P.P. Carbone. 1970. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med*. 73:881-95.

Di Stasi, L.C., G.P. Oliveira, M.A. Carvalhaes, M. Queiroz, Jr., O.S. Tien, S.H. Kakinami e M.S. Reis. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. 73:69-91.

Dive, C., C.D. Gregory, D.J. Phipps, D.L. Evans, A.E. Milner e A.H. Wyllie. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*. 1133:275-85.

El-Shemy, H.A., A.M. Aboul-Enein, K.M. Aboul-Enein e K. Fujita. 2007. Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types. *PLoS ONE*. 2:e178.

Esteves, I., I.R. Souza, M. Rodrigues, L.G. Cardoso, L.S. Santos, J.A. Sertie, F.F. Perazzo, L.M. Lima, J.M. Schneedorf, J.K. Bastos e J.C. Carvalho. 2005. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J Ethnopharmacol*. 101:191-6.

Faria, M.H., T.G. Carvalho, S.H. Rabenhorst, J.J. Sidrim e M.O. Moraes-Filho. 2006. Cytotoxic and antifungal properties of medicinal plants from Ceara, Brazil. *Braz J Biol*. 66:1133-5.

Fauser, A.A. e H.A. Messner. 1978. Granuloerythropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood*. 52:1243-8.

Fauser, A.A. e H.A. Messner. 1979. Proliferative state of human pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) in normal individuals and under regenerative conditions after bone marrow transplantation. *Blood*. 54:1197-200.

Franks, L.M. e N.M. Teich. 1998. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, Oxford.

Freshney, R.I. 2000. Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques. Wiley-Liss, United States of America.

Gahmberg, C.G., M. Jokinen e L.C. Andersson. 1979. Expression of the major red cell sialoglycoprotein, glycophorin A, in the human leukemic cell line K562. *J Biol Chem*. 254:7442-8.

Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti e R. Gallo. 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 54:713-33.

Gao, X., Y.X. Xu, G. Divine, N. Janakiraman, R.A. Chapman e S.C. Gautam. 2002. Disparate in vitro and in vivo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. *J Nutr*. 132:2076-81.

Gao, X., G. Zhang, M. Zhou, D. Luo e B. Li. 2004. Antiproliferative activity of *Goldfussia psilostachys* ethanolic extract on K562 leukemia cells. *Fitoterapia*. 75:639-44.

Ghosh, P., S.E. Besra, G. Tripathi, S. Mitra e J.R. Vedasiromoni. 2006. Cytotoxic and apoptogenic effect of tea (*Camellia sinensis* var. assamica) root extract (TRE) and two of its steroidal saponins TS1 and TS2 on human leukemic cell lines K562 and U937 and on cells of CML and ALL patients. *Leuk Res*. 30:459-68.

Grimm, W. e H.H. Muller. 1999. A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. *Am J Med*. 106:138-43.

Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 27:1-93.

Harmos, A.D., U. Weiss e J.V. Silverton. 1979. The structure of rohutukine, the main alkaloid of *Amoora rohituka* (syn. *Aphanamixis polystachya*). *Tetrahydron*. 8:721-724.

Harris, N.L., E.S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H.K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T.A. Lister e C.D. Bloomfield. 1999. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol*. 10:1419-32.

Hartwell, J.L. 1982. Plants Used Against Cancer. Quarterman Publications, Lawrence, Massachusetts. 100 pp.

Hellmann-Blumberg, U., T.L. Taras, G.T. Wurz e M.W. DeGregorio. 2000. Genotoxic effects of the novel mixed antiestrogen FC-1271a in comparison to tamoxifen and toremifene. *Breast Cancer Res Treat*. 60:63-70.

Hirsch, K., M. Danilenko, J. Giat, T. Miron, A. Rabinkov, M. Wilchek, D. Mirelman, J. Levy e d Y. Sharoni. 2000. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer*. 38:245-54.

