

SAMIRA CARDOSO FERREIRA

**EVENTOS APOPTÓTICOS INDUZIDOS PELO LAURIL
GALATO SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA HUMANA K562**

Florianópolis

2007

SAMIRA CARDOSO FERREIRA

**EVENTOS APOPTÓTICOS INDUZIDOS PELO LAURIL
GALATO SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA HUMANA K562**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do
título de mestre em Ciências
Médicas**

Coordenadora do Curso: Prof^a Dr^a Márcia Margaret Menezes Pizzichini

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Jairo Ivo dos Santos

Florianópolis

2007

DEDICATÓRIA

**Às pessoas com câncer, que
depositam na ciência a esperança de
minorar sua dor e a cura de todos os
seus males.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha mãe (*in memorium*),
pelo exemplo e por tudo que ficou.

Aos meus irmãos, por estarmos
sempre juntos.

Ao meu marido e meus filhos, pelo
amor dedicado todos os dias da minha
vida.

AGRADECIMENTOS

Em especial, à Prof^ª Dr^ª Maria Cláudia Santos da Silva, minha orientadora, sempre presente, que com seu grande conhecimento e entusiasmo conduziu todo o período deste estudo de forma prazerosa e a quem tenho o privilégio de ter como amiga.

Ao Prof^º Dr^º Jairo Ivo dos Santos, profissional exemplar, por aceitar a participação neste trabalho e por seu espírito de integração.

Ao Prof^º Dr^º Carlos Alberto Justo e Silva, diretor geral do Hospital Universitário - UFSC, mestre nato, pelo apoio à realização do trabalho e permanente incentivo à pesquisa.

À equipe do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LAQUAS) - UFSC, representada pela Prof^ª Dr^ª Maria Cláudia Santos da Silva, querida orientadora e suas alunas Mirela, Marley, Aline B, Aline C, Fernanda, Flávia, Andréia, Syntia e Claudriana, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Maria Luiza Bazzo, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular (LAQUAS) - UFSC, pela disponibilização de sua infra-estrutura, pela colaboração científica, convívio, amizade e permanente disponibilidade em auxiliar.

Aos integrantes do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário - UFSC, representados pela Prof^ª Ms Maria de Lourdes Rovaris, pela disponibilização de suas instalações, subsídios, amizade e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof^º Dr^º Luiz Alberto Peregrino, que com sua visão sempre à frente do tempo, durante a sua gestão no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário – UFSC, priorizou o processo de automatização, possibilitando assim, seu desenvolvimento atual.

Ao Prof^º Dr^º Jamil Assreuy, responsável pelo Laboratório de Farmacologia de Óxido Nítrico - UFSC, por seus valiosos empréstimos materiais, disponibilização de sua infra-estrutura, sugestões e carinho dispensados.

À Dr^ª Gabriela Di Giunta, responsável pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário - UFSC, pelo apoio à realização das imunocitoquímicas e por seu constante carinho e dedicação.

À Prof^ª Dr^ª Tânia Beatriz Creckzinski Pasa, responsável pelo Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas - UFSC, e toda sua equipe, pela colaboração científica, disponibilização de sua infra-estrutura e companheirismo.

Ao grupo do Prof^º Dr^º Rosendo A. Yunes do Departamento de Química - UFSC, que sintetizou e forneceu o lauril-galato utilizado neste trabalho.

Ao Prof^º Dr^º João Batista Calixto, responsável pelo Laboratório de Farmacologia – UFSC, pela disponibilização de sua infra-estrutura.

À Profª Drª Rozangela Curi Pedrosa, responsável pelo Laboratório de Bioquímica Experimental – UFSC, pela disponibilização de sua infra-estrutura.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina por ter proporcionado a realização desta minha formação profissional, acadêmica e científica.

Aos professores do Curso de Mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensinamentos.

À Drª Daniela Ferraz Pereira Leite, por sua cooperação, imprescindível suporte técnico, carinho e amizade.

À Profª Ms Cláudia Pinto Figueiredo e Alessandra Heinz, por tornarem possíveis as imunocitoquímicas, pelo carinho e pela disponibilidade sempre demonstrada.

Em especial, as minhas amigas Míriam, Marlene, Vera e Ângela, do Setor de Hematologia - HU, companheiras de todas as horas e com quem sempre poderei contar.

À Nicéia Mara Almeida de Souza, amiga de sempre, pelo incentivo e ajuda de todos os momentos.

Ao Profº Neivo Navarini, pela revisão do texto em português.

À Profª Drª Ariana Zanella, pela revisão do resumo em inglês.

A todos, mesmo ausentes, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A DEUS, por ter guiado meus passos ao longo desta jornada.

*"Tudo o que existe é de uma grande
exatidão.
Pena é que a maior parte do que existe
com essa exatidão
nos é tecnicamente invisível."*

Clarice Lispector

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer	15
1.2 Leucemias	16
1.2.1 Leucemia Mielóide Aguda	16
1.2.2 Tratamento da Leucemia Mielóide Aguda	18
1.3 Apoptose e Terapia Anticâncer	19
1.3.1 Mecanismos Reguladores de Apoptose.....	21
1.3.1.1 Mecanismo Intrínseco – Apoptose Mediada pela Mitocôndria	21
1.3.1.2 Mecanismo Extrínseco – Apoptose Ligada a Receptores	23
1.3.2 Fatores Reguladores de Apoptose	25
1.3.3 Alterações Celulares e Identificação de Células em Apoptose	27
1.4 Derivados do Ácido Gálico	29
1.4.1 Dodecil Galato (Lauril Galato)	30
2OBJETIVOS	33
1.5 Objetivo Geral	33
1.6 Objetivos Específicos	33
3MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Reagentes	34
3.2 Cultura de Células	35
3.3 Preparo da Amostra	35
3.3.1 Tratamento da Amostra	35
3.4 Medida da Citotoxicidade pelo Ensaio da Viabilidade Celular (MTT)	36
3.5 Análise da Fragmentação do DNA	36
3.6 Detecção das Alterações Citomorfológicas	37
3.6.1 Preparação de Lâminas.....	37

3.6.2	Coloração pelo Método May-Grünwalds Giemsa	37
3.6.3	Avaliação Microscópica	38
3.7	Detecção de Apoptose Conjugada a Anexina V-FITC	38
3.8	Imunocitoquímica para Caspase-3 (CPP-32), Survivina, Proteína Inibidora de Apoptose Bcl-2 e Proteína Indutora de Apoptose (AIF).....	39
3.9	Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	41
3.10	Análise Estatística	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Efeito Citotóxico de Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	43
4.2	Apoptose Causada pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	44
4.2.1	Detecção de Apoptose pela Análise da Fragmentação do DNA	44
4.2.2	Estudo das Alterações Citomorfológicas	45
4.2.3	Detecção de Apoptose Conjugada a Anexina V-FITC	45
4.3	Efeito do Lauril Galato sobre Fatores Reguladores de Apoptose em Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	47
4.3.1	Efeito do Lauril Galato na Expressão de Caspase-3 sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	47
4.3.2	Efeito do Lauril Galato na Expressão de Survivina sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	47
4.3.3	Envolvimento da Proteína Antiapoptótica Bcl-2 na Apoptose Induzida pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	47
4.3.4	Envolvimento AIF (Fator Indutor de Apoptose) na Apoptose Induzida pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562	51
4.4	Efeito do Lauril Galato sobre a Progressão do Ciclo Celular em Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562.....	53
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Sinalização intracelular da apoptose	23
Esquema 2: Representação da apoptose e seus principais mediadores.....	24
Esquema 3: Alterações celulares na apoptose/necrose.....	28
Esquema 4: Fórmula estrutural do lauril galato.....	30
Esquema 5: Esquema proposto para ação do lauril galato sobre células K562.....	62
Figura 1: Efeito citotóxico do lauril galato sobre células K562	43
Figura 2: Fragmentação do DNA causada pelo lauril galato sobre células K562	44
Figura 3: Alterações morfológicas induzidas pelo lauril galato sobre células K562	46
Figura 4: Análise da população de células em estágio inicial e final de apoptose detectadas pela marcação de anexina-V e PI	45
Figura 5: Efeito do lauril galato na expressão de caspase-3 sobre células K562	48
Figura 6: Efeito do lauril galato na expressão de survivina sobre células K562	49
Figura 7: Efeito do lauril galato na expressão de Bcl-2 sobre células K562	50
Figura 8: Efeito do lauril galato na expressão de AIF sobre células K562	52
Figura 9: Efeito do lauril galato sobre as fases do ciclo celular de células K562.....	54

ABREVIATURAS

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
APAF 1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
AraC	Citosina Arabinosídeo
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPS	Aminopropyltriethoxysilene
Bcl-2	B-cell lymphoma
BCSH	British Committee for Standards in Haematology
CAD	Caspase-activated DNase
Caspase	Cytosolic Aspartate-Specific Proteases
CD	Cluster Differentiation
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimethylsulfoxide
DISC	Death-induced signalling complex
DFF	DNA fragmentation factor
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Concentração efetora
FAB	Classificação Franco-Americana-Britânica
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Ligante Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLIP	Fas-associated-like inhibitory protein
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
IAP	Inibitors of Apoptosis Proteins
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MTT	Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio
MIC	Classificação morfológica, imunológica e citogenética
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffer Solution
PTK	Proteína Tirosina Quinase

PI	Iodeto de propídeo
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SMAC/Diablo	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRADD	TNF receptor associated death domain

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi investigar a sensibilidade de células de leucemia mielóide aguda humana K-562, ao composto sintético derivado do ácido gálico - lauril galato - bem como os mecanismos de citotoxicidade envolvidos. *Métodos:* Foi utilizada a linhagem de células de leucemia mielóide aguda K562, de origem humana, e o composto sintético derivado do ácido gálico - lauril galato. A citotoxicidade do lauril galato foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. A indução à apoptose foi avaliada por: exposição da fosfatidilserina (PS) (ANNEXIN V-FITC®), fragmentação do DNA e estudo citomorfológico. A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, após marcação com iodeto de propídeo. A expressão das proteínas reguladoras de apoptose - caspase-3; proteína inibidora de apoptose survivina, proteína antiapoptótica Bcl-2 e fator indutor de apoptose (AIF) - foi avaliada por imunocitoquímica. *Resultados:* O efeito citotóxico do lauril galato nas células K562 mostrou-se concentração-dependente com uma EC_{50} de 200 μ M ($47,7\% \pm 2\%$), após 48 horas. O lauril galato induziu exposição da PS, fragmentação do DNA e alterações citomorfológicas (12-24 horas de incubação) nas células K562. A indução à apoptose foi acompanhada por: bloqueio do ciclo celular nas fases S e G₂M, aumento da expressão de caspase-3, diminuição da expressão de survivina, Bcl-2 e aumento da expressão de AIF. *Conclusão:* O lauril galato induz à apoptose células K562 e causa bloqueio do ciclo celular, nas fases S e G₂M. Isto pode indicar que o mecanismo pelo qual o lauril galato inibe o crescimento de células leucêmicas não é somente por apoptose, mas também pela parada do ciclo celular. A apoptose está relacionada à inibição das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, com conseqüente aumento da liberação do AIF e aumento da expressão da caspase-3. Estes resultados sugerem que o uso do lauril galato, como uma nova estratégia terapêutica no desencadeamento de apoptose em células leucêmicas, pode ter um potencial efeito terapêutico.

Palavras –chave: Lauril galato; apoptose; células K562; survivina.

ABSTRACT

Objective: The purpose of the present study was to investigate the sensibility of human myeloid leukemia cells (K562) to the derivative of gallic acid – laurylgallate as well as the cytotoxicity of involved mechanisms. *Methods:* The leukemic cell line used was K562 (derived from myelogenous leukemia) and the alkyl ester of gallic acid used for this study was laurylgallate. The cell viability was determined by MTT colorimeter method. The induction of apoptosis was assessed by the exposition of phosphatidylserine (PS) (ANNEXIN V-FITC®), DNA fragmentation assay and characteristic cell morphological features. The analysis of cell cycle phase was carried out by flow cytometry after propidium iodide staining. Immunocytochemical analysis was performed to evaluate the expression of the proteins regulators of apoptosis as: caspase-3; protein inhibitor-of-apoptosis survivin; antiapoptotic Bcl-2 protein and apoptosis-inducing factor (AIF). *Results:* Laurylgallate cytotoxic effect on K562 cells was shown to be concentration-dependent with an EC_{50} of 200 μ M (47,7% \pm 2%) after 48 hours. Laurylgallate induced exposition of PS, fragmentation of DNA and cell morphological changes (12-24 h of incubation) on K562 cells. Apoptosis induction was accompanied by both the arrest at the S and G₂M phase of cell cycle; as well as an increase of the caspase-3 expression; a decrease of the survivin expression and Bcl-2; and an increase of the AIF expression.

Conclusion: Laurylgallate induces apoptosis on K562 cells and decreases the percentage of cells in S-G₂M phases of cell cycle. These findings suggested that the mechanism in which laurylgallate inhibits the growth of tumor cells takes place not only by apoptosis, but also by cell cycle alterations. Therefore, apoptosis is associated with the inhibition of the antiapoptotic Bcl-2 proteins and survivin, consequently increasing AIF release and increase of the expression of the caspase-3. These results suggest that there is a potential use of laurylgallate as a new therapeutic strategy in the downstream of apoptosis in tumor cells.

Keywords: Laurylgallate; apoptosis; K562 cells; survivin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento descontrolado de células anormais e pela capacidade de invasão de estruturas orgânicas, podendo resultar em morte se sua proliferação não for controlada¹. É um termo usado para descrever mais de 100 doenças diferentes, incluindo tumores malignos, tais como: câncer de mama, cervical, próstata, estômago, cólon, pulmão, leucemias, sarcomas, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin. A doença se origina, principalmente, como consequência da exposição individual a agentes carcinogênicos. O uso de tabaco, padrões de dieta e de atividade física – tanto quanto as condições ocupacionais e ambientais – além de fatores genéticos, desempenham um importante papel no desenvolvimento do câncer².

O câncer resulta de um longo processo de pelo menos três fases: iniciação, promoção e progressão, as quais refletem alterações genéticas acumuladas, responsáveis pela transformação de células normais em células neoplásicas. Os mecanismos de transformação neoplásica de uma célula normal envolvem uma série de eventos genéticos e moleculares que afetam a proliferação e a diferenciação. Na patogênese dos processos neoplásicos estão envolvidos dois grupos de genes: os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular e impedem a diferenciação, e os genes supressores de tumor, que promovem a diferenciação e limitam a proliferação das células. O desequilíbrio na regulação desse sistema, por meio da ativação de proto-oncogenes ou perda da função de genes supressores de tumor, pode levar à proliferação descontrolada de células e ao acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas, características das células neoplásicas^{3,4,5,6}.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, atualmente, mais de 11 milhões de pessoas recebem diagnóstico de câncer, a cada ano. O câncer é responsável por 7,1 milhões de mortes anualmente (12,5% do total global). No Brasil, é a segunda maior causa de morte, sendo ultrapassada somente por doenças cardíacas, e responsável por 12% do total de óbitos registrados, podendo ser considerado um problema de saúde pública⁷. Segundo o Ministério da Saúde, estimava-se a ocorrência de 472.050 casos de câncer em 2006⁸. Dentre os casos de câncer diagnosticados, as leucemias encontram-se entre os sete tipos mais frequentes, sendo superadas pelos cânceres de pulmão, próstata (sexo masculino), mama (sexo feminino), cólon, pâncreas e ovário¹.

1.2 Leucemias

Leucemias são proliferações neoplásicas de células imaturas do sistema hematopoiético, caracterizadas pela parada ou diferenciação celular anormal. O clone leucêmico pode surgir em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico⁹.

De modo geral, as leucemias são classificadas em agudas, as quais, se não tratadas, levam à morte em semanas ou meses, e crônicas, que, sem tratamento, conduzem à morte em meses ou anos. As leucemias agudas caracterizam-se pela proliferação clonal de células progenitoras primitivas hematopoiéticas imaturas. As leucemias crônicas caracterizam-se por um elevado número de células em proliferação, as quais mantêm a capacidade de se diferenciarem em células maduras. Dentro de cada grupo, ainda são subdivididas em mielóides e linfóides⁴.

A Leucemia Mielóide Aguda é o tipo de leucemia aguda mais comum em adultos. A Sociedade Americana de Câncer estimou para o ano de 2007, nos Estados Unidos, o surgimento de 11.960 novos casos desta doença, com 9.000 mortes¹⁰. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de incidência de leucemia, para 2006, eram de 5,82 e 4,45 casos para 100.000 homens e mulheres, respectivamente. Para o Estado de Santa Catarina, era de 7,35 casos para 100.000 homens e 5,27 casos para 100.000 mulheres⁸.

1.2.1 Leucemia Mielóide Aguda

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença maligna clonal do tecido hematopoiético, caracterizada pelo acúmulo de células blásticas anormais e pela diminuição da produção de células sanguíneas normais. Na LMA, a proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide ocorre na medula óssea, atingindo o sangue periférico. No entanto, pode infiltrar-se em outros órgãos. O mecanismo responsável pela perda do controle da proliferação celular e expansão do clone leucêmico, todavia, não está esclarecido. Entretanto, a ativação de proto-oncogenes e mutações em genes supressores, que regulam o ciclo celular, parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias^{11,12}.