Hoffman, R., M.J. Murnane, E.J. Benz, Jr., R. Prohaska, V. Floyd, N. Dainiak, B.G. Forget e H. Furthmayr. 1979. Induction of erythropoietic colonies in a human chronic myelogenous leukemia cell line. *Blood*. 54:1182-7.

Huang, D.M., Y.C. Shen, C. Wu, Y.T. Huang, F.L. Kung, C.M. Teng e J.H. Guh. 2004. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Pharmacol*. 503:17-24.

Huber, C., C. Sundstrom, K. Nilsson e H. Wigzell. 1976. Surface receptors on human haematopoietic cell lines. *Clin Exp Immunol*. 25:367-76.

Huo, X.F., J. Yu, H. Peng, Z.W. Du, X.L. Liu, Y.N. Ma, X. Zhang, Y. Zhang, H.L. Zhao e J.W. Zhang. 2006. Differential expression changes in K562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation. *Mol Cell Biochem*. 292:155-67.

Itoh, A., T. Kumashiro, M. Yamaguchi, N. Nagakura, Y. Mizushina, T. Nishi e T. Tanahashi. 2005. Indole alkaloids and other constituents of *Rauwolfia serpentina*. *J Nat Prod*. 68:848-52.

Itokawa, H., N. Totsuka, H. Morita, K. Takeya, Y. Iitaka, E.P. Schenkel e M. Motidome. 1990. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 38:3384-8.

Itokawa, H., N. Totsuka, K. Takeya, K. Watanabe e E. Obata. 1988. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 36:1585-8.

Jakubikova, J. e J. Sedlak. 2006. Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines. *Neoplasma*. 53:191-9.

Jandl, J.H. 1991. Blood: pathophysiology. Blackwell Scientific, Oxford. p.524.

Jang, M., L. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas, C.W. Beecher, H.H. Fong, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, R.G. Mehta, R.C. Moon e J.M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275:218-20.

Jimenez-Medina, E., A. Garcia-Lora, L. Paco, I. Algarra, A. Collado e F. Garrido. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 6:119.

Johnson, I.S., J.G. Armstrong, M. Gorman e J.P. Burnett, Jr. 1963. The Vinca Alkaloids: a New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res*. 23:1390-427.

Jokhadze, M., L. Eristavi, J. Kutchukhidze, A. Chariot, L. Angenot, M. Tits, O. Jansen e M. Frederich. 2007. In Vitro cytotoxicity of some medicinal plants from Georgian Amaryllidaceae. *Phytother Res*. 21:622-4.

Kanokmedhakul, S., K. Kanokmedhakul e M. Buayairaksa. 2007. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. *J Nat Prod*. 70:1122-6.

Kantarjian, H.M., S. O'Brien, P. Anderlini e M. Talpaz. 1996. Treatment of myelogenous leukemia: current status and investigational options. *Blood*. 87:3069-81.

Kazi, A., D.M. Smith, K. Daniel, S. Zhong, P. Gupta, M.E. Bosley e Q.P. Dou. 2002. Potential molecular targets of tea polyphenols in human tumor cells: significance in cancer prevention. *In Vivo*. 16:397-403.

Kelloff, G.J., J.A. Crowell, V.E. Steele, R.A. Lubet, W.A. Malone, C.W. Boone, L. Kopelovich, E.T. Hawk, R. Lieberman, J.A. Lawrence, I. Ali, J.L. Viner e C.C. Sigman. 2000. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr*. 130:467S-471S.

Khan, M.T., I. Lampronti, D. Martello, N. Bianchi, S. Jabbar, M.S. Choudhuri, B.K. Datta e R. Gambari. 2002. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medicinal plant *Emblica officinalis*: effects on in vitro cell growth of human tumor cell lines. *Int J Oncol*. 21:187-92.

Kim, E.K., K.B. Kwon, M.J. Han, M.Y. Song, J.H. Lee, Y.S. Ko, B.C. Shin, J. Yu, Y.R. Lee, D.G. Ryu, J.W. Park e B.H. Park. 2007. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med*. 20:123-8.

Klein, E., G. Klein, J.S. Nadkarni, J.J. Nadkarni, H. Wigzell e P. Clifford. 1968. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res*. 28:1300-10.

Klein, G., E. Klein e P. Clifford. 1967. Search for host defenses in Burkitt lymphoma: membrane immunofluorescence tests on biopsies and tissue culture lines. *Cancer Res*. 27:2510-20.

Kollet, O., J.G. Moore, R. Aviram, H. Ben-Hur, B.L. Liu, A. Nagler, L. Shultz, M. Feldman e T. Lapidot. 2000. The plant lectin FRIL supports prolonged in vitro maintenance of quiescent human cord blood CD34(+)CD38(-/low)/SCID repopulating stem cells. *Exp Hematol*. 28:726-36.

Kondo, M., A.J. Wagers, M.G. Manz, S.S. Prohaska, D.C. Scherer, G.F. Beilhack, J.A. Shizuru e I.L. Weissman. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 21:759-806.

Koopman, G., C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, R.M. Keehnen, S.T. Pals e M.H. van Oers. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84:1415-20.

Kumagai, T., C.I. Muller, J.C. Desmond, Y. Imai, D. Heber e H.P. Koeffler. 2007. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res*. 31:523-30.

Kumar, A. e A. Singh. 2007. Protective effect of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) extract on 72-hour sleep deprivation-induced anxiety-like behavior and oxidative damage in mice. *Planta Med*. 73:1358-64.

Kwak, C.S., S.C. Moon e M.S. Lee. 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of pine needles (*Pinus densiflora*). *Nutr Cancer*. 56:162-71.

Kwon, K.B., S.J. Yoo, D.G. Ryu, J.Y. Yang, H.W. Rho, J.S. Kim, J.W. Park, H.R. Kim e B.H. Park. 2002. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol*. 63:41-7.

Landis-Piwowar, K.R., C. Huo, D. Chen, V. Milacic, G. Shi, T.H. Chan e Q.P. Dou. 2007. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res*. 67:4303-10.

Lau, F.Y., C.H. Chui, R. Gambari, S.H. Kok, K.L. Kan, G.Y. Cheng, R.S. Wong, I.T. Teo, C.H. Cheng, T.S. Wan, A.S. Chan e J.C. Tang. 2005. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of *Brucea javanica* extract on human carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 16:1157-62.

Lauthier, F., L. Taillet, P. Trouillas, C. Delage e A. Simon. 2000. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs*. 11:737-45.

Lee, G.R., T.C. Bithell, J. Foerster, J.W. Athens e J.N. Lukens. 1999. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Lee, T.J., O.H. Kim, Y.H. Kim, J.H. Lim, S. Kim, J.W. Park e T.K. Kwon. 2006. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett*. 240:234-42.

Li, W.Y., L.C. Chiu, W.S. Lam, W.Y. Wong, Y.T. Chan, Y.P. Ho, E.Y. Wong, Y.S. Wong e V.E. Ooi. 2007. Ethyl acetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cells, associated with cell cycle arrest and up-regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Oncol Rep*. 17:425-31.

Li, X.K., M. Motwani, W. Tong, W. Bornmann e G.K. Schwartz. 2000. *Huanglian*, A chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Mol Pharmacol*. 58:1287-93.

Lim, H., M.K. Kim, Y. Lim, Y.H. Cho e C.H. Lee. 2006. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. *Cancer Lett*. 233:89-97.

Liu, R.H., J. Liu e B. Chen. 2005. Apples prevent mammary tumors in rats. *J Agric Food Chem*. 53:2341-3.

Lowe, S.W. e A.W. Lin. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21:485-95.

Lozzio, C.B. e B.B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45:321-34.

Lu, L. e X.Q. Jia. 2000. Effects of naturin 2 on colony formation by hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood mediated by induction of release of growth factors. *In Vivo*. 14:441-6.