O fato de a leucemia ser uma doença genética faz com que a identificação das alterações nas células blásticas seja imprescindível para a escolha do tratamento mais adequado. Neste sentido, houve a necessidade de agrupar casos biologicamente semelhantes, para uma melhor compreensão do processo de transformação leucêmica, prognóstico, e conduta terapêutica. Assim, após dois anos de reuniões, um grupo de hematologistas da França, dos Estados Unidos e da Grã-Bretanha, trabalhando em colaboração, propôs, em 1976, a primeira classificação para leucemias agudas, a Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB). Nesta classificação, as leucemias mielóides agudas (LMA) foram divididas em nove subtipos¹³. Com o avanço tecnológico, além da morfologia, da citocímica e da citogenética, os blastos leucêmicos também foram identificados por imunofenotipagem, e, dessa forma, as anormalidades cromossômicas foram detectadas de maneira mais precisa, o que permitiu subclassificações dentro da classificação FAB. Assim, em 1988 a classificação FAB foi revista e formulou-se a classificação MIC (morfológica, imunológica e citogenética)⁴. Estas variações permitem a identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas. Vários estudos têm mostrado a importância da citogenética e da imunofenotipagem na identificação de subgrupos de pacientes com características clínicas distintas, que orientam o tratamento e a monitoração da resposta terapêutica^{14,15,16,17}. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. Nesta classificação, foram criadas quatro subcategorias para a LMA, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes; LMA com displasia de múltiplas linhagens; LMA/SMD associada a tratamento; LMA não categorizada nos itens anteriores. Nesta categoria, segundo os critérios citogenéticos, a LMA pode ser classificada, de acordo com o cariótipo, em favorável, intermediário e desfavorável¹⁸. Entretanto, apesar de apresentarem diferentes subclassificações e prognósticos, com exceção da leucemia promielocítica, as LMAs são tratadas de forma semelhante. Após o tratamento há uma incidência de 13% de neoplasias secundárias¹⁹.

1.2.2 Tratamento da Leucemia Mielóide Aguda

Várias formas de terapia vêm sendo utilizadas no combate às leucemias, como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. A terapia sistêmica com drogas citotóxicas (quimioterapia) é o método mais efetivo de tratamento para leucemias (segundo a American Cancer Society)¹. Vários medicamentos anticâncer são utilizados de forma combinada - ou como agentes isolados. Antibióticos e transfusões de componentes sanguíneos são usados como suporte de tratamento e, em condições apropriadas, o transplante de medula óssea também pode ser utilizado^{1,20}.

Segundo o protocolo BCSH (British Committee for Standards in Haematology)²¹, o tratamento da Leucemia Mielóide Aguda é dividido em duas fases: fase de indução, a qual visa a eliminação das células leucêmicas, e fase de consolidação, importante para evitar recaída em semanas ou meses. De acordo com diversos grupos de estudos, vários quimioterápicos, como a citarabina, a mitoxantrona e a daunorrubicina, são recomendados no tratamento da LMA, porém com algumas variações nas doses administradas^{22,25}.

O mecanismo de ação desses quimioterápicos envolve, de modo geral, a inibição da síntese do DNA. A citarabina (citosina arabinosídeo; AraC) é o mais importante agente antimetabólico usado na terapia da Leucemia Mielóide Aguda, e é considerado o agente isolado mais eficaz para indução de remissão nesta doença²⁶. A inibição da síntese de DNA resulta do bloqueio do alongamento da cadeia de DNA, quando a AraC é incorporada na posição terminal de uma cadeia de DNA em crescimento²⁷. A Mitoxantrona, uma antracenediona, exerce sua ação antitumoral estimulando a formação de quebras dos filamentos de DNA, a qual é mediada pela topoisomerase II, e também se intercala no DNA. A mitoxantrona produz mielossupressão aguda e mucosite como suas principais ações tóxicas²⁸. A Daunorrubicina, um antibiótico antracíclico, está entre os mais importantes agentes antitumorais e tem sido usada principalmente nas leucemias agudas. Seu valor clínico é limitado por causar miocardiopatia relacionada à dose total do fármaco. Este composto também se intercala no DNA. Muitas funções do DNA são afetadas, incluindo a síntese de DNA e RNA. A cisão do DNA é considerada como sendo mediada pela ação da topoisomerase II²⁹ ou pela geração de radicais livres³⁰. A Daunorrubicina também pode interagir com membranas celulares e alterar as suas funções. Isto pode ter um papel importante tanto nas ações tumorais quanto na toxicidade cardíaca³¹.

O tratamento da LMA é agressivo para chegar à remissão completa, pois a remissão parcial não oferece benefícios na sobrevida. Aproximadamente 60% a 70% dos pacientes com LMA podem atingir o estado de remissão completa seguindo a terapia de indução. Aproximadamente 25% dos pacientes que chegam à remissão completa podem ter uma expectativa de vida de três anos ou mais¹⁰. Apesar da elevada taxa de remissão completa, após a indução, muitos pacientes recidivam. Por isso, em todos os casos é indicado o tratamento pós-remissão com intenção curativa^{32,33}. O sucesso da quimioterapia está relacionado com a natureza biológica da doença e com a idade do paciente. Os melhores resultados são observados nos indivíduos mais jovens, pois resistem melhor ao tratamento antileucêmico. Sendo assim, a quimioterapia intensiva em pacientes com idade superior a 60 anos nem sempre está indicada³⁴.

A morbidade associada aos quimioterápicos constitui um obstáculo significativo nos tratamentos antileucêmicos. Nas duas últimas décadas, a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de fármacos antineoplásicos, que tenham maior eficiência em induzir à morte células tumorais, e com poucos ou insignificantes efeitos adversos³⁵.

1.3 Apoptose e Terapia Anticâncer

Por muitos anos, o efeito de fármacos anticâncer nas células tumorais foi atribuído à sua ação inibitória na proliferação das células neoplásicas. A interação do fármaco com o alvo terapêutico levaria a um dano irreparável e a conseqüente interrupção das funções metabólicas vitais causando a morte das células tumorais. Apesar de sugestivas ligações entre carcinogênese e resposta à quimioterapia, o processo de apoptose não foi alvo de estudos até o início dos anos 90³⁶. Com a identificação de oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos neste processo, os quais forneceram a ligação molecular que faltava, o interesse por apoptose e o número de publicações nessa área aumentou consideravelmente³⁷. Entretanto, somente há poucos anos tornou-se claro que os fármacos anticâncer são capazes de induzir à apoptose, e que este processo está envolvido com seus efeitos citotóxicos. Além disso, a indução à apoptose foi identificada como um evento comum de diferentes classes de agentes anticâncer, o que converge para o desencadeamento de mecanismos similares, sendo que a interrupção destes mecanismos pode levar à resistência a múltiplas drogas^{38,39,40,41,42,43}.

A ação dos compostos antileucêmicos, de maneira geral, está baseada na inibição da proliferação, na indução à apoptose e na diferenciação das células leucêmicas, o que invariavelmente evolui para apoptose^{44,45}.

A importância do fenômeno de apoptose na oncologia clínica foi impulsionada pela atribuição do sucesso ou da falência dos tratamentos quimio e/ou radioterápico à capacidade das células tumorais de entrarem em processo de morte celular programada, em resposta ao dano causado por estes agentes físicos ou químicos.

A apoptose, uma forma de morte celular descrita primeiramente por Kerr, Wyllie e Currie, em 1972, está envolvida na homeostase dos tecidos e na tumorigênese. Apoptose é um processo de morte celular altamente regulado, fundamental para o controle da fisiologia celular e dos tecidos, em resposta a estímulos internos e externos, os quais levam à morte celular em poucas horas. Este processo tem importantes implicações no entendimento do câncer e no seu tratamento⁴⁶. É caracterizada morfológicamente pela condensação da cromatina, perda do volume e aumento da granulosidade celular, manutenção da estrutura das organelas, formação de pregas na membrana plasmática e, conseqüente, fragmentação celular em corpos apoptóticos e, bioquimicamente, pela fragmentação do DNA em fragmentos oligonucleossomais⁴⁷. Os corpos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos teciduais e digeridos sem ocasionar qualquer reação inflamatória. Recentemente foi demonstrado que a fagocitose de células apoptóticas inibe a secreção de moléculas pró-inflamatórias pelos macrófagos⁴⁸. Por outro lado, na necrose, o aumento do volume intracelular, a cariólise e a lise da célula, com conseqüente extravasamento do conteúdo citoplasmático, ocasiona uma reação inflamatória local^{49,50,51,52}.

A homeostase de células normais em vários organismos é o resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada (apoptose). Ao contrário, as neoplasias têm sido caracterizadas pelo aumento excessivo de células tumorais, devido a falhas entre um ou mais dos três componentes referidos acima⁵³. A desordem de ambos os processos de apoptose ou divisão celular representa um importante papel na tumorigênese. Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas sinalizações e de componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, os quais culminam na autodestruição celular. Quando esses mecanismos são alterados, em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e persistência do câncer⁵⁴.

1.3.1 Mecanismos Reguladores de Apoptose

A apoptose é regulada por uma série de eventos bioquímicos que levam à morte celular. Uma característica comum das células em processo de apoptose é a ativação de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominada Caspase (Cytosolic Aspartate-Specific Proteases).

As caspases constituem uma grande família de proteínas homólogas entre si, com atividade enzimática, contando até o presente com 14 membros bem caracterizados. A inibição da atividade das caspases, tanto por mutação quanto por ação farmacológica, pode impedir ou retardar a morte celular por apoptose. O mecanismo de ação das caspases é a clivagem de proteínas em um ou mais sítios, resultando na inativação funcional do substrato ou, alternativamente, a sua ativação⁵⁵.

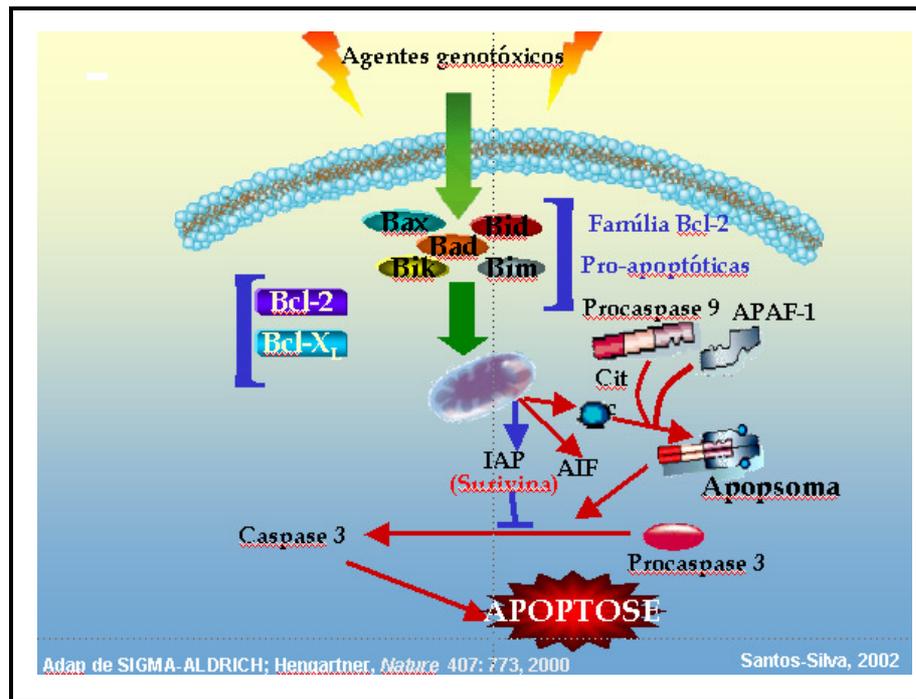
As caspases são sintetizadas como zimógenos inativos que se tornam ativos após a remoção de um pró-domínio terminal^{56,57,58} e se dividem basicamente em dois grupos. As caspases executoras, que são responsáveis pelo processo, têm como principal membro a caspase-3 que, entre outras funções, cliva a subunidade inibitória do DFF (DNA fragmentation factor), também chamada iCAD, libera a subunidade ativa desta molécula CAD (caspase-activated DNase), cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA, gerando os fragmentos oligonucleossomais característicos da apoptose⁵⁹. Outros substratos importantes incluem proteínas do citoesqueleto, tais como: fodrina, gelsolina, plectina e citoqueratina, cuja proteólise pelas caspases pode contribuir para o aparecimento das modificações na estrutura morfológica das células em apoptose. Além da caspase-3, as caspases-6 e -7 também são consideradas caspases executoras⁶⁰. O outro grupo é formado pelas caspases iniciadoras, do qual fazem parte as caspases-8, -10 e -9 e, possivelmente, a caspase-2, cujo papel principal é ativar as caspases executoras⁶¹. As caspases ativadas catalisam a clivagem de outras caspases que, por sua vez, ativam diversas proteases e endonucleases celulares promotoras de apoptose^{62,63}.

1.3.1.1 Mecanismo Intrínseco - Apoptose Mediada pela Mitocôndria

O processo de apoptose pode ter início por uma via intrínseca, a qual é iniciada pelo aparecimento de “sinais de estresse” provenientes do interior da própria célula. Radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, baixa

quantidade de nutrientes, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e concentrações elevadas de corticosteróides são alguns dos mecanismos que podem gerar estes sinais de estresse, cuja natureza bioquímica permanece em grande parte obscura.

Esta via é mediada pela liberação do citocromo c pela mitocôndria, como mostra o Esquema 1. Uma série de eventos bioquímicos leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que resulta na liberação do citocromo c, além de outras proteínas pró-apoptóticas, como o SMAC/Diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point), e o fator indutor de apoptose AIF (Apoptosis-Inducing Factor)^{64,65}. O AIF é uma flavoproteína com potente, mas relativamente controversa, atividade apoptótica. Esta molécula migra da mitocôndria para o núcleo da célula em condições de apoptose e induz à condensação de cromatina e fragmentação de DNA, independentemente da ativação de caspases⁶⁶. Após a liberação do citocromo c, entretanto, o processo de ativação da caspase, em forma de cascata, é irreversível^{67,68}. A formação de um complexo protéico contendo citocromo c, fator ativador de protease apoptótica APAF 1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) e caspase-9, ativada por ATP, é denominado apoptosoma executor⁶⁹.

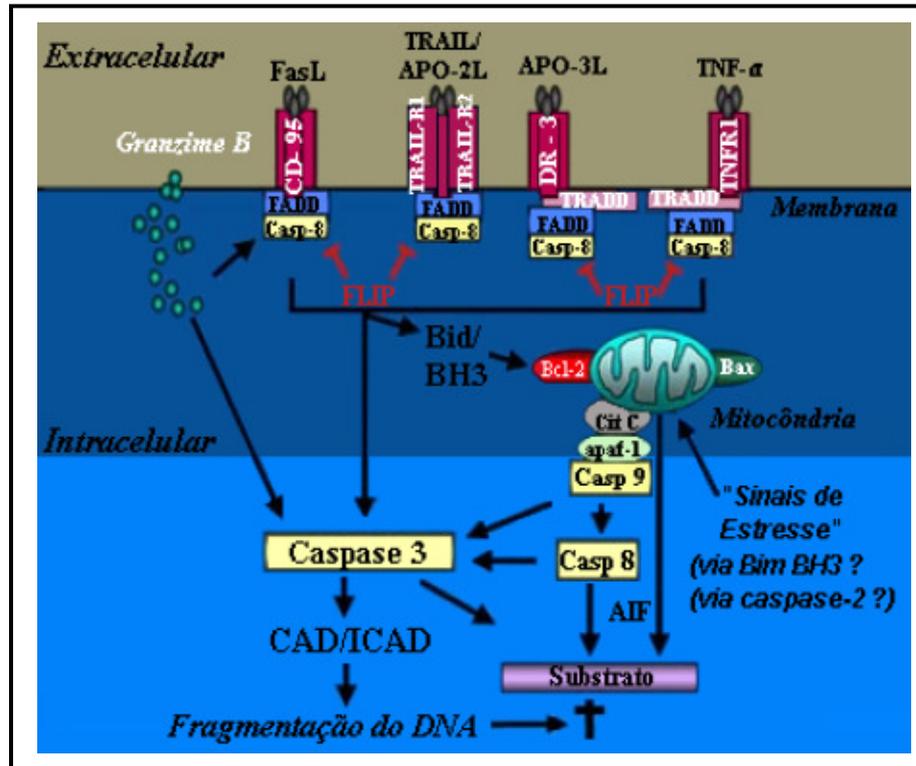


Esquema 1: Sinalização intracelular da apoptose. Bax, Bid, Bik, Bim, Ead, proteínas da família Bcl-2 apoptótica; Bcl-2, Bcl-XL, proteínas da família Bcl-2 antiapoptótica; Citocromo c, APAF-1, fator ativador de caspase, Survivina e AIF.

1.3.1.2 Mecanismo Extrínseco - Apoptose Ligada a Receptores

A apoptose pode ter início por uma via extrínseca, a qual começa com a ligação de moléculas sinalizadoras e seus receptores, denominados Receptores de Morte - DR (Death Receptors), cuja família é composta pelas moléculas Fas (CD95), TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Tais moléculas sinalizadoras possuem receptores cognatos localizados na superfície celular, entre os quais: (1) ligante Fas (FasL) ao receptor Fas (CD95)^{70,71}; (2) ligante fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ao receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1)^{72,73}; (3) ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF (TRAIL/APO 2-L) aos receptores TRAIL/R dos tipos 1 e 2^{63,74}; (4) ligante APO 3-L ao receptor DR3⁷⁵. Após a ligação das moléculas proteicas sinalizadoras aos seus respectivos receptores, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, relacionadas ao domínio de morte associado ao Fas (FADD Fas-associated death domain)^{76,77,78}, e proteínas adaptadoras, relacionadas ao domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD TNF receptor associated death domain)^{79,80}, para formar complexos sinalizadores de indução de morte (DISC death-induced signalling complex)^{81,82,83}. Com a formação do complexo DISC, dá-se início a ativação sequencial das caspases, o qual, quando se liga a caspase-8 e ou -10, forma o apoptosoma iniciador. Assim, as caspases

iniciadoras serão ativadas e, por sua vez, poderão acionar diretamente as caspases executoras ou gerar sinais que irão acoplar-se à via intrínseca, atingindo bioquimicamente o conjunto de mitocôndrias⁸⁴, como mostra o Esquema 2.