Macey, M.G. 1994. Flow cytometry - clinical applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 310.

Machado Junior, J.C., A. Florão, F.V.R. Mattana, F.H. Rocha, C.A.M. Santos e A.M. Weffort-Santos. 2006. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação de atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Rev Bras Farm*. 16:645-55.

Majewska, A., G. Hoser, M. Furmanowa, N. Urbanska, A. Pietrosiuk, A. Zobel e M. Kuras. 2006. Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. *J Ethnopharmacol*. 103:43-52.

Malerba, I., S. Casati, C. Diodovich, D. Parent-Massin e L. Gribaldo. 2004. Inhibition of CFU-E/BFU-E and CFU-GM colony growth by cyclophosphamide,

5-fluorouracil and taxol: development of a high-throughput in vitro method. *Toxicol In Vitro*. 18:293-300.

Malerba, I., A.F. Castoldi, D. Parent-Massin e L. Gribaldo. 2002. In vitro myelotoxicity of propanil and 3,4-dichloroaniline on murine and human CFU-E/BFU-E progenitors. *Toxicol Sci*. 69:433-8.

Mans, D.R., A.B. da Rocha e G. Schwartsmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 5:185-98.

Mantena, S.K., S.M. Meeran, C.A. Elmets e S.K. Katiyar. 2005. Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J Nutr*. 135:2871-7.

Masters, J.R.W., P. Twentyman, R. Daley, J. Davis, A. Doyle, S. Dyer, I. Freshney, A. Galpine, M. Harrison, H. Hurst, L. Kelland, G. Stacey, I. Stratford e T.H. Ward. 2000. UKCCCR guidelines for the use of cell lines in cancer research. *Br J Cancer*. 82:1495-1509.

Masubuchi, N. 2006. Risk assessment of human myelotoxicity of anticancer drugs: a predictive model and the in vitro colony forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay. *Pharmazie*. 61:135-9.

Mata-Greenwood, E., M. Cuendet, D. Sher, D. Gustin, W. Stock e J.M. Pezzuto. 2002. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G(1) arrest is associated with down-regulation of c-myc. *Leukemia*. 16:2275-84.

McGuire, W.P., J.A. Blessing, D. Moore, S.S. Lentz e G. Photopulos. 1996a. Paclitaxel has moderate activity in squamous cervix cancer. A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 14:792-5.

McGuire, W.P., W.J. Hoskins, M.F. Brady, P.R. Kucera, E.E. Partridge, K.Y. Look, D.L. Clarke-Pearson e M. Davidson. 1996b. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 334:1-6.

Menezes, P.R., E.A. Schwarz e C.A. Santos. 2004. In vitro antioxidant activity of species collected in Parana. *Fitoterapia*. 75:398-400.

Merchant, D., R. Kahn e W. Murphy. 1964. Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing.

Meyre-Silva, C., R.A. Yunes, F. Delle Monache, A.R. Santos, L.O. Schmeling, V.M. Gadotti, F. Liz e V. Cechinel-Filho. 2001. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). *Z Naturforsch [C]*. 56:939-42.

Morita, H., M. Nakayama, H. Kojima, K. Takeya, H. Itokawa, E.P. Schenkel e M. Motidome. 1991. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 39:693-7.

Morley, N., T. Clifford, L. Salter, S. Campbell, D. Gould e A. Curnow. 2005. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 21:15-22.

Nam, S.Y., H.K. Yi, J.C. Lee, J.C. Kim, C.H. Song, J.W. Park, D.Y. Lee, J.S. Kim e P.H. Hwang. 2002. *Cortex mori* extract induces cancer cell apoptosis through inhibition of microtubule assembly. *Arch Pharm Res*. 25:191-6.

Nangia, M., W. Syed e P.M. Doraiswamy. 2000. Efficacy and safety of St. John's wort for the treatment of major depression. *Public Health Nutr*. 3:487-94.

Nardin, J.M. 2006. Dissertação de mestrado: Atividades Biológicas da Uleína. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Neelis, K.J., S.C. Hartong, T. Egeland, G.R. Thomas, D.L. Eaton e G. Wagemaker. 1997. The efficacy of single-dose administration of thrombopoietin with coadministration of either granulocyte/macrophage or granulocyte colony-stimulating factor in myelosuppressed rhesus monkeys. *Blood*. 90:2565-73.

Negro, G.D., M. Bonato e L. Gribaldo. 2001. In vitro bone marrow granulocyte-macrophage progenitor cultures in the assessment of hematotoxic potential of the new drugs. *Cell Biol Toxicol*. 17:95-105.

Oberlies, N.H., J.P. Burgess, H.A. Navarro, R.E. Pinos, C.R. Fairchild, R.W. Peterson, D.D. Soejarto, N.R. Farnsworth, A.D. Kinghorn, M.C. Wani e M.E. Wall. 2002. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod*. 65:95-9.

Oken, B.S., D.M. Storzbach e J.A. Kaye. 1998. The efficacy of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 55:1409-15.

Parchment, R.E. 1998. Alternative testing systems for evaluating noncarcinogenic, hematologic toxicity. *Environ Health Perspect*. 106 Suppl 2:541-57.

Parent-Massin, D. 2001. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. *Cell Biol Toxicol*. 17:87-94.

Park, E.J. e J.M. Pezzuto. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev*. 21:231-55.

Parkin, D.M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2:533-43.

Pereira, N.A. 1956. Composição alcaloídica da Rauwolfia sellowii MÜLL. ARG. *Rev Bras Farm*. 37:419-22.

Pessina, A., I. Malerba e L. Gribaldo. 2005. Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and preclinical trials. *Curr Pharm Des*. 11:1055-65.

Pettit, G.R., A. Numata, C. Iwamoto, Y. Usami, T. Yamada, H. Ohishi e G.M. Cragg. 2006. Antineoplastic agents. 551. Isolation and structures of bauhiniastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*. *J Nat Prod*. 69:323-7.

Philip, P.A. 2005. Experience with docetaxel in the treatment of gastric cancer. *Semin Oncol*. 32:S24-38.

Phillipson, J.D. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 56:237-43.

Pluznik, D.H. e L. Sachs. 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol*. 66:319-24.

Presibella, M.M., C.A.M. Santos e A.M. Weffort-Santos. 2003. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. *Rev Bras Farm*. 13:75-82.

Purves, D., C. Harvey, D. Tweats e C.E. Lumley. 1995. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis*. 10:297-312.

Quadros, M.R., A.R. Souza Brito e M.L. Queiroz. 1999. *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection--effects on bone marrow progenitor cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 21:109-24.

Queiroz, M.L., G.Z. Justo, F.R. Pereira-da-Silva, A.H. Muller e G.M. Guilhon. 2000. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* extract on the hematopoietic response during murine listeriosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 22:721-40.

Rajkapoor, B., B. Jayakar, N. Murugesh e D. Sakthisekaran. 2006. Chemoprevention and cytotoxic effect of *Bauhinia variegata* against N-nitrosodiethylamine induced liver tumors and human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 104:407-9.

Rattmann, Y.D., M.R. Terluk, W.M. Souza, C.A. Santos, M.W. Biavatti, L.B. Torres, S. Mesia-Vela, L. Rieck, J.E. da Silva-Santos e M.C. Marques. 2005. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *J Ethnopharmacol*. 100:268-75.

Reddy, L., B. Odhav e K.D. Bhoola. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther*. 99:1-13.

Rosenfeld, C., A. Goutner, A.M. Venuat, C. Choquet, J.L. Pico, J.F. Dore, A. Liabeuf, A. Durandy, C. Desgrange e G. De The. 1977. An effect human leukaemic cell line: Reh. *Eur J Cancer*. 13:377-9.