Esquema 2: Representação da apoptose e seus principais mediadores (Adaptado de: www.uni-ulm.de/.../aktuell0308/index.html). Acesso em: 11 de outubro de 2006.

1.3.2 Fatores Reguladores de Apoptose

A demonstração de que muitos agentes antineoplásicos induzem à apoptose, sugere a possibilidade de que fatores que afetam a ativação e a atividade da caspase devam ser importantes determinantes na sensibilidade de drogas anticâncer.

A formação do apoptosoma iniciador pode ser bloqueada por um competidor da ligação entre as caspases iniciadoras e as moléculas adaptadoras. Este competidor, denominado FLIP (Fas-associated-like inhibitory protein), apresenta uma alta homologia estrutural com as próprias caspases. Porém, apresenta o sítio catalítico inativo. Sua presença, portanto, contribui para o bloqueio da sinalização pelos receptores de morte⁸⁵.

Na mitocôndria, somente a etapa de permeabilização da membrana mitocondrial é regulada, onde membros de uma família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 podem parar o processo que leva à morte por apoptose⁸⁶. Nesta família existem membros pró-apoptóticos, tais como: Bax, Bak, Bok, Diva, Bcl-x_S, Bik, Bim, Hrk, Nip3, Nix, Bad e Bid; e membros inibidores da apoptose, como: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, Nr13 e A1/Bfl-1^{87,88}, os quais exercem uma regulação mútua⁵². O predomínio das moléculas pró-apoptóticas pode ocorrer por diversos mecanismos, entre eles o aumento na quantidade relativa destes membros e alterações na localização subcelular e na fosforilação de sítios específicos destas moléculas⁸⁹.

Em condições normais, o equilíbrio entre as duas classes de proteínas influencia no resultado final, no qual a célula é induzida à apoptose ou não. Entretanto, o desequilíbrio entre Bcl-2 e Bax leva à resistência ou à sensibilização por estímulos de morte, tais como drogas quimioterápicas. No câncer, o desequilíbrio é em favor da inibição, como pode ser observado no clássico exemplo dos linfomas, em que a translocação t(14:18) resulta na superexpressão de Bcl-2 (do inglês B-cell lymphoma), com conseqüente inibição da apoptose. O gene Bcl-2 foi o primeiro proto-oncogene cujo mecanismo de ação, ao contrário dos classicamente descritos, não promove a proliferação celular, mas age suprimindo a morte celular por apoptose⁹⁰.

O mecanismo de ação da proteína Bcl-2 ainda não está totalmente esclarecido, mas há evidências experimentais indicando que ela age na mitocôndria. Estas são reforçadas pelas evidências da localização mitocondrial da proteína Bcl-2, a qual leva a hipótese de seu funcionamento como um canal iônico, como modulador da atividade de caspases ou como inibidor da liberação de citocromo c, pelas mitocôndrias⁹¹. Entretanto, a superexpressão de

Bcl-2 tem emergido como um fator de mau prognóstico nos pacientes com leucemia aguda^{92,93}.

Por outro lado, alterações na proteína Bax mudam as respostas clínicas à quimioterapia e à radioterapia, pois os danos causados por esses agentes não são capazes de induzir resposta ao estresse causado na presença de Bax mutado⁵⁴. A proteína Bcl-x_L, que também exerce uma atividade antiapoptótica, é induzida em casos de translocações t(9;22) que geram o oncogene bcr/abl. O produto BCR/ABL é caracteristicamente expresso na leucemia mielóide crônica, cujas células exibem uma aumentada resistência à apoptose⁹¹.

Ao contrário dessas proteínas, membros de uma família de proteínas inibidoras de apoptose - IAP (Inibitors of Apoptosis Proteins), atuam como moléculas anti-apoptóticas, a partir da inibição da ativação proteolítica da caspase-3 e -7^{94,95,96,97,98}. Cinco diferentes membros da família das IAPs já foram descritos: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e survivina^{96,97,99,100}. Alguns membros da família de proteínas IAP são expressos em certos cânceres humanos e, portanto, a remoção de seus efeitos inibitórios parece ser potencialmente útil na sensibilização das células neoplásicas para o efeito dos agentes anticâncer¹⁰¹. O membro, mais recentemente identificado, da família de proteínas IAP, que influencia o equilíbrio entre morte/viabilidade celular, denominado de survivina, foi descrito por Ambrosini et al (1997)⁹⁹. Essa proteína está presente durante o desenvolvimento embrionário e fetal¹⁰². No entanto, não foi detectada em tecidos adultos normais. Além disso, foi observado que há superexpressão dessa proteína em vários cânceres humanos, *in vivo*^{99,104,105,106,107}. Recentes estudos demonstraram que a survivina suprime a apoptose induzida por Fas, Bax, caspases e drogas anticâncer¹⁰³.

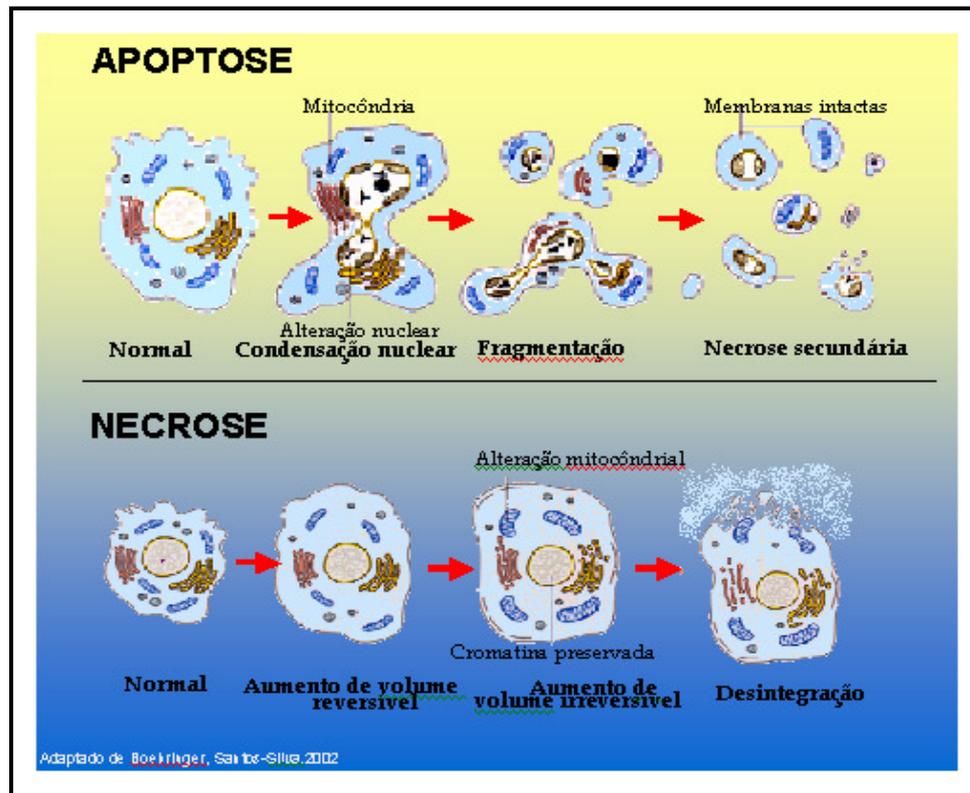
Outros estudos apontam que a expressão de survivina é dependente do ciclo celular. Durante a proliferação celular, a survivina é expressa em altos níveis na fase G₂M e está rapidamente diminuída após a parada do ciclo celular⁸⁸. A regulação do ciclo celular é realizada através de uma cascata de reações de fosforilação, desfosforilação, síntese e degradação de proteínas-chave. Essas proteínas são responsáveis pela regulação de um complexo sistema que controla a proliferação, o repouso, a diferenciação e a morte celular. Além disso, altos níveis de expressão de survivina têm sido ligados ao mau prognóstico e a diminuição da sobrevida em vários tipos de câncer humano^{104,105,106,107}.

Há evidências na literatura de que grande parte dos quimioterápicos utilizados na clínica induzem morte celular por apoptose ou alteram processos intracelulares, que convergem a ela. O entendimento da sinalização intracelular que induz à apoptose é

importante para o conhecimento dos possíveis alvos na intervenção terapêutica, e para o esclarecimento dos mecanismos de resistência a drogas^{108,109}.

1.3.3 Alterações Celulares e Identificação de Células em Apoptose

As células em processo de apoptose apresentam modificações em sua morfologia, as quais ocorrem de maneira coordenada no núcleo, no citoplasma e na membrana citoplasmática, como mostra o Esquema 3. Após o estímulo indutor, o tempo necessário para desencadear o processo é invariável, bem como o tempo decorrido entre o início e o término. De modo geral o processo é bastante rápido⁹¹. Inicialmente, as células perdem o contato com as células vizinhas e se arredondam, e o volume celular se reduz, essencialmente por perda de água e íons⁴⁹. As outras organelas citoplasmáticas mantêm intacta a sua morfologia. No núcleo, ocorre condensação da cromatina formando grumos junto à membrana nuclear e, seqüencialmente, a membrana celular passa a formar protuberâncias (blebs), que aumentam progressivamente e englobam porções do núcleo, formando os chamados corpos apoptóticos^{110,111,112}.



Esquema 3: Alterações celulares na apoptose/necrose.

Além das alterações morfológicas, a quebra do DNA é outra característica deste tipo de morte celular. A ativação de uma endonuclease, que quebra o DNA nos nucleossomas, dá origem a um padrão de fragmentação característico que, quando separado em gel de agarose, produz um padrão de quebra internucleossomal repetitivo, presente na grande maioria das células em apoptose. Ao contrário, no processo de necrose o DNA é quebrado em sítios inespecíficos, e sua fragmentação não gera qualquer padrão repetitivo¹¹³.

A mudança nas células apoptóticas, responsável pelo seu reconhecimento mais precoce, é a translocação de resíduos de fosfatidilserina à face externa da membrana plasmática, que fisiologicamente se encontram na face interna da bicamada lipídica das células^{114,115,116}. Assim, o diagnóstico da morte por apoptose é feito pelo tipo de alteração estrutural que uma célula sofre, pelo padrão de quebra de seu DNA e pela evidência das caspases envolvidas.

Dados recentes da literatura demonstram que a fagocitose de células apoptóticas inibe a secreção de moléculas pró-inflamatórias pelos macrófagos⁴⁸. O fato de as células apoptóticas serem rapidamente fagocitadas e digeridas explica a dificuldade do seu reconhecimento in vivo, enquanto que em culturas in vitro, de células isoladas, este fenômeno

é mais facilmente perceptível. O avanço nesta área fez com que surgisse um grande número de técnicas específicas para o diagnóstico *in situ* de apoptose¹¹⁰.

Assim, através de estudos da morfologia e da imunocitoquímica de biópsias de tumores humanos, bem como em modelos animais e em cultura de células, vêm surgindo evidências de que a progressiva resistência à apoptose é uma das características marcantes da grande maioria dos cânceres¹¹³.

1.4 Derivados do Ácido Gálico

Os flavonóides são compostos fenólicos constituintes da parte não energética da dieta humana. São encontrados em vegetais, sementes, frutas e bebidas, como o vinho e a cerveja. Já foram identificados mais de 5.000 flavonóides diferentes¹¹⁷. Em princípio, foram consideradas substâncias sem ação benéfica para a saúde humana. Porém, mais tarde, foram demonstrados vários efeitos positivos, devido à sua ação antioxidante e eliminadora de radicais livres^{118,119}. Ainda, diversos estudos indicam que alguns flavonóides possuem ações pró-oxidantes, as quais são produzidas somente em altas doses, constatando-se, na maioria das investigações, a existência de efeitos antiinflamatórios, antivirais e seu papel protetor em enfermidades cardiovasculares, câncer e diversas patologias^{120,121}.

Um interesse especial por estes compostos deve-se ao fato de serem comumente usados como antioxidantes, na forma de aditivos alimentares, codificados pela Comunidade Européia como E-310 (propil galato), E-311 (octil galato) e E-312 (lauril galato)¹²².

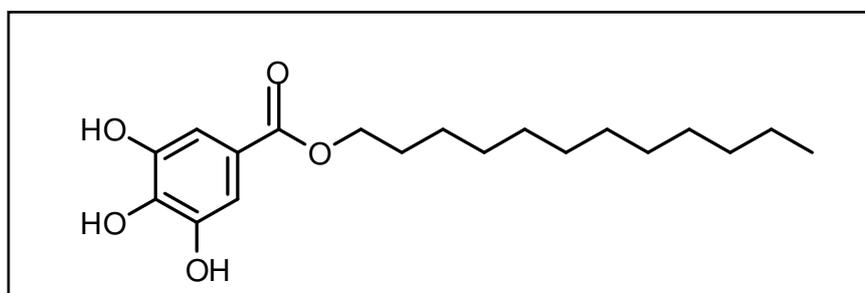
Recentemente, vários ácidos fenólicos, como o ácido cafeico e derivados do ácido gálico, têm sido alvo de estudos, por sua propriedade antioxidante e sua implicação na prevenção de doenças como o câncer^{123,124}, e desordens inflamatórias¹²⁵. Estes tipos de compostos têm apresentado algumas atividades biológicas relevantes, como: antibacteriana, antiviral e propriedades antiproliferativa e citotóxica, em várias células tumorais^{126,127,128,129}.

Os efeitos antiproliferativos, por meio de apoptose, induzidos por agentes fenólicos em várias células de linhagens de câncer, têm sido explicados por sua ação na topoisomerase¹³⁰, inibição da fosfatidilinositol-3-kinase¹²⁹ ou na parada do ciclo celular¹³¹. Estudos bioquímicos, realizados com derivados do ácido gálico, demonstraram que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e Ca^{2+} intracelular têm um importante papel no início da via de sinalização de apoptose, induzida pelo ácido gálico^{125,132}. Kazuto et al (2001) sugerem diferentes vias de sinalização de apoptose entre os derivados do ácido gálico,

demonstrando, em seus estudos, que a ativação da caspase-3, seguida da elevação intracelular de Ca^{2+} , pela ação de alguns derivados do ácido gálico (3,4-methylenedioxyphenyl 3,4,5-trihydroxibenzoate e S-(3,4-methylenedioxyphenyl)3,4,5-trihydroxithiobenzoate), independe das espécies reativas de oxigênio¹³³. Também foi demonstrado que a toxicidade associada a alguns compostos fenólicos é mediada por sua atividade oxidativa¹³⁴, a qual pode acelerar o dano oxidativo in vitro no DNA, nas proteínas e carboidratos¹³⁵. Entretanto, uma outra possibilidade, insuficientemente investigada, associa o mecanismo de citotoxicidade do fenol com suas propriedades pró-oxidantes¹³⁶. Dependendo da estrutura, dose, marcador molecular e meio ambiente, os fenóis podem estimular ou inibir o processo de dano oxidativo¹³⁷. Certamente, acredita-se que os fenóis podem se comportar como ambos, antioxidantes ou pró-oxidantes^{136,138}, e que seu potencial inibitório no crescimento e proliferação de certas células malignas in vitro está fortemente relacionado com suas características estruturais^{136,139,140}.

1.4.1 Dodecil Galato (Lauril Galato)

O ácido gálico, frequentemente encontrado como um componente de taninos hidrolisáveis em plantas, consiste em uma estrutura fenólica trihidroxilada¹⁴¹. Pode ser obtido através da hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis^{141,142} e seus derivados sintetizados quimicamente^{143,144}. O termo “galato” geralmente se refere aos ésteres do ácido gálico, propil, octil e dodecil. O dodecil galato, de nome químico n-dodecil (ou lauril) éster ou 3,4,5-ácido trihidroxibenzoico e fórmula estrutural (Esquema 4), e empírica $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5$, é também conhecido como lauril galato.



Esquema 4: Fórmula estrutural do lauril galato.

Alterações químicas na molécula do ácido gálico podem modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição e o grau de ionização. Conseqüentemente, estas alterações afetam o efeito biológico, modificando sua afinidade por alvos celulares e a difusão através das membranas lipídicas¹⁴⁵.

Estudos recentes têm demonstrado que o ácido gálico e seus alquil ésteres (metil, propil, octil e lauril) induzem à apoptose diferentes linhagens celulares, e que os membros mais hidrofóbicos (octil e lauril galato) exibem um potencial próapoptótico, entre 50 e 250 vezes maior que o próprio ácido gálico, para as diferentes linhagens de células tumorais¹⁴⁶. Gomes et al (2003) observaram que derivados do ácido gálico apresentam efeito citotóxico e antiproliferativo distinto entre diferentes linhagens de células tumorais e leucemia linfoblástica, e que esse efeito está relacionado com a estrutura-atividade de seus derivados¹⁴⁷.

Entretanto, Savi et al (2005) demonstraram que há correlação direta entre o aumento da cadeia alifática lateral na molécula do ácido gálico, aumento de lipofilicidade e atividade anti-herpética¹⁴⁸. Kouichi et al (2000) demonstraram que os derivados do ácido gálico com grupo lipofílico (farnesil galato hidrogenado, lauril galato, laurilamide e colesteril galato) apresentam habilidade para induzir à apoptose células de leucemia monoblástica humana U937. Seus resultados sugerem que os derivados lipídicos podem aumentar a atividade indutora de apoptose do ácido gálico, dependendo da sua estrutura¹⁴⁹.

Também foi demonstrada uma seletividade para células de crescimento rápido, o que indica a possibilidade de seu estudo como um potente agente antitumoral¹⁴⁶.

O primeiro caso de leucemia foi descrito há mais de 100 anos e, apesar das inovações tecnológicas, ainda não se tem uma solução definitiva para a sua cura. A morbidade associada aos quimioterápicos, relacionada com a alta toxicidade para as células normais, constitui um obstáculo significativo nos tratamentos antileucêmicos. Nas duas últimas décadas, a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de fármacos antineoplásicos, que tenham maior eficiência em induzir à morte as células tumorais, e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais³⁵.

Por isso, o interesse em novos alvos terapêuticos, a partir de produtos naturais, cresceu exponencialmente nos últimos anos.

Em geral, os fármacos antitumorais foram descobertos através de triagens de substâncias químicas, sintetizadas a partir de produtos naturais e avaliadas em modelos experimentais em animais ou *in vitro*, com cultura de células tumorais, principalmente células leucêmicas murinas. A indústria farmacêutica, motivada em parte pela descoberta de

quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velbana[®]), vincristina (Oncovina[®]), podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepesidea[®]) e teniposídeo (VM-26; Vumona[®]), camptotecina e taxol (plaxitaxel; Taxola[®]), reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional¹⁵⁰.

O desenvolvimento de fármacos, a partir de produtos naturais, incorporou profundas transformações no decorrer das últimas décadas. Com o avanço da biologia molecular, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo, assim, diversos novos alvos micro e macromoleculares passíveis de intervenção terapêutica.

Vários compostos quimioterápicos têm sido estudados por induzir à apoptose, revelando ser este um mecanismo primário de sua atividade anticâncer^{44,45}. A apoptose é geralmente desencadeada por agentes químicos e físicos¹⁵¹, como oxidantes. Enquanto que compostos antioxidantes são responsáveis pela proteção celular^{152,153}. No entanto, o ácido gálico, com propriedades antioxidantes conhecidas, tem sido apontado por induzir apoptose em diferentes células de linhagem humana^{154,155}. Estudos mais recentes têm demonstrado que ésteres do ácido gálico são mais eficazes, como o lauril galato que é entre 50 e 250 vezes mais efetivo que o ácido gálico, na inibição da proliferação e indução de apoptose em células de linhagem de linfoma e de carcinoma de cólon¹⁴⁶, câncer de mama¹⁵⁶, leucemia promielocítica¹⁵⁴ e em células de leucemia monoblástica humana U937¹⁴⁹. Além disso, este composto mostra baixa toxicidade para células de tecidos normais¹²² e boa especificidade para células de crescimento rápido, como células tumorais^{146,157,158}. Entretanto, o mecanismo pelo qual os ésteres do ácido gálico induzem à apoptose, em algumas células de linhagem, não está completamente esclarecido.

Como visto, alguns trabalhos têm analisado o papel do ácido gálico e seus derivados na morte celular, mas os resultados ainda são conflitantes, pois em algumas situações esses compostos ativam vias de transdução de sinais que levam à apoptose ou necrose, enquanto que em outros casos, como antioxidantes, protegem as células da apoptose. Essa propriedade dualista parece depender do tipo celular e da cadeia alifática lateral introduzida na molécula do ácido gálico. Neste sentido, a investigação do mecanismo molecular envolvido no efeito citotóxico dos compostos sintéticos derivados do ácido gálico sobre células leucêmicas pode abrir novos horizontes no tratamento terapêutico das leucemias agudas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a sensibilidade de células de leucemia mielóide aguda humana K-562 ao composto sintético derivado do ácido gálico - lauril galato - bem como os mecanismos citotóxicos envolvidos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito citotóxico do composto derivado do ácido gálico - lauril galato - sobre células de leucemia mielóide aguda humana K-562;
2. Verificar o tipo de morte celular causada pelo composto derivado do ácido gálico - lauril galato;
3. Investigar o envolvimento dos fatores reguladores de apoptose: Caspase-3, Proteína Inibidora de Apoptose Survivina; Proteína Antiapoptótica Bcl-2 e Fator Indutor de Apoptose na citotoxicidade do composto derivado do ácido gálico - lauril galato;
4. Analisar o efeito do composto derivado do ácido gálico - lauril galato no ciclo celular das células de leucemia mielóide aguda humana K-562.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O meio de cultura RPMI 1640, a penicilina, a estreptomicina e o soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco, NY, EUA. O dimethylsulfoxide (DMSO), da SIGMA Chemical, Co., Saint Louis, MO, EUA. O composto sintético n-alkil-éster, derivado do ácido gálico, Galato de dodecila (Lauril galato), foi sintetizado e doado pelo laboratório Prof. Dr. Rosendo A. Yunes, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O Iodeto de propídeo (PI), adquirido da Molecular Probes Inc., foi armazenado entre 0-4°C, como solução estoque de 1 mg/mL, em água destilada, e diluído no momento do uso. A solução de Hanks (HBSS; Hank's Buffered Salt Solution), diluída em água Milli-Q, pH 7,4, filtrada e conservada em alíquotas, a -20°C, e o tampão PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7,4, foram obtidos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA. A enzima Rnase (ConcertTM RNase A), na concentração de 20 mg/ml, adquirida da Invitrogen. O kit para detecção de apoptose, conjugada a ANNEXIN V-FITC®; o reagente 3-aminopropyltriethoxysilene (ATPS), preparado a 5%; o etanol, 95%; o PBS-TRITON 0,2% (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4), todos foram adquiridos da SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA. O Anticorpo policlonal de coelho anti-caspase-3 (CPP32), da Novocastra, United Kingdom. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-survivina e anticorpo policlonal de coelho anti-proteína indutora de apoptose (AIF), da Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EUA. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-oncoproteína Bcl2, da Biogenex, San Ramon, CA. A solução comercial para diluição de anticorpos, da Dako, Carpinteria, CA, EUA, composta por TRIS-NaCl (Tris Base 13,9g, Tris-HCl 60,6g, NaCl 87,66g, pH 7,6). Anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado a peroxidase (EN VISION PLUS, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). O kit para revelação colorimétrica, da Dako Cytomation, Carpinteria. O Xilol, o etanol, o azul de metileno segundo May-Grünwalds, o azul de metileno segundo Giemsa, a hematoxilina de Harris e ENTELLAN® da MERCK, Darmstadt, Germany.

3.2 Cultura de Células

Foi utilizada a linhagem de células leucêmicas mieloblásticas K562, de origem humana. A continuidade da linhagem celular K562 foi estabelecida por Lozzio e Lozzio (1975), obtida da efusão pleural de uma mulher de 53 anos de idade, com leucemia mielóide crônica, em crise blástica terminal¹⁵⁹. A linhagem celular foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de 10⁶ células/garrafa e repicadas a cada 48 horas, em fluxo laminar.

3.3 Preparo da Amostra

Para a realização dos experimentos, a suspensão celular foi centrifugada com uma rotação de 230 x g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspenso em meio de cultura RPMI, para uma concentração de 1,0 x 10⁶ células/mL. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de tripan¹⁶⁰, a 0,5%, em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), pH 7,4, na proporção de 1/1. Após homogeneização, a mistura foi analisada no microscópio ótico, com objetiva de 20X, e foram excluídas as amostras com viabilidade inferior a 80%. Todos os procedimentos de preparação da amostra foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado, previamente esterilizado.

3.3.1 Tratamento da Amostra

A solução estoque de lauril galato foi preparada em dimetil sulfóxido (DMSO) e, após, diluída nas concentrações de 10, 30, 100 e 200 µM, em meio de cultura RPMI para, então, ser adicionada às células, num volume máximo de 20 µl, seguido de nova incubação em estufa úmida a 37°C, em 5% de CO₂, por um período de 12, 24 ou 48 horas, conforme o tipo de experimento. Um controle negativo, sem tratamento com lauril galato, foi realizado em todos os experimentos. A concentração média de DMSO nas culturas não excedeu 0,2% e, portanto, não afetou a viabilidade celular.

3.4 Medida da Citotoxicidade pelo Ensaio da Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (Van Loosdrecht *et al.*,1991)¹⁶¹. O MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio, que é reduzido a um derivado formazan de cor azulada pela atividade oxidativa de células, funcionando, portanto, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Depois do tratamento das células com lauril galato, nas concentrações de 10, 30, 100 e 200 μ M, por um período de 12, 24 ou 48 horas, conforme descrito no tratamento da amostra, foi realizado o ensaio da viabilidade celular. Após a incubação, a placa foi centrifugada, o sobrenadante removido e, então, adicionado meio de cultura fresco contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Após a incubação por 3 horas, a 37°C, a placa foi centrifugada novamente e o sobrenadante, removido. Em cada poço, foram adicionados 100 μ l de álcool isopropílico/HCl 0,04 N, para dissolução dos cristais de formazan do MTT. Após 10 minutos, os restos celulares foram removidos por centrifugação. O sobrenadante límpido foi, então, transferido para outra placa, onde foi lido em leitor de placas Microwell Systems (Organon Teknika), a 540 nm. A densidade óptica do grupo de células controle, ou seja, das células sem tratamento, foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Desse modo, quanto maior o número de células viáveis presentes, maior a oxidação do MTT.

3.5 Análise da Fragmentação do DNA

A análise da fragmentação do DNA foi realizada segundo a técnica de Han¹⁶². Após o tratamento com lauril galato por 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂, as células de linhagem leucêmica mielóide aguda humana K562 foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente, as células foram lisadas com tampão de lise (10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25% NP-40, 0,5 g/L proteinase K), por 2 horas, a 50°C. O lisado celular foi centrifugado com uma rotação de 230 x g, por 15 minutos. Ao sobrenadante, foram adicionados 2,5 vol. de etanol gelado e incubado overnight, a -25°C, para precipitação do DNA. Depois de lavar com etanol gelado a 70% , os pellets foram obtidos por centrifugação com uma rotação de 18.000 x g, por 15 minutos, e dissolvidos em 20 μ L de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA), contendo 0,6mg/mL de RNase A, e incubados a 37°C, por 1 hora. A fragmentação do DNA foi analisada após eletroforese em gel de agarose 1,5%, corada com brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi realizada a 200V por 10

minutos em tampão TAE 1x (tris-ácido acético-EDTA). Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-Macro Vue UV20) utilizando-se um sistema de foto-documentação de géis (Doc-Print[®]-Biosystems).

Foram realizados três experimentos independentes, utilizando como controle uma amostra sem tratamento com lauril galato.

3.6 Detecção das Alterações Citomorfológicas

As células em processo de apoptose apresentam características morfológicas distintas, as quais são definitivas para a diferenciação do tipo de morte celular. A avaliação morfológica para células apoptóticas, segundo McGahon *et al* (1995)¹⁶³, leva em consideração a redução do volume celular, pela perda do contato com as células vizinhas, retração nuclear com condensação da cromatina e formação de protuberâncias na membrana celular, as quais englobam o núcleo, com conseqüente formação dos corpos apoptóticos.

3.6.1 Preparação de Lâminas (*Cytospins*)

As células de linhagem leucêmica mielóide aguda humana K562, foram tratadas com lauril galato, conforme descrito anteriormente por 12 e 24 horas. Em seguida, preparou-se uma suspensão celular na concentração $1,0 \times 10^6$ células/mL, em meio de cultura RPMI, e empregou-se 150 μ L de suspensão para a preparação de cada citocentrifugado (*cytospin*), em uma citocentrífuga (CYTOPROTM – Wescor) com uma rotação de 10 x g, por 10 minutos. Após a confecção dos *cytospins*, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 a 2 horas para a secagem e, em seguida, coradas pelo método de May-Grünwalds Giemsa.

3.6.2 Coloração pelo Método de May-Grünwalds Giemsa

A coloração pelo método de May-Grünwalds Giemsa¹⁶⁴ é usada para análise das características morfológicas das células do sangue. A utilização de duas classes de corantes - básico (azul de metileno) e ácido (eosina) - permite diferenciar as estruturas celulares. Núcleo e outras estruturas da célula sangüínea são corados por corantes básicos e, então, denominados basofílicos. Estruturas coradas somente por corantes ácidos são chamadas acidofílicas ou eosinofílicas. Enquanto estruturas coradas pela combinação dos dois tipos de corantes são denominadas neutrofílicas¹⁶⁵.

Após secagem ao ar, as lâminas foram coradas por 3 minutos, com solução de May-Grünwalds, seguida do acréscimo de água destilada em quantidade proporcional ao corante, por mais 3 minutos. Após lavagem das lâminas com água destilada, acrescentou-se solução de Giemsa, diluída (1:10) em água destilada, por 15 minutos. As lâminas foram secas ao ar livre para posterior avaliação microscópica.

3.6.3 Avaliação Microscópica

O estudo citomorfológico foi realizado no microscópio ótico Eclipse 50i (Nikon INC, Tóquio, Japan), em aumento de 1000X. As fotos foram realizadas pelo sistema Digital Sight DS-U1 (DS Câmera Control Unit DS-U1). Foram contadas 100 células em cada lâmina analisada e os resultados representam a média de três experimentos independentes. A avaliação morfológica para células apoptóticas seguiu o critério de McGahon *et al* (1995), no qual são observadas as seguintes alterações: retração nuclear e condensação da cromatina; perda do volume e aumento da granulosidade celular; formação de pregas na membrana plasmática e fragmentação celular em corpos apoptóticos¹⁶³.

3.7 Detecção de Apoptose Conjugada a Anexina V-FITC

Para detecção de apoptose, foi utilizado o conjunto reativo ANNEXIN V-FITC® contendo anexina V-FITC, iodeto de propídeo e tampão (SIGMA Chemical, Co., St. Louis, MO, EUA), que detecta células apoptóticas por citometria de fluxo. As anexinas são um grupo de proteínas homólogas, que se ligam a fosfolipídeos na presença de cálcio^{166,167}. A anexina V, conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), é um conjunto fluorescente que se liga a fosfatidilserina, na presença de cálcio. As alterações celulares envolvidas no processo de apoptose incluem a perda da assimetria fosfolipídica durante os estágios iniciais, enquanto que, nas células viáveis, a fosfatidilserina é transportada para o interior da camada bilipídica pela enzima Mg-dependente, aminofosfolipídeo translocase¹⁶⁸. No início da apoptose, a fosfatidilserina, que normalmente é encontrada na porção interna da membrana plasmática, é translocada à porção externa da membrana. A conjugação do corante FITC à anexina-V¹¹⁴ permite identificar e quantificar as células apoptóticas, através da citometria de fluxo¹⁶⁹. A utilização concomitante do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídeo (PI), por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose⁵¹. O procedimento consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células, no

processo final da apoptose. A anexina V-FITC é detectada como uma fluorescência verde e o iodeto de propídeo, como fluorescência vermelha.

As células de linhagem leucêmica mielóide aguda humana K562 foram tratadas com lauril galato, na concentração de 200 μ M, e incubadas por 12 e 24 h, como descrito anteriormente. Após esse período, a suspensão celular foi centrifugada com uma rotação de 230 x g, 10 minutos, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS gelado. Ao botão celular foi acrescentado 100 μ L de solução de anexina, conforme indicação do fabricante, seguida de nova incubação de 15 min, a 37°C, ao abrigo da luz. Ao final, as células foram lavadas e ressuspensas com 100 μ L de solução tampão, seguidas de posterior análise no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), através do software BD CELLQuest™. Para calibração do citômetro, foi utilizado o Kit CaliBRITE Beads™. A fluorescência do FITC (518 nm) foi detectada por FL1 e o iodeto de propídeo (629 nm) foi detectado por FL2. A sobreposição entre as duas medidas de fluorescência foi eletronicamente compensada para subtração análoga, no estágio de pré-amplificação¹⁶⁶. O logaritmo da fluorescência FITC foi distribuído no eixo X e o logaritmo da fluorescência do iodeto de propídeo, no eixo Y. Um total de 10.000 eventos para cada amostra foi adquirido, para garantir a análise adequada dos dados. As células no estágio inicial do processo de apoptose foram coradas somente pela anexina V-FITC. As células viáveis não mostraram coloração para ambos, iodeto de propídeo ou anexina V-FITC. As células em estágio final do processo de apoptose foram coradas por ambos, iodeto de propídeo e anexina V-FITC. Foram realizados três experimentos independentes, utilizando como controle amostra sem tratamento com lauril galato, sob as mesmas imunocitoquímicas condições da amostra tratada com lauril galato.