Rustin, G.J., A.E. Nelstrop, P. McClean, M.F. Brady, W.P. McGuire, W.J. Hoskins, H. Mitchell e H.E. Lambert. 1996. Defining response of ovarian carcinoma to initial chemotherapy according to serum CA 125. *J Clin Oncol*. 14:1545-51.

Rutherford, T.R., J.B. Clegg e D.J. Weatherall. 1979. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. 280:164-5.

Sai-Prakash, C.V., J.M. Hoch e D.G. Kingston. 2002. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod*. 65:100-7.

Sandlund, J.T., L.M. Neckers, H.E. Schneller, L.S. Woodruff e I.T. Magrath. 1993. Theophylline induced differentiation provides direct evidence for the deregulation of c-myc in Burkitt's lymphoma and suggests participation of immunoglobulin enhancer sequences. *Cancer Res*. 53:127-32.

Schmid, I., W.J. Krall, C.H. Uittenbogaart, J. Braun e J.V. Giorgi. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. 13:204-8.

Schulten, B., M. Bulitta, B. Ballering-Bruhl, U. Koster e M. Schafer. 2001. Efficacy of *Echinacea purpurea* in patients with a common cold. A placebo-controlled, randomised, double-blind clinical trial. *Arzneimittelforschung*. 51:563-8.

Sedlacek, H.H., L.M. Ruyt, N.K. Ona, M.S. Piret e L.A. Unis. 1996. Flavopiridol (L86-8275, NSC-649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol*. 9:1143-1168.

Sertié, J.A.A., J.C.T. Carvalho e S. Panizza. 2000. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology*. 38:112-119.

Shanafelt, T.D., Y.K. Lee, T.G. Call, G.S. Nowakowski, D. Dingli, C.S. Zent e N.E. Kay. 2006. Clinical effects of oral green tea extracts in four patients with low grade B-cell malignancies. *Leuk Res*. 30:707-12.

Shapiro, H.M. 1985. Practical flow cytometry. Alan R. Liss, Inc, New York. p.529.

Sheng, Y., R.W. Pero, A. Amiri e C. Bryngelsson. 1998. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res*. 18:3363-8.

Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 274:1672-7.

Silva, E.G., G.A. Behr, A. Zanotto-Filho, R. Lorenzi, M.A. Pasquali, L.G. Ravazolo, C.L. Bordignon, Jr., F.A. Silva, A.L. Aboy, V.L. Bassani, A.T. Henriques, F.H. Reginatto, F. Dal-Pizzol e J.C. Moreira. 2007. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biol Pharm Bull*. 30:1488-96.

Silva, G.L.C., P. Gaertner, P.G. Marson, E.A. Schwartz e C.A.M. Santos. 2004. An ethno-pharmacobotanical survey in Salto Caxias Hydroelectric Power Plant in Paraná State, Brazil, before the flooding. *Acta Farm Bonaerense*. 22:149-54.

Souza, W.M., A.E. Stinghen e C.A. Santos. 2004. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. *Fitoterapia*. 75:750-3.

Sporn, M.B., N.M. Dunlop, D.L. Newton e J.M. Smith. 1976. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*. 35:1332-8.

Steinmetz, K.A. e J.D. Potter. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*. 96:1027-39.

Suffredini, I.B., M.L. Paciencia, A.D. Varella e R.N. Younes. 2007. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*. 78:223-6.

Suzuki, M., M. Tabuchi, M. Ikeda, K. Umegaki e T. Tomita. 2004. Protective effects of green tea catechins on cerebral ischemic damage. *Med Sci Monit*. 10:BR166-74.

Tai, J., S. Cheung, S. Cheah, E. Chan e D. Hasman. 2006. In vitro anti-proliferative and antioxidant studies on Devil's Club *Oplopanax horridus*. *J Ethnopharmacol*. 108:228-35.

Testa, N. e G. Molineux. 1993. Haemopoiesis - a practical approach. Oxford University Press, Oxford.