3.8 para Caspase-3 (CPP-32), Proteína Inibidora de Apoptose Survivina, Bcl-2 e Proteína Indutora de Apoptose (AIF)

As reações de imunocitoquímica foram realizadas como descrito por Dowell, 1994¹⁷⁰. Após o tratamento com o lauril galato por 12 e 24 horas, as células de linhagem leucêmica mielóide aguda humana K562 (1×10^6 células/mL) foram centrifugadas em citocentrífuga (CYTOPRO™ – Wescor), em lâminas pré-tratadas com solução de 3-aminopropyltriethoxysilene (ATPS), a 5%, em acetona PA. Depois, foram fixadas com etanol 95%, por 1 hora, a 25°C, e mantidas úmidas até o início da reação. Após fixação, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio, a 1,5%, e metanol absoluto (v/v), por 20 min, com posterior lavagem com água destilada. Esta etapa teve como objetivo

bloquear a peroxidase endógena das células e, assim, eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas à permeabilização celular, para permitir a passagem do anticorpo primário através da membrana plasmática celular e conseqüente reconhecimento dos sítios antigênicos de interesse. Para este fim, as lâminas foram imersas em uma solução de PBS-TRITON 0,2%, durante 30 min. Depois, as proteínas celulares foram imunomarcadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal de coelho anti-caspase-3 (CPP32), (diluição 1:100, da Novocastra, United Kingdom), anticorpo monoclonal de camundongo anti-survivina (diluição 1:50, da Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anticorpo policlonal de coelho anti-proteína indutora da apoptose (AIF), na diluição 1:50, da Santa Cruz Biotechnology, Inc) e anticorpo monoclonal de camundongo anti-oncoproteína Bcl2 (diluição 1:200, da Biogenex, San Ramon, CA, EUA). Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos e um reagente comercial bloqueador de reação inespecífica foi utilizado. Após esta etapa, a solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os citocentrifugados e as lâminas foram mantidas em câmara úmida, a uma temperatura de 2-8°C, durante 12 horas. A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS, por duas vezes de três minutos cada, à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM, conjugado com um polímero de peroxidase pronto para uso em câmara úmida, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS, por 5 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride), previamente diluída em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio, a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas as contra-colorações das lâminas, com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através da passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, etanol 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em entellan. Para cada reação realizada foi utilizado um controle positivo (tecido sabidamente positivo para os diferentes antígenos pesquisados), e o controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário nas reações. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico comum Olympus BX 41 (Olympus América INC, Melville, NY, EUA), em aumento de 400X. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha (peroxidase), no local da marcação pelos anticorpos. Em cada caso foi avaliado o percentual de células positivas em 100 células de cada três experimentos independentes e o resultado expresso em score¹⁷¹, da seguinte forma:

(+++) a maioria das células exibe intensa expressão, (++) mais de 50% das células revela sinais de positividade, (+) coloração positiva em 10-50% das células e (-) menos de 10% de células positivas.

As fotografias foram realizadas no microscópio de Vídeo/foto Olympus (Olympus América INC, Melville, NY, EUA).

3.9 Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, o qual quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo celular¹⁷². Uma célula normal em repouso contém “n” cromossomos, ao receber um estímulo inicia o ciclo celular, aumentando a quantidade de DNA até atingir o dobro (2n) e então se dividir. As células apoptóticas por outro lado, apresentam um conteúdo de DNA reduzido resultante da fragmentação, “x<n”. A Fase G₀/G₁, é caracterizada pelas células em repouso apresentando uma quantidade de cromossomos “x = n”. A fase de síntese ou fase S é caracterizada pelo aumento do conteúdo de DNA “n< x <2n”. A Fase G₂/M é caracterizada pelo dobro do conteúdo de DNA da célula em repouso “x=2n”.

As células de linhagem leucêmica mielóide aguda humana K562 foram tratadas com lauril galato 200µM e incubadas por 12 e 24 horas. Posteriormente, as células foram lavadas com solução de Hank's e ressuspensas com uma solução contendo ribonuclease A (RNase A) 1mg/mL, iodeto de propídeo 50 µg/mL e 0,2% de Triton X e incubadas por 15 minutos no escuro. A análise do conteúdo de DNA foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCaliburTM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems), através do software BD CELLQuestTM. A aquisição dos dados foi realizada no modo de aspiração em baixa pressão (“low”). As fases do ciclo celular, bem como a percentagem de células apoptóticas foram determinadas de acordo com o conteúdo de DNA.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student não pareado, ou análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste “t” de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os dados gerados pelo citômetro de fluxo são armazenados de acordo com o formato padrão de citometria de fluxo (FCS), criado pela Society for Analytical Cytology¹⁷³. A análise

dos dados consiste em exibir os dados de um arquivo no formato de lista em um gráfico e, em seguida, medir a distribuição dos eventos dentro do gráfico. O programa fornece as estatísticas referentes aos dados analisados. As análises da citometria de fluxo foram realizadas através do software BD CELLQuest™ e do software *WinMDI version 2.8*.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito citotóxico do Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

O tratamento de células de leucemia mielóide aguda humana K562 por 48 h, com concentrações crescentes de lauril galato, um derivado sintético do ácido gálico, causou diminuição do número de células viáveis de maneira concentração-dependente (Figura 1, Painel A). O maior efeito citotóxico foi observado com a concentração efetora (EC_{50}) de 200 μ M de lauril galato ($47,7\% \pm 2\%$). A incubação das células K562 com lauril galato (200 μ M) em intervalos de tempos diferentes mostrou que o maior efeito citotóxico só foi observado em 48 horas (Figura 1, Painel B).

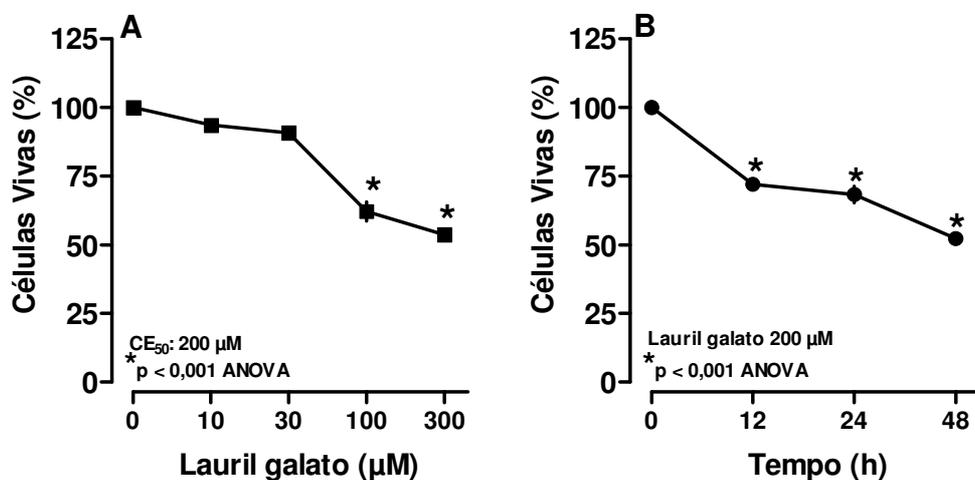


Figura 1. Efeito citotóxico do lauril galato sobre células K562. Painel A: efeito citotóxico concentração dependente. As células foram tratadas com lauril galato (10, 30, 100 e 300 μ M) por 48 horas. A EC_{50} foi de 200 μ M. **Painel B:** efeito citotóxico do lauril galato (200 μ M) sobre células K562. As células foram incubadas por 12, 24 e 48 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. A densidade ótica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de 3 amostras. A média dos resultados foi obtida de três experimentos independentes. * Estatisticamente diferente do controle $P < 0,05$, ANOVA seguida de teste t de Bonferroni.

4.2 Apoptose Causada pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

4.2.1 Detecção de Apoptose pela Análise da Fragmentação do DNA

Como mostra a Figura 2, não foi detectada fragmentação do DNA nas células não tratadas com lauril galato (banda 1 – controle negativo). Ao contrário, o lauril galato 200 μ M induziu a quebra internucleossomal da cromatina e formação de bandas de fragmentação do DNA, ao ser analisada por eletroforese em gel de agarose, a qual resultou em um padrão de fragmentação repetitivo após 24 horas de incubação (banda 2). Nas células tratadas com SNAP (*S-nitroso-N-acetylpenicillamine*) 1mM - controle positivo, houve representativa fragmentação do DNA (banda 3).

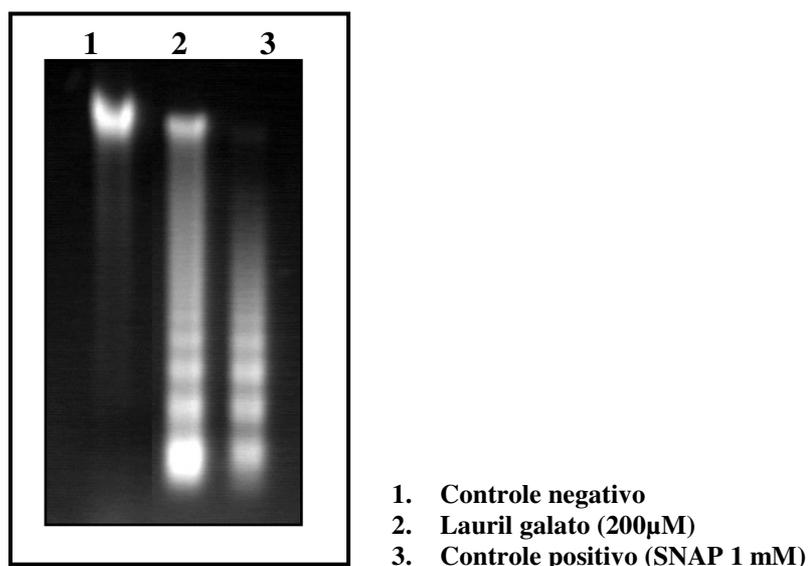


Figura 2. Fragmentação do DNA causada pelo lauril galato sobre células K562. Após 24 h de cultura, foi extraído o DNA das amostras e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídium. Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-Macro Vue UV20) utilizando-se um sistema de foto-documentação de géis (Doc-Print[®]-Biosystems). **Banda 1:** Representa a amostra de células K562 sem tratamento com lauril galato (controle). **Banda 2:** Células tratadas com lauril galato (200 μ M). **Banda 3:** Representa a amostra de células K562 tratadas com *S-nitroso-N-acetylpenicillamine* (SNAP) 1mM como controle positivo.

4.2.2 Estudo das Alterações Citomorfológicas

Como mostra a Figura 3 (página 46), as células K562 tratadas com lauril galato (200 μ M) mostraram redução de volume, retração nuclear com condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. O lauril galato induziu alterações morfológicas características de apoptose nas células K562 em 28 e 35% das células após 12 e 24 horas de incubação, respectivamente.

4.2.3 Detecção de Apoptose Conjugada a Anexina V-FITC

Como pode ser observado na Figura 4, o lauril galato (200 μ M) causou apoptose nas células K-562 após 12 horas (Figura 4 Painel B) e 24 horas (Figura 4 Painel C) de incubação, a qual foi detectada pela dupla coloração anexina V-FITC/PI, enquanto que as células não tratadas foram negativas (Figura 4 Painel A). Detectou-se 20 e 28,4% de células positivas para anexina V em 12 e 24 horas de incubação, respectivamente.

As células em estágio inicial de apoptose podem ser observadas no quadrante inferior direito (anexina V+/PI-) e as células em estágio inicial e tardio de apoptose nos quadrantes inferior e superior direito (anexina V+/PI+).

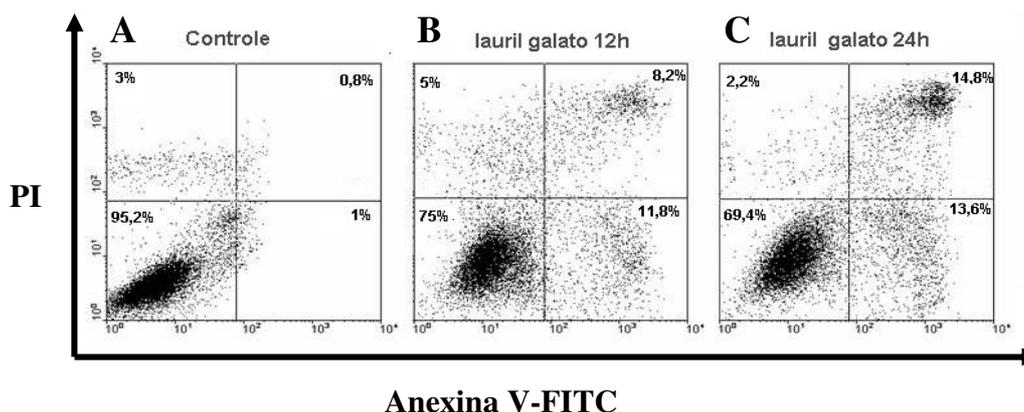


Figura 4. Análise da população de células em estágio inicial e final de apoptose detectadas pela marcação de anexina-V e PI. Painel A: células K562 em meio RPMI, sem tratamento com lauril galato. **Painel B:** as células K562 foram incubadas com lauril galato (200 μ M) por 12 horas. **Painel C:** as células K562 foram incubadas com lauril galato (200 μ M) por 24 horas. A apoptose foi determinada pela análise da marcação das células com anexina V-FITC/PI por citometria de fluxo. Em cada dot plot, as percentagens de anexina-V+/PI+ (células no estágio inicial e final de apoptose - quadrante direito inferior e superior) e anexina-V+/PI- (células em estágio inicial de apoptose - quadrante direito inferior) são descritas.

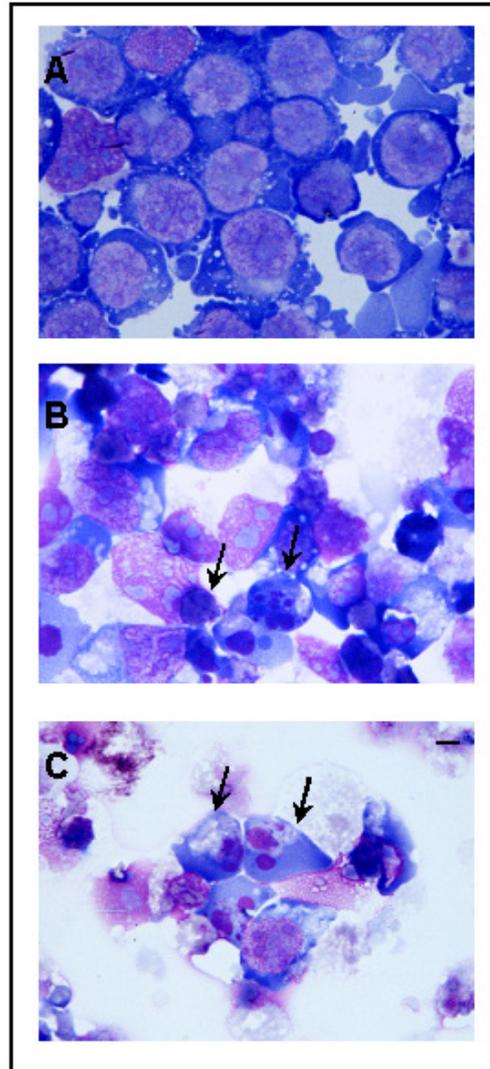


Figura 3. Alterações morfológicas induzidas pelo lauril galato sobre células K562. Células K562 (1×10^6 céls./mL) foram tratadas com lauril galato ($200 \mu\text{M}$) por 12 h e 24 horas, citocentrifugadas e coradas com May-Grünwalds Giemsa. Células não tratadas serviram como controle. **Painel A:** Características normais das células K562 (controle). **Painéis B e C:** Citomorfologia das células K562 após 12 e 24 h de tratamento com lauril galato, respectivamente. As setas indicam a formação de corpos apoptóticos. (Aumento X1000).

4.3 Efeito do Lauril Galato sobre Fatores Reguladores de Apoptose em Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

4.3.1 Efeito do Lauril Galato na Expressão de Caspase-3 sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

Observou-se que após 12 horas de tratamento com lauril galato, as células que inicialmente não expressavam caspase-3 (score -, Figura 5, Painel A, página 48), passaram a apresentar moderada expressão (score ++, Figura 5, Painel B) e em 24 horas forte expressão (score +++, Figura 5, Painel C) de caspase-3.

4.3.2 Efeito do Lauril Galato na Expressão de Survivina sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

Como pode ser observado na Figura 6, Painel A (página 49), as células sem tratamento com lauril galato (controle) apresentam forte expressão de survivina (score +++). Entretanto após 12 e 24 horas de tratamento, mostrou-se fracamente expressa (score +, Figura 6, Painel B) e sem expressão (score -, Figura 6, Painel C) respectivamente.

4.3.3 Envolvimento da Proteína Antiapoptótica Bcl-2 na Apoptose Induzida pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

A análise da imunocitoquímica por microscopia ótica revelou que o grupo controle (Figura 7 Painel A, página 50) apresenta intensa coloração (score +++) citoplasmática devido à presença da proteína antiapoptótica Bcl-2. Entretanto, após 24 horas de incubação com lauril galato (200 μ M), houve uma diminuição da coloração (score ++) citoplasmática (Figura 7, Painel C, página 50).

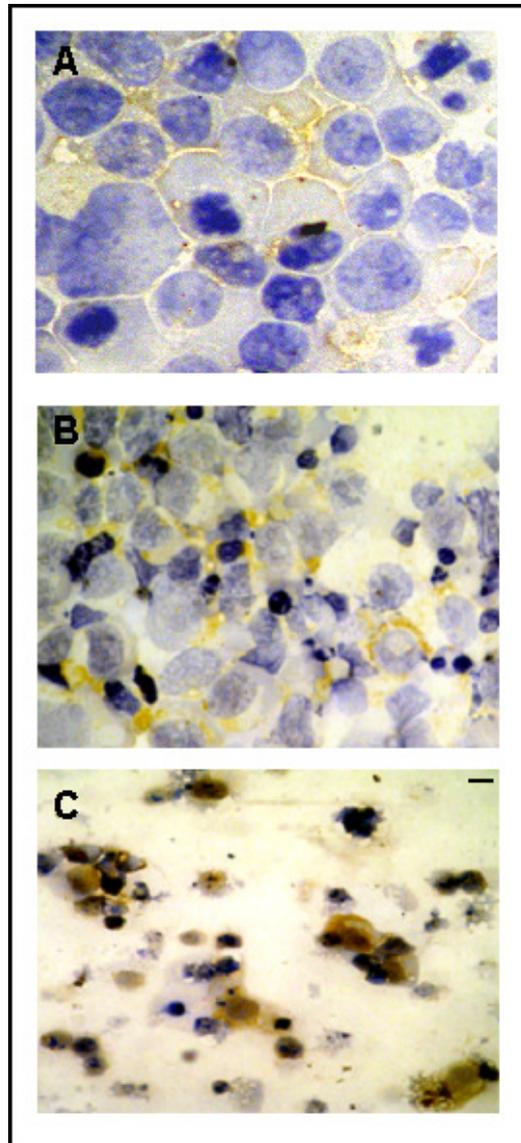


Figura 5. Efeito do lauril galato na expressão da caspase-3 sobre células K562. A coloração foi realizada usando o sistema peroxidase-DAB (castanho). As amostras foram analisadas pela expressão citoplasmática de caspase-3, demonstrada pela coloração castanha, por microscopia ótica (Aumento X400). Foram realizados três experimentos independentes. **Painel A:** O controle não mostrou expressão de caspase-3 (score -). **Painel B:** Após 12 h de tratamento com lauril galato 200µM, observou-se aumento da expressão (score ++). **Painel C:** Forte expressão (score +++) após 24 h de tratamento com lauril galato 200µM. (barra = 10 µm).

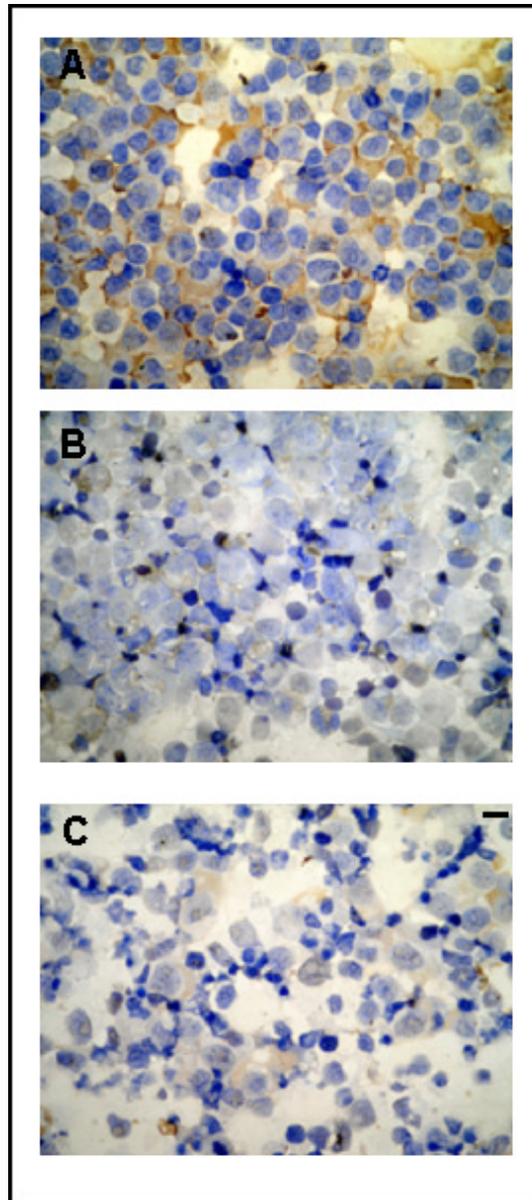


Figura 6. Efeito do lauril galato na expressão de survivina sobre células K562. A coloração foi realizada usando o sistema peroxidase-DAB (castanho). As amostras foram analisadas pela expressão citoplasmática de survivina, demonstrada pela coloração castanha, por microscopia ótica (Aumento de 400X). Foram realizados três experimentos independentes. **Painel A:** O controle apresentou forte expressão de survivina (score +++). **Painel B:** Fraca expressão (score +) após 12 h de tratamento com lauril galato 200 μ M. **Painel C:** Sem expressão (score -) após 24 h de tratamento com lauril galato 200 μ M. (barra = 10 μ m)

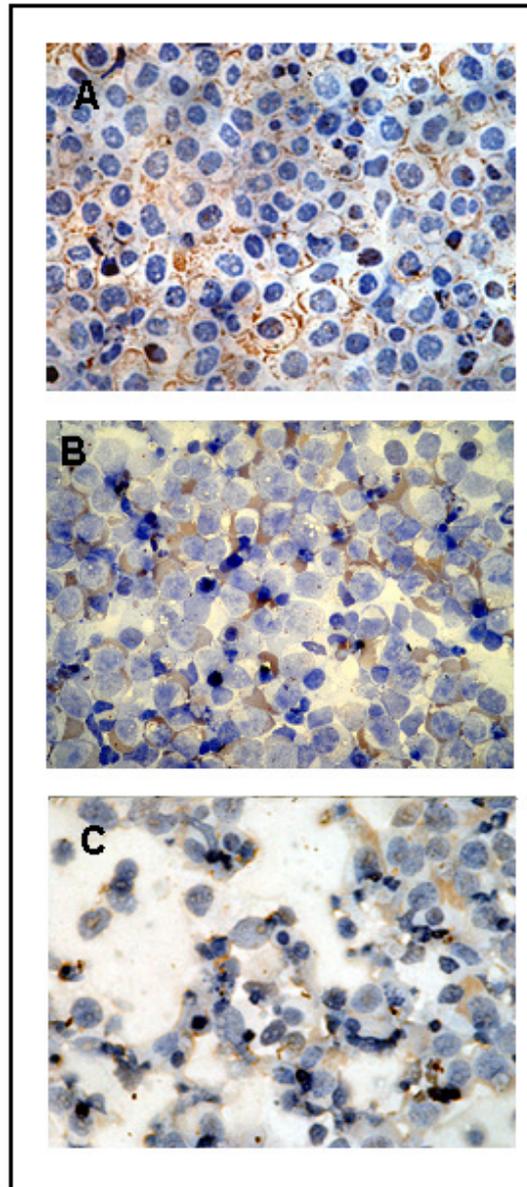


Figura 7. Efeito do lauril galato na expressão de Bcl-2 sobre células K562. A coloração foi realizada usando o sistema peroxidase-DAB (castanho). As amostras foram analisadas pela expressão citoplasmática de Bcl-2, demonstrada pela coloração castanha, por microscopia ótica (Aumento X400). Foram realizados três experimentos independentes. **Painel A:** O controle mostrou forte expressão de caspase-3 (score +++). **Painel B:** Após 12 h de tratamento com lauril galato 200 μ M, a expressão de Bcl-2 não alterou-se (score +++). **Painel C:** Após 24 h de tratamento com lauril galato 200 μ M, houve diminuição na expressão de Bcl-2 (++) . (barra = 10 μ m).

4.3.4 Envolvimento do AIF (Fator Indutor de Apoptose na Apoptose Induzida pelo Lauril Galato sobre Células de Leucemia Mielóide Aguda Humana K562

A análise da Figura 8 (página 52), Painel A mostra que as células K-562 não expressam AIF (score -), e que após 12 horas de incubação com lauril galato (200 μ M) houve aumento da positividade (score ++, Figura 8, Painel B). Após 24 horas de incubação com lauril galato (200 μ M), as células passaram a apresentar forte expressão de AIF (score +++, Figura 8, Painel C).

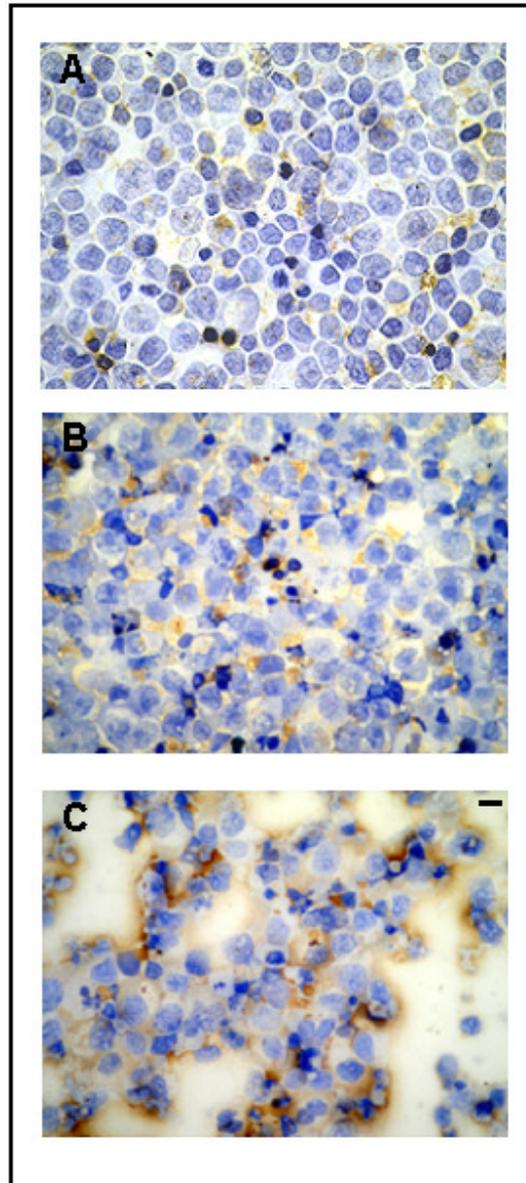


Figura 8. Efeito do lauril galato na expressão de AIF sobre células K562. A coloração foi realizada usando o sistema peroxidase-DAB (castanho). As amostras foram analisadas pela expressão citoplasmática de AIF, demonstrada pela coloração castanha, por microscopia ótica (Aumento X400). Foram realizados três experimentos independentes. **Painel A:** O controle mostrou ausência de expressão de AIF (score -). **Painel B:** Após 12 h de tratamento com lauril galato 200 μ M, a expressão AIF aumentou (score ++). **Painel C:** Após 24 h de tratamento com lauril galato 200 μ M, apresentou forte expressão de AIF (+++). (barra = 10 μ m).

4.4 Efeito do Lauril Galato sobre a Progressão do Ciclo Celular em Células K562

A análise da progressão do ciclo celular nas células K562 incubadas na presença ou ausência de lauril galato 200 μM foi realizada após 12 e 24 horas. Após 12 horas, na ausência de lauril galato 200 μM , a população de células em apoptose, G_0/G_1 , S e G_2M foi de 10,3 (M4); 29,3 (M1); 38,4 (M2) e 18,2%(M3) respectivamente (Figura 9, página 54, PainelA). O tratamento com lauril galato 200 μM por este mesmo período de tempo alterou a percentagem das células, nas respectivas fases para: 28,7 (M4); 34,9 (M1); 26,8 (M2) e 7,1% (M3) como pode ser observado na Figura 9, Painel B. Após 24 horas de incubação com lauril galato a percentagem de células em apoptose (M4), G_0/G_1 (M1), S (M2) e G_2M (M3) foi de 22 (M4); 23,6 (M1); 36,4 (M2) e 16,2% (M3) respectivamente (Figura 9, página 54, Painel C). Após 24 horas de tratamento com lauril galato 200 μM a população de células em apoptose, G_0G_1 , S e G_2M foi de 36,7 (M4); 30,8 (M1); 22,4 (M2) e 8,7% (M3) respectivamente (Figura 9, painel D). Este resultado mostrou que a população de células K562 em apoptose aumentou (M4), na fase G_0/G_1 (M1) não se alterou e que nas fases S e G_2M (M2+M3) diminuiu, pela exposição das células ao lauril galato 200 μM por 12 e 24 horas quando comparadas ao controle de células sem tratamento.

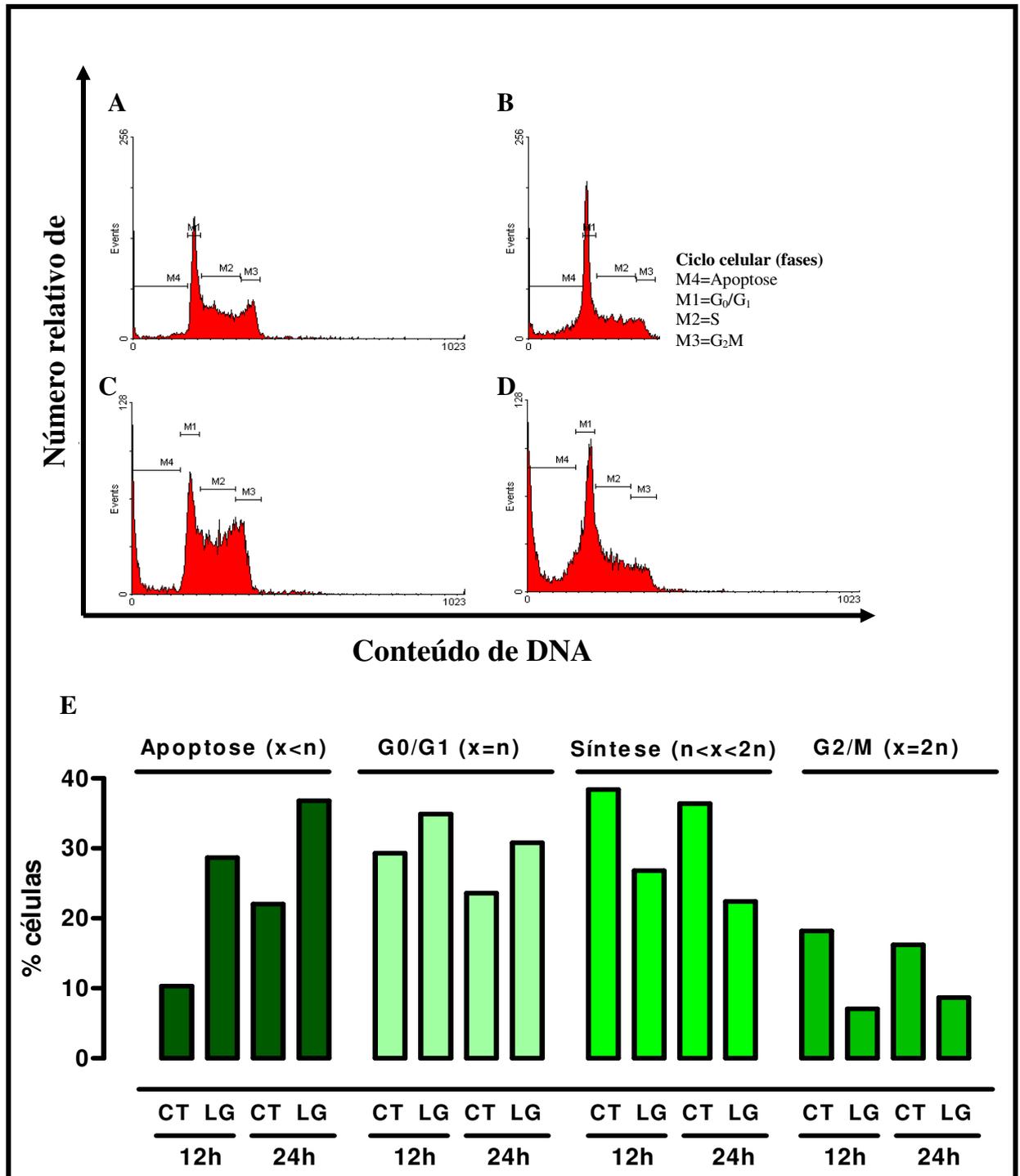


Figura 9. Efeito do lauril galato sobre as fases do ciclo celular de células K562. As células K562 foram incubadas na presença ou ausência de lauril galato 200 μ M e a percentagem de células em cada fase do ciclo celular foi analisada de acordo com o conteúdo de DNA. **Painéis de A-D:** As fases do ciclo celular são assim representadas: céls. em apoptose (M4), céls. na fase G₀/G₁ (M1), céls. na fase S (M2) e céls. na fase G₂M (M3). **Painéis A-B:** Células tratadas por 12h, na ausência (A) ou na presença (B) de lauril galato. **Painéis C-D:** Células tratadas por 24h, na ausência (C) ou na presença (D) de lauril galato. **Painel E:** Gráfico representativo dos painéis A-D, onde CT=células não tratadas e LG=células tratadas com lauril galato.

5 DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de fármacos antineoplásicos, que tenham maior eficiência em induzir à morte as células tumorais, e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais. Por isso, o interesse em novos alvos terapêuticos, a partir de produtos naturais, cresceu exponencialmente nos últimos anos. O desenvolvimento de fármacos, a partir de produtos naturais, incorporou profundas transformações no decorrer das últimas décadas. Com o avanço da biologia molecular, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo, assim, diversos novos alvos micro e macromoleculares, passíveis de intervenção terapêutica^{35,174}.

O ácido gálico e seus alquil ésteres vêm sendo estudados, por sua ação citotóxica, em diferentes linhagens de células tumorais^{146,149,156,158}. Vários trabalhos demonstram que compostos sintéticos, derivados do ácido gálico, causam inibição da proliferação celular em células de leucemia promielocítica humana HL60(154), células de leucemia linfoblástica¹⁴⁷, células JY (*human B cell lymphoma*), MOLT-4 (*human acute lymphoblastic leukemia*), HT29 (*human colon adenocarcinoma*), Daudi (*human Burkitt's lymphoma*), Wehi 231(*Balb-c mouse B cell lymphoma*), L929 (*c34/An mouse fibroblast*), EAT (*Ehrlich ascites tumor*), e X-653 (*P3X63Ag8.653 Balb/c mouse myeloma*)¹⁴⁶. Serrano *et al*(1998), além de constatarem que a inibição do crescimento celular, com uma larga variação na concentração necessária para obter o mesmo efeito, depende do tipo de célula, também verificaram que os alquil ésteres do ácido gálico, com grupo lipofílico, como o octil e o dodecil (lauril), exibem um potencial efeito antiproliferativo entre 50 e 250 vezes maior que o próprio ácido gálico^{146,147,148,175,176}. Neste mesmo estudo, também foi observado que linfócitos normais podem suportar mais altas concentrações de lauril galato do que células de linhagem tumoral¹⁴⁶. Fiuza *et al*(2004) também observaram que o efeito citotóxico dos alquil ésteres do ácido gálico, em fibroblastos normais (células de tecido pulmonar embrionário humano, L-132), é bem menor (aproximadamente três vezes) do que em células de câncer humanas¹⁷⁵.