Testa, N.G. 1985. Clonal assays for haemopoietic and lymphoid cells in vitro. *In* (org.) Cell clones - manual of mammalian cell techniques. J.H. Potter and J. Hendry, editors. Churchill-Livingstone, New York. 235.

Turan, N., K. Akgun-Dar, S.E. Kuruca, T. Kilicaslan-Ayna, V.G. Seyhan, B. Atasever, F. Mericli e M. Carin. 2006. Cytotoxic effects of leaf, stem and root extracts of *Nerium oleander* on leukemia cell lines and role of the p-glycoprotein in this effect. *J Exp Ther Oncol*. 6:31-8.

Umemura, T., S. Kai, R. Hasegawa, K. Kanki, Y. Kitamura, A. Nishikawa e M. Hirose. 2003. Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine-induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion. *Carcinogenesis*. 24:1105-9.

Vardiman, J.W., N.L. Harris e R.D. Brunning. 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 100:2292-302.

Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken e C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184:39-51.

Vickers, A. 2002. Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer Invest*. 20:1069-79.

Wargovich, M.J. 1987. Diallyl sulfide, a flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Carcinogenesis*. 8:487-9.

Wargovich, M.J., C. Woods, V.W. Eng, L.C. Stephens e K. Gray. 1988. Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Res*. 48:6872-5.

Williams, R.B., A. Norris, J.S. Miller, C. Birkinshaw, F. Ratovoson, R. Andriantsiferana, V.E. Rasamison e D.G. Kingston. 2007. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. *J Nat Prod*. 70:206-9.

Williams, S.D., R. Birch, L.H. Einhorn, L. Irwin, F.A. Greco e P.J. Loehrer. 1987. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med*. 316:1435-40.

Won, H.J., C.H. Han, Y.H. Kim, H.J. Kwon, B.W. Kim, J.S. Choi e K.H. Kim. 2006. Induction of apoptosis in human acute leukemia Jurkat T cells by *Albizzia julibrissin* extract is mediated via mitochondria-dependent caspase-3 activation. *J Ethnopharmacol*. 106:383-9.

Xie, C. e X.T. Pei. 2003. [The mechanisms of a new plant lectin FRIL from *Dolichos lablab* that preserves quiescent hematopoietic stem cells in suspension culture]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 34:127-31.

Yang, J., K.J. Meyers, J. van der Heide e R.H. Liu. 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *J Agric Food Chem*. 52:6787-93.

Yoshida, M., M. Yamamoto e T. Nikaido. 1992. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*. 52:6676-81.

Yurchenco, P.D. e H. Furthmayr. 1980. Expression of red cell membrane proteins in erythroid precursor cells. *J Supramol Struct*. 13:255-69.

Zelenin, A.V., A.I. Poletaev, N.G. Stepanova, V.E. Barsky, V.A. Kolesnikov, S.M. Nikitin, A.L. Zhuze e N.V. Gnutchev. 1984. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry*. 5:348-54.

Zhang, Y.H., H.Y. Peng, G.H. Xia, M.Y. Wang e Y. Han. 2004. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacol Sin*. 25:937-42.

Zunino, S.J., e D.H. Storms. 2006. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett*. 240:123-34.

ANEXOS

ANEXO I

ERASTO GAERTNER
HOSPITAL ERASTO GAERTNER
INSTITUTO DE BIOENGENHARIA
INSTITUTO DE REABILITAÇÃO
CENTRO DE PROJETOS DE ENSINO E PESQUISA
REDE FEMININA

Comunicado de Aprovação de Projeto

Curitiba, quarta-feira, 15 de março de 2006

Ilmo Sr./Dr.(a)

Almeriane Maria Weffort Santos

O CEPEP comunica que o seu projeto de Pesquisa de nº 1278: Influência de Compostos Isolados de Plantas Medicinais sobre a Proliferação e a Diferenciação de Progenitores Hematopoiéticos Normais e de Portadores de Doenças Neoplásicas Hematológicas in vitro, foi aprovado pelo CEPEP no dia 14/3/2006 e pode ser iniciado de imediato.