Os resultados deste estudo corroboram com os trabalhos descritos acima, pois o lauril galato – um alquil éster derivado do ácido gálico - induziu efeito citotóxico nas células de leucemia mielóide aguda humana K562, de maneira concentração-dependente.

A ação dos compostos antileucêmicos, em geral, baseia-se na inibição da proliferação, na indução de apoptose e na diferenciação das células leucêmicas, o que invariavelmente, evolui para apoptose^{144,145}. Vários compostos quimioterápicos têm sido estudados por induzir

à apoptose, revelando ser este um mecanismo primário de sua atividade anticâncer^{44,45}. A indução de apoptose tem sido identificada como um evento comum de diferentes classes de agentes anticâncer^{38,39,40,41,42,43}.

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o lauril galato inibe a proliferação celular por indução à apoptose diferentes tipos celulares^{144,146,147}. Entretanto, alguns compostos fenólicos têm sido apontados por sua ação na inibição da diferenciação celular^{177,178}, bem como por inibir a proliferação das células pela indução de dois tipos de morte celular, apoptose e necrose¹⁷⁹. Kouichi *et al*(2000) demonstraram que os derivados do ácido gálico com grupo lipofílico (farnesil galato hidrogenado, lauril galato, laurilamide e colesteril galato) apresentam habilidade para induzir à apoptose células de leucemia monoblástica humana U937¹⁴⁹.

A morte celular, apoptose ou necrose, é caracterizada por diferenças morfológicas e bioquímicas. Para investigar qual tipo de morte celular o lauril galato induziu, nas células de leucemia mielóide aguda humana K562, alguns parâmetros bioquímicos e morfológicos foram analisados. Observamos que, após o tratamento das células com lauril galato ($EC_{50}=200 \mu M$), houve fragmentação do DNA (Figura 2), que é um padrão típico de apoptose, ou seja, presença de fragmentos oligonucleossomais, resultantes da ativação de uma endonuclease, que quebra o DNA nos nucleossomas e dá origem a um padrão de fragmentação repetitivo⁴⁷. Ao contrário, no processo de necrose a quebra do DNA é randômica e mostra degradação de histonas, o que não gera qualquer padrão repetitivo¹⁸⁰.

Além disso, as alterações morfológicas, características de apoptose, como retração da célula, condensação da cromatina, formação de pregas citoplasmáticas e a extrusão de micronúcleos¹⁶³, também foram evidentes, como mostra a figura 3, painéis B e C. Serrano *et al*(1998) evidenciaram alterações citomorfológicas e fragmentação do DNA semelhantes, em células Wehi 231(*Balb-c mouse B cell lymphoma*)¹⁴⁶. Esses achados sugestivos de morte celular induzida pelo lauril galato, por apoptose, foram confirmados pela positividade da anexina V (Figura 4).

O mecanismo pelo qual os derivados do ácido do gálico induzem à apoptose algumas linhagens celulares, ainda não está completamente esclarecido. Provavelmente, envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual interfere no balanço do estado redox da célula^{125,154,181}. Também foi demonstrado que estes compostos são inibidores da proteína tirosina quinase (PTK), em vários tipos de células^{182,183}.

Paralelamente, os avanços nesta área do conhecimento revelam que os mecanismos que regulam a apoptose são complexos. Consistem na ativação de numerosas sinalizações e

de componentes inibitórios, que compõem vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, os quais culminam na autodestruição celular⁵⁴.

Neste sentido, procuramos investigar alguns mecanismos envolvidos na apoptose, causada por esse composto.

A apoptose é regulada por uma série de eventos bioquímicos, que levam à morte celular. Uma característica comum das células em processo de apoptose é a ativação de membros de uma família de cisteíno-aspartato proteases, denominada Caspase. A inibição da atividade das caspases, tanto por mutação quanto por ação farmacológica, pode impedir ou retardar a morte celular por apoptose. O mecanismo de ação das caspases é a clivagem de proteínas em um ou mais sítios, resultando na inativação funcional do substrato ou alternativamente, a sua ativação⁵⁵. Da família, a caspase-3 é a mais prevalente nas células, a qual é responsável pela finalização dos efeitos apoptóticos, porém, em conjunto com duas outras: caspase-6 e -7. Juntas, estas três caspases executoras são responsáveis pelo fenótipo apoptótico, através da clivagem ou degradação de outros substratos importantes neste processo. A externalização da fosfatidilserina durante a apoptose é, geralmente, caspase dependente¹⁸⁴. Porém, em alguns tipos de células, a externalização da fosfatidilserina parece ser caspase-independente¹⁸⁵. O mecanismo exato ainda não foi elucidado.

A análise da expressão de caspase-3 nas células K562, por imunocitoquímica, mostrou que o tratamento das células K562, com lauril galato, resultou no aumento da expressão de caspase-3, o que sugere o envolvimento de apoptose, via mitocondrial.

A apoptose é um evento altamente regulado, o qual envolve a participação de inibidores naturais das caspases. Estes inibidores de proteínas de apoptose (IAPs) atuam como moléculas anti-apoptóticas, a partir da inibição da ativação proteolítica da caspase-3 e da caspase-7^{94,95,96,97,98}. Foram identificadas, até o presente momento, pelo menos cinco diferentes membros da família das IAPs - NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e survivina - as quais exibem atividade antiapoptótica, em células de cultura^{96,97,100}. A survivina está presente durante o desenvolvimento fetal, mas não é detectável em tecidos adultos normais. Porém, está superexpressada na maioria dos tumores sólidos “*in vivo*” e é o quarto mais significativo fator de transcrição expresso em tumores humanos¹⁸⁶. Altos níveis de survivina foram observados em blastos mielóides e células linfóides de algumas desordens linfoproliferativas^{107,187,188,189,190}. Em pacientes portadores de neoplasias, a expressão de survivina têm sido associada com a redução de apoptose em células tumorais “*in vivo*”^{106,191}. Além disso, altos níveis de expressão de survivina têm sido ligados a mau prognóstico e diminuição da sobrevida em vários tipos de câncer humano^{104,105,106,107}. Tamm *et al*(1998), em

estudos recentes, demonstraram que a survivina suprime a apoptose induzida por Fas, Bax, caspases e drogas anticâncer¹⁰³. A survivina tem um papel de impedimento da apoptose e atua na regulação da divisão celular, sendo que no início da mitose é associada com microtúbulos do fuso mitótico e está expressa na fase G₂/M do ciclo celular, de um modo ciclo-regulatório^{88,89,192,193}. Li *et al*(1998) demonstraram que, quando ocorre rompimento da interação survivina-microtúbulo, é detectado aumento da atividade da caspase-3⁸¹. Assim, quanto ao seu papel como agente antiapoptótico, a survivina atua direta ou indiretamente na inibição das caspases¹⁹². Olie *et al*(2000) observaram que a diminuição da expressão de survivina aumentou a atividade da caspase-3 e a fragmentação do DNA, em células de câncer de pulmão¹⁹⁴. Também, Deveraux *et al*(1999) observaram que a remoção do efeito inibitório da survivina parece ser potencialmente útil na sensibilização das células neoplásicas, para o efeito dos agentes anticâncer¹⁰¹.

Com base nas evidências acima citadas e nos resultados obtidos neste estudo, a inibição da expressão da survivina nas células K562, pelo lauril galato, pode explicar o aumento crescente da expressão de caspase-3 em 12 e 24 horas respectivamente. Ou seja, o efeito inibitório da survivina sobre a caspase-3 diminui à medida que esta proteína é inibida pela ação do lauril galato.

Alterações no ciclo celular e nas proteínas regulatórias são frequentemente associadas à indução de apoptose e têm, portanto, um papel fundamental para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na tumorigênese e para o desenvolvimento de terapêuticas efetivas contra o câncer. Muitos dos efeitos apoptóticos de compostos fenólicos, em linhagens de células tumorais, têm sido atribuídos a uma desordem no ciclo celular¹⁹⁵. Por exemplo, Calcabrini *et al*(2006) observaram que o efeito apoptótico do lauril galato, em células de câncer de mama humana (MCF7), ocorre por alterações no ciclo celular¹⁹⁶.

Sendo assim, foi avaliada a possibilidade do efeito apoptótico do lauril galato, sobre células K562, estar relacionado à alterações na progressão do ciclo celular, já que o mesmo apresentou um efeito de inibição da expressão de survivina.

Os resultados mostraram claramente uma diminuição no número de células, nas fases S e G₂M, após 12 e 24 horas de tratamento com lauril galato, 200 µM. Isto pode indicar que o mecanismo pelo qual o lauril galato inibe o crescimento das células leucêmicas não é somente por apoptose, mas também pela parada do ciclo celular. O possível mecanismo de seletividade terapêutica, ainda não elucidado, poderia ser devido à parada nas fases S e G₂M, já que células tumorais apresentam alto índice proliferativo, em relação às células normais. Conforme dados anteriores, de que a survivina está expressa na fase G₂M do ciclo celular de

modo ciclo-regulatório, e que o rompimento da interação survivina-microtúbulo, no início da mitose, causa aumento da atividade da caspase, estes dados vêm confirmar os achados anteriores deste estudo, em que o aumento da expressão de caspase-3 ocorre à medida que diminui a expressão de survivina pelo tratamento com lauril galato.

Como foi citado anteriormente, várias proteínas estão envolvidas na regulação da apoptose, como p53, Bcl-2 e Bax^{197,198}. O papel de proteção da proteína Bcl-2 na apoptose já está bem estabelecido^{152,157,198,199}. Esta proteína pertencente ao grupo das IAPs, tem sido apontada por produzir efeito antiapoptótico, em diferentes sistemas^{197,200}. Roy *et al*(2000) demonstraram que a Bcl-2 retarda a indução de apoptose pelo lauril galato nas células Wehi 231¹⁵⁷, e Calcabrini *et al*(2006) encontraram efeito semelhante em células de linhagem de câncer de mama humana MCF7¹⁹⁶. Também, tem sido demonstrada forte ligação entre a prevenção do câncer por polifenóis e inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2²⁰¹.

Sendo assim, foi investigado o envolvimento dessa proteína na proteção contra a apoptose induzida pelo lauril galato, nas células K562. Os resultados obtidos, no presente trabalho, demonstraram que as células K562 expressam a proteína antiapoptótica Bcl-2, a qual foi inibida pelo lauril galato. Comparativamente a esses resultados, o efeito apoptótico do lauril galato sugere o envolvimento da proteína Bcl-2 na proteção das células K562 aos efeitos citotóxicos deste composto.

Os resultados até aqui apresentados sugerem que o aumento da expressão de caspase-3, observado após o tratamento com lauril galato, pode estar associado tanto à diminuição da expressão de Bcl-2, bem como à inibição da expressão de survivina.

Há evidências na literatura que a proteína Bcl-2 atua na mitocôndria e estabiliza o potencial transmembrana^{202,203}, o qual funciona como um canal iônico modulador da atividade de caspases ou como inibidor da liberação de citocromo c⁹⁷ e AIF^{66,204}. Entretanto, também tem sido demonstrada a liberação do citocromo c, independente da despolarização transmembrana da mitocôndria^{205,206}. Susin *et al*(1999) demonstraram que o AIF causa fragmentação do DNA, condensação da cromatina e induz a liberação do citocromo c e caspase-9 da mitocôndria, independentemente da ativação de caspases, e que a superexpressão de Bcl-2 previne a liberação do AIF da mitocôndria, mas não bloqueia sua atividade apoptogênica⁶⁶.

Os resultados aqui obtidos demonstraram que o AIF não está expresso nas células K562 e que após o tratamento com lauril galato (200µM), passou a apresentar forte expressão. Isto indica que a liberação do AIF nesta célula parece estar diretamente relacionada com a ação da proteína antiapoptótica Bcl-2.

A morbidade associada aos tratamentos quimioterápicos tem intensificado a investigação de novos agentes anticâncer, já que os utilizados atualmente, na prática clínica, apresentam uma alta toxicidade para células normais e, frequentemente, levam ao desenvolvimento de resistência³⁵. Assim, a observação de que linfócitos normais podem suportar altas concentrações de lauril galato melhor do que células de linhagem tumoral, por Serrano *et al*(1998)¹⁴⁶, e que alquil ésteres do ácido gálico têm efeito citotóxico aproximadamente três vezes menor sobre fibroblastos humanos, por Fiuza *et al*(2004)¹⁷⁵, podem indicar uma seletividade de ação para células de crescimento rápido e a possibilidade de seu estudo como um potente agente antitumoral.

A compilação de evidências obtidas nesse estudo nos permite sugerir que um dos prováveis mecanismos de citotoxicidade para o lauril galato, em células leucêmicas K562, seja pela inibição da expressão de survivina, a qual, como citado anteriormente, inibe a apoptose por supressão das caspases efetoras²⁰⁶. Diante do estímulo apoptótico causado pelo lauril galato, há aumento da expressão de caspase-3, a qual é responsável pela conseqüente quebra do DNA e pelas alterações morfológicas encontradas nas fases finais de apoptose. A survivina atua na regulação da divisão celular e sua inibição conduz a um bloqueio do ciclo celular e inibição de proliferação celular. Além disso, a diminuição da expressão de Bcl-2, pelo lauril galato, parece interferir na liberação do AIF das mitocôndrias. Embora estudos posteriores sejam necessários, o efeito inibitório do lauril galato sobre as proteínas inibidoras de apoptose survivina e Bcl-2, abre outras opções no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que a inibição destas proteínas vem sendo apontada como uma nova estratégia de tratamento antitumoral.^{186,207,208,209,210,211,212}

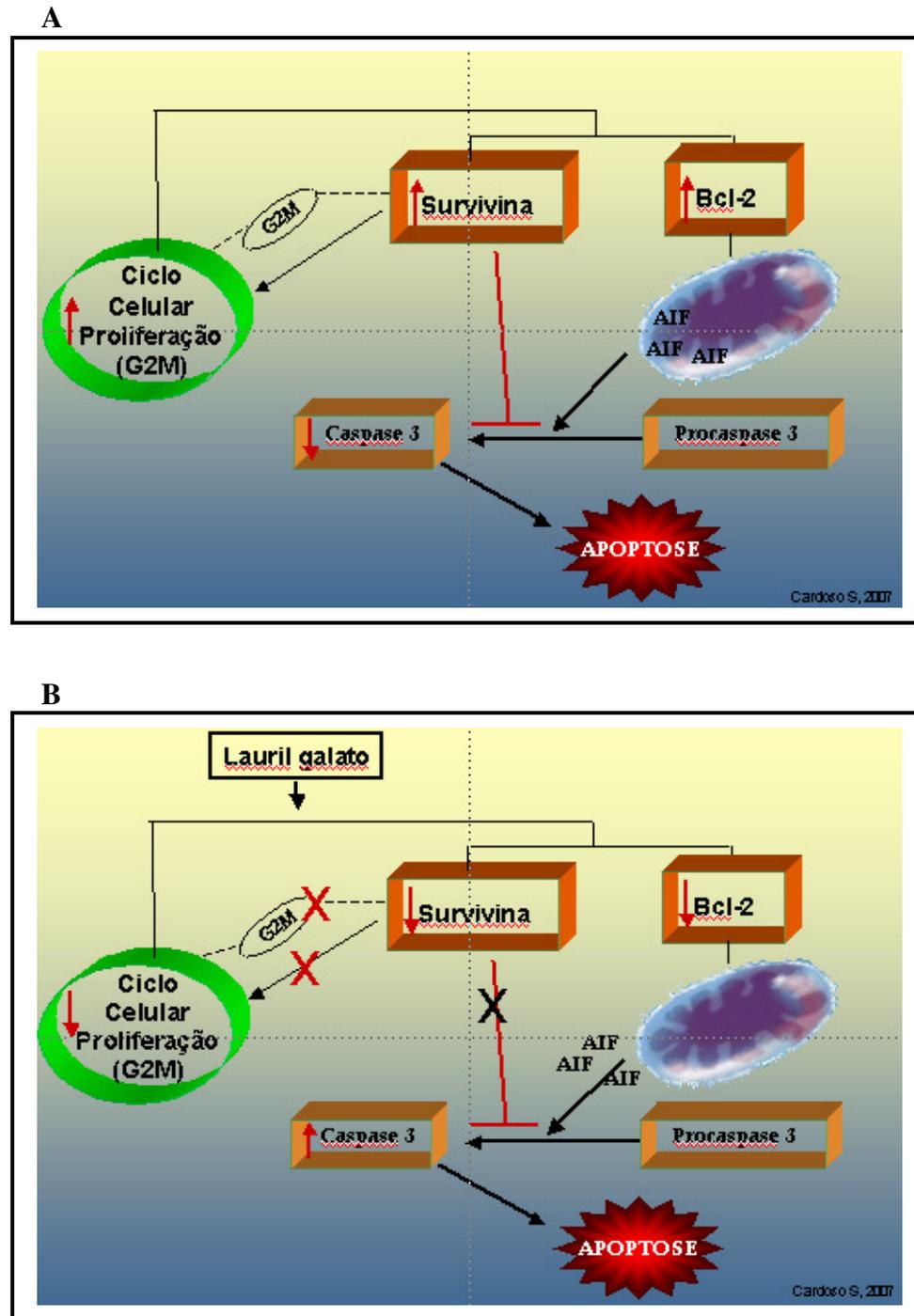
O crescente conhecimento da relação entre apoptose e carcinogênese, além de ter levado à identificação de várias alterações gênicas; tem demonstrado que a relação entre carcinogênese e desequilíbrio de apoptose está tão intimamente ligada que qualquer estratégia terapêutica, especialmente o desencadeamento de apoptose, em células de câncer, poderia ter um potencial efeito terapêutico. Assim, a era dos marcadores terapêuticos tem progressivamente, emergido na oncologia, e estratégias de desencadeamento de apoptose provavelmente, desempenharão um importante papel neste contexto.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. O lauril galato – um alquil éster derivado do ácido gálico, induz apoptose em células de leucemia mielóide aguda humana K562.
2. A apoptose induzida pelo lauril galato envolve aumento da expressão de caspase-3 nas células K562.
3. A expressão de survivina nas células K562 é inibida pela ação do lauril galato, a qual pode estar relacionada com a parada do ciclo celular na fase G₂M.
4. O lauril galato causa bloqueio do ciclo celular nas fases S e G₂M. Isto permite concluir que o mecanismo pelo qual o lauril galato inibe o crescimento de células tumorais não é somente por apoptose, mas também pela parada do ciclo celular.
5. A diminuição da expressão de Bcl-2 pelo lauril galato permite a liberação de AIF pelas mitocôndrias e favorece a indução de apoptose.
6. O aumento na expressão de caspase-3 pelo lauril galato, pode estar associado tanto à diminuição da expressão de Bcl-2, assim como à inibição da expressão da proteína survivina.