Atenciosamente,

Relatório parcial Previsto para:

Setembro/2006

CEPEP/Pesquisa

R Dr Ovande do Amaral, 201 Jardim das Américas
Curitiba/PR/Brasil . CEP 81 520-060
Fone: 55 41 - 3361-5000
http //www erastogaertner com br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Influência de compostos isolados de plantas medicinais sobre a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos normais e de portadores de doenças neoplásicas hematológicas *in vitro*

Este estudo tem como finalidade investigar os efeitos de extratos de plantas medicinais e de compostos deles purificados sobre células obtidas da medula óssea de pacientes portadores de doenças neoplásicas do sistema formador do sangue. Após a aprovação do projeto pelo órgão financiador e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, será solicitada a coleta da medula óssea de pacientes selecionados para realizar o estudo. Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que visa buscar novos medicamentos para o tratamento das doenças acima descritas.

Solicitamos então, o consentimento dos envolvidos no estudo para procedermos a coletas das amostras. As amostras serão coletadas apenas quando os médicos do serviço de oncologia deste hospital solicitarem tal material para o diagnóstico ou para o acompanhamento de uma doença já diagnosticada, e solicitaremos, nos dias de coleta, cerca de 1ml de material coletado. Em seguida, serão realizados os ensaios laboratoriais necessários, os quais se baseiam no cultivo dessas células in vitro e simultânea exposição aos extratos e compostos.. As amostras coletadas ficarão sob responsabilidade do laboratório de Hematologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, e o volume coletado estará disponível apenas para este estudo. Caso novo estudo venha a ser desenvolvido e ainda haja amostra, solicitaremos nova autorização do doador.

Este estudo não apresenta benefícios diretos aos pacientes colaboradores, e solicitamos ao paciente responder a alguns questionários a respeito do tratamento, informações pessoais e a permissão de acesso a toda documentação médica do paciente (prontuários, protocolos, exames), com a finalidade de obter informações sobre tratamento e sua evolução.

Em qualquer momento do estudo, o paciente ou responsáveis terão acesso a todo material e dados coletados, assim como aos pesquisadores envolvidos neste trabalho, para esclarecimentos de eventuais dúvidas ou obter qualquer informação a respeito do mesmo. Uma das principais responsáveis por este trabalho é a farmacêutica Jeanine Marie Nardin, do Setor de Pesquisa Clínica do Centro de Projetos de Ensino e Pesquisa, Liga Paranaense de Combate ao Câncer, aluna de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, telefones (41) 3361-5170 ou (41) 9991-0123. Se tiver qualquer dúvida ou alguma consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner pelo telefone 3361-5000.

A anulação deste consentimento a qualquer momento e retirada do paciente de qualquer estudo a ser realizado para este trabalho lhe é garantido se assim desejar, não havendo despesas ou compensações relacionadas.

Todas as informações obtidas do paciente serão analisadas em conjunto aos dados obtidos de outros pacientes envolvidos com o estudo, não sendo divulgada a identidade de nenhum deles. Estes dados serão utilizados exclusivamente para o estudo proposto acima.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL(IS) LEGAL(IS)

Acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "*Influência de compostos isolados de plantas medicinais sobre a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos normais e de portadores de doenças neoplásicas hematológicas in vitro*", coordenado pela pesquisadora Jeanine Marie Nardin, estando claro para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro, também, que a minha participação é isenta de despesas, que não terei direito a nenhum tipo de pagamento e que terei garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Assim, concordo com a minha participação voluntária neste estudo, sabendo que poderei, se for de minha vontade, retirar meu consentimento a cerca de minha participação no estudo em qualquer momento do mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido. Recebi uma cópia deste consentimento e me responsabilizo em guardá-la.

NOME DO PACIENTE:

_____ Data: / /
Assinatura do Paciente ou Responsável Legal

_____ Data: / /
Assinatura da Testemunha

_____ Data: / /
Assinatura do Pesquisador Principal