Com base nos resultados obtidos pode-se propor um esquema de ação do lauril galato sobre as células de leucemia mielóide aguda humana K562 (Esquema 5).



Esquema 5: Esquema proposto para ação do lauril galato sobre células K562.

Painel A: Expressão das proteínas Bcl-2 (antiapoptótica), caspase-3, survivina, AIF e progressão do ciclo celular nas células K562. **Painel B:** A ação do lauril galato sobre as células K562 causou diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da liberação de AIF, que, junto com a inibição da expressão de survivina, levou a um aumento da expressão de caspase-3. Na progressão do ciclo celular houve um bloqueio na fase G₂M, com diminuição da proliferação celular.

Esse conjunto de resultados sugere que o lauril galato induz apoptose por inibição das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e survivina, com conseqüente aumento da liberação de AIF e aumento da expressão de caspase-3. Além disso, é capaz de bloquear o ciclo celular nas fases S e G₂M. O lauril galato, como uma nova estratégia terapêutica no desencadeamento da apoptose em células leucêmicas, pode ter um potencial efeito terapêutico.

REFERÊNCIAS

1. ACS. Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA: American Câncer Society; 2007.
2. WHO. Cancer: diet and physical activity's impact: World Health Organization 2006.
3. Tsongalis GJ, Coleman WB. Molecular oncology: diagnostic and prognostic assessment of human cancers in the clinical laboratory. *Cancer Invest* 1998;16(7):485-502.
4. Bain B. Diagnóstico em Leucemias. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2003.
5. Felsher DW. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14(1):37-42.
6. Robbins S. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2000.
7. Kligerman J. Estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2001:111-4.
8. INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer: Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde - Brasil; 2006.
9. Lusic M. Classificação FAB das leucemias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2000:175-8.
10. NCI. Adult Acute Myeloid Leukemia: Nacional Cancer Institute; 2007.
11. Williams W. Hematologic Diseases. 7ª ed: Marshall A. Lichtman; 2006.
12. Zago M, Falcão R, Pasquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu; 2005.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451-8.
14. Rubnitz JE, Pui CH. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. *Curr Opin Hematol* 1999;6(4):229-35.
15. Ortuno Giner FJ, Orfao A. [Applicability of flow cytometry in the diagnosis and immunophenotyping follow-up of acute leukemias]. *Med Clin (Barc)* 2002;118(11):423-36.
16. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry A* 2004;58(1):62-71.
17. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90(8):2863-92.

18. Jaffe E, Harris N, Stein H. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: World Health Organization 2001.
19. Micallef IN, Rohatiner AZ, Carter M, Boyle M, Slater S, Amess JA, et al. Long-term outcome of patients surviving for more than ten years following treatment for acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001;113(2):443-5.
20. Gol b J, Zagozdzon R, Kaminski R, Kozar K, Gryska K, Izycki D, et al. Potentiated antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin-12 and 5-fluorouracil of L1210 leukemia in vivo. *Leukemia* 2001;15(4):613-20.
21. Treleaven J, Cullis JO, Maynard R, Bishop E, Ainsworth-Smith I, Roques A, et al. BCSH British Committee for Standards in Haematology: Obtaining consent for chemotherapy. *British Journal of Haematology* 2005;132:552-559.
22. Hann IM, Stevens RF, Goldstone AH, Rees JK, Wheatley K, Gray RG, et al. Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council. *Blood* 1997;89(7):2311-8.
23. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 1994;331(14):896-903.
24. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92(7):2322-33.
25. Burnett AK. Acute myeloid leukemia: treatment of adults under 60 years. *Rev Clin Exp Hematol* 2002;6(1):26-45; discussion 86-7.
26. Gilman G. *As Bases Farmacológicas da Teapêutica*. 9^a ed. Rio de Janeiro: McGrawHill; 1996.
27. Mikita T, Beardsley GP. Functional consequences of the arabinosylcytosine structural lesion in DNA. *Biochemistry* 1988;27(13):4698-705.
28. Shenkenberg TD, Von Hoff DD. Mitoxantrone: a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* 1986;105(1):67-81.
29. Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, Liu LF. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 1984;259(14):9182-7.
30. Hacker MP, Lazo JS, Tritton TR. Role of iron in anthracycline action. In: Myers C, editor. *Organ-Directed Toxicities of Anticancer Drugs*. Boston: Martinus Nijhoff; 1988. p. 17-30.

31. Tritton TR, Murphree SA, Sartorelli AC. Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84(3):802-8.
32. Vaughan WP, Karp JE, Burke PJ. Long chemotherapy-free remissions after single-cycle timed-sequential chemotherapy for acute myelocytic leukemia. *Cancer* 1980;45(5):859-65.
33. Cassileth PA, Harrington DP, Hines JD, Oken MM, Mazza JJ, McGlave P, et al. Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1988;6(4):583-7.
34. Milligan D, Grimwade D, Cullis J, Swirsky D, Craddock C, Kell Jea. Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. London: British Society for Haematology; 2005.
35. Gorin NC, Estey E, Jones RJ, Levitsky HI, Borrello I, Slavin S. New Developments in the Therapy of Acute Myelocytic Leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000:69-89.
36. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JF. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 1975;116(3):129-38.
37. Eastman A, Rigas JR. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol* 1999;26(5 Suppl 16):7-16; discussion 41-2.
38. Dive C, Evans CA, Whetton AD. Induction of apoptosis--new targets for cancer chemotherapy. *Semin Cancer Biol* 1992;3(6):417-27.
39. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 2002;53:615-27.
40. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002;108(2):153-64.
41. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266(5186):807-10.
42. Makin G, Dive C. Modulating sensitivity to drug-induced apoptosis: the future for chemotherapy? *Breast Cancer Res* 2001;3(3):150-3.
43. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999;187(1):127-37.
44. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001;98(9):2603-14.
45. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* 2001;90(2-3):105-56.

46. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
47. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284(5756):555-6.
48. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol* 2001;11(19):R795-805.
49. van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997;235(2):421-30.
50. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53(3):451-65.
51. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999;47(9):1101-10.
52. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7(3):153-163.
53. Martin S, Jansen F, Bokelmann J, Kolb H. Soluble CD44 splice variants in metastasizing human breast cancer. *Int J Cancer* 1997;74(4):443-5.
54. Reed J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating program cell death. *Semin Hematol* 2000;37:9-16.
55. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6(11):1028-42.
56. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 (Pt 1):1-16.
57. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997;9(1):35-49.
58. Stroh C, Schulze-Osthoff K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 1998;5(12):997-1000.
59. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312-6.
60. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998;12(11):1551-70.
61. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91(4):443-6.
62. Rosen A, Casciola-Rosen L. Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem* 1997;64(1):50-4.

63. Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 2000;96(9):2951-64.
64. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, et al. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol* 1999;147(4):809-22.
65. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000;256(1):19-26.
66. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999;6(6):516-24.
67. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2000;2(3):156-62.
68. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86(1):147-57.
69. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
70. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 1996;406:119-24.
71. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17(6):1675-87.
72. Darnay BG, Aggarwal BB. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol* 1997;61(5):559-66.
73. Magnusson C, Vaux DL. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol* 1999;77(1):41-6.
74. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673-82.
75. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107(5):489-506.
76. Memon SA, Hou J, Moreno MB, Zacharchuk CM. Apoptosis induced by a chimeric Fas/FLICE receptor: lack of requirement for Fas- or FADD-binding proteins. *J Immunol* 1998;160(5):2046-9.
77. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998;392(6673):296-300.

78. Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, et al. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 2003;17(7):883-95.
79. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84(2):299-308.
80. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81(4):495-504.
81. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94(4):491-501.
82. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94(4):481-90.
83. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407(6805):789-95.
84. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
85. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* 2003;22(1):15-20.
86. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9):647-56.
87. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17(25):3225-36.
88. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322-6.
89. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309-12.
90. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003;11(3):577-90.
91. Ferreira C, Rocha J. *Oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004.
92. Kusenda J. Bcl-2 family proteins and leukemia. Minireview. *Neoplasma* 1998;45(3):117-22.
93. Ruvolo PP, Deng X, May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 2001;15(4):515-22.

94. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* 1996;15(11):2685-94.
95. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996;379(6563):349-53.
96. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388(6639):300-4.
97. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 1997;16(23):6914-25.
98. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998;273(14):7787-90.
99. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3(8):917-21.
100. Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001;276(5):3238-46.
101. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(3):239-52.
102. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152(1):43-9.
103. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58(23):5315-20.
104. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31(5):1080-5.
105. Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 2001;48(1):7-15.
106. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):127-34.
107. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96(5):1921-5.

108. Haq R, Zanke B. Inhibition of apoptotic signaling pathways in cancer cells as a mechanism of chemotherapy resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(2):233-9.
109. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-9.
110. Lockshin R, Zakeri Z, Tilly J. *When Cells Die.*: Wiley Liss; 1998.
111. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000;301(1):19-31.
112. Shidham VB, Swami VK. Evaluation of apoptotic leukocytes in peripheral blood smears. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(9):1291-4.
113. Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2001;1551(2):F1-37.
114. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84(5):1415-20.
115. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182(5):1545-56.
116. Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis* 2005;10(1):209-17.
117. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
118. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983;32(7):1141-8.
119. Peres W. *Radicaís Livres em níveis biológicos*. Pelotas: Universidade Católica de Pelotas; 1994.
120. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 1995;235(2):207-19.
121. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997;275(5297):218-20.
122. van der Heijden CA, Janssen PJ, Strik JJ. Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food Chem Toxicol* 1986;24(10-11):1067-70.

123. Gao T, Ci Y, Jian H, An C. Investigation of the Interaction of Tumour Cells Treated with Caffeic and Chlorogenic Acid. *Vib. Spec.* 2000;24:225-31.
124. Silva A, Santos C, Cavaleiro J, Tavares H, Borges F, Silva F. Studies on the Antiradical Mechanism of Phenolic Compounds Towards 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. London. United Kingdom: Royal Society of Chemistry; 2001.
125. Inoue M, Sakaguchi N, Isuzugawa K, Tani H, Ogihara Y. Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2000;23(10):1153-7.
126. Rapta P, Misik V, Stasko A, Vrabel I. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radic Biol Med* 1995;18(5):901-8.
127. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20(7):933-56.
128. Rajan P, Vedernikova I, Cos P, Berghe DV, Augustyns K, Haemers A. Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11(2):215-7.
129. Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H, et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997;53(11):1649-57.
130. Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, Dalle Carbonare M, Leon A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 1997;22(4):669-78.
131. Lepley DM, Li B, Birt DF, Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis* 1996;17(11):2367-75.
132. Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol* 1998;55(12):1973-81.
133. Kazuto I, Makoto I, Yukio O. Ca²⁺ Dependent Caspase Activation by Gallic Acid Derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 2001;24(7):844-47.
134. Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 1994;54(7 Suppl):1895s-1898s.
135. Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun* 1993;19(4):241-53.
136. Sergediene E, Jonsson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IM, Cenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett* 1999;462(3):392-6.

137. Khan NS, Ahmad A, Hadi SM. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact* 2000;125(3):177-89.
138. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997;22(5):749-60.
139. Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett* 1995;368(1):188-92.
140. Passi S, Picardo M, Nazzaro-Porro M. Comparative cytotoxicity of phenols in vitro. *Biochem J* 1987;245(2):537-42.
141. Grundhofer P, Niemetz R, Schilling G, Gross GG. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry* 2001;57(6):915-27.
142. Simões C, Schenkel E, Gosmann G, Mello J, Mentz L, Petrovick P. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e Editora da UFSC; 2003.
143. Forgo I, Buchi J. [Synthesis, physical-chemical properties and antioxidative effect of some gallic acid esters. 2. Synthesis, purity test and quantitative determination]. *Pharm Acta Helv* 1970;45(2):227-36.
144. Takahashi M, Ueda J, Sasaki JI. [The components of the plants of Lagerstroemia genus. IV. On the presence of the ellagic acid derivatives from the leaves of Lagerstroemia subcostata Koehne. and L. speciosa (L.) Pers. and the synthesis of 3,4-di-o-methylellagic acid (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi* 1977;97(8):880-2.
145. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, et al. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1998;25(1):113-20.
146. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespon C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys* 1998;350(1):49-54.
147. Gomes CA, da Cruz TG, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MP. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem* 2003;46(25):5395-401.
148. Savi LA, Leal PC, Vieira TO, Rosso R, Nunes RJ, Yunes RA, et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. *Arzneimittelforschung* 2005;55(1):66-75.
149. Kouichi S, Akira Y, Mamoru I, Ikuro A, Takahiro S, Horoshi N. Apoptosis-Inducing Activity of Lipid Derivatives of Gallic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 2000;23:1391-94.

150. Montanari C, Bolzani V. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Química Nova* 2001;24(1):105-111.
151. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-98.
152. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75(2):241-51.
153. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(17):7915-22.
154. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204(2):898-904.
155. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, et al. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bull* 1995;18(11):1526-30.
156. Annarica C, Garcia-Martinez J, González L, Tendero M, Crateri P. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate. *Carcinogenesis* 2006;27(8):1699-712.
157. Roy G, Lombardia M, Palacios C, Serrano A, Cespon C, Ortega E, et al. Mechanistic aspects of the induction of apoptosis by lauryl gallate in the murine B-cell lymphoma line Wehi 231. *Arch Biochem Biophys* 2000;383(2):206-14.
158. Ortega E, Sadaba MC, Ortiz AI, Cespon C, Rocamora A, Escolano JM, et al. Tumoricidal activity of lauryl gallate towards chemically induced skin tumours in mice. *Br J Cancer* 2003;88(6):940-3.
159. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45(3):321-34.
160. Bodmer WF, Bodmer J. Cytofluorochromasia. In: *Manual of tissue typing techniques*. United States (NIH): Dhew Publ.; 1977.
161. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 1991;141(1):15-22.
162. Han R. *Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques*. Beijing: Pekin Union Medical College Publishing Company; 1997.
163. Martin SJ, Bissonnette RP, MahMcGahon AJ, boubi A, Shi Y, Mogil RJ, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol* 1995;46:153-85.

164. ICSH. Reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). International Committee for Standardization in Haematology. *Br J Haematol* 1984;57(4):707-10.
165. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1996.
166. Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A. Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol* 1994;236(1):199-208.
167. Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Ca²⁺ concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membranes. *Biochem J* 1995;308 (Pt 2):591-8.
168. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 1996;87(3):1179-87.
169. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31(1):1-9.
170. Dowell SP, Lane DP, Hall PA. The immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens: technical considerations. *Cytopathology* 1994;5(2):76-81.
171. Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, et al. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004;28(5):487-94.
172. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218(2):314-9.
173. SCSAC. Data file standard for flow cytometry. Data File Standards Committee of the Society for Analytical Cytology. *Cytometry* 1990;11(3):323-32.
174. Viegas C, Bolzani V. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova* 2006;29(2):326-337.
175. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MN, Milhazes N, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg Med Chem* 2004;12(13):3581-9.
176. Gunckel S, Santander P, Cordano G, Ferreira J, Munoz S, Nunez-Vergara LJ, et al. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chem Biol Interact* 1998;114(1-2):45-59.
177. Yi Z, Wang Z, Li H, Liu M. Inhibitory effect of tellimagrandin I on chemically induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Toxicol Lett* 2004;147(2):109-19.

178. Lung HL, Ip WK, Wong CK, Mak NK, Chen ZY, Leung KN. Anti-proliferative and differentiation-inducing activities of the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the human eosinophilic leukemia EoL-1 cell line. *Life Sci* 2002;72(3):257-68.
179. Koshibu-Koizumi J, Akazawa M, Iwamoto T, Takasaki M, Mizuno F, Kobayashi R, et al. Antitumor activity of a phenoxazine compound, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α ,7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one against human B cell and T cell lymphoblastoid cell lines: induction of mixed types of cell death, apoptosis, and necrosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128(7):363-8.
180. Afanas'ev VN, Korol BA, Mantsygin Yu A, Nelipovich PA, Pechatnikov VA, Umansky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 1986;194(2):347-50.
181. Isuzugawa K, Ogihara Y, Inoue M. Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol Pharm Bull* 2001;24(3):249-53.
182. Palacios C, Cespon C, Martin De La Vega C, Roy G, Serrano A, Salinas M, et al. Lauryl gallate inhibits the activity of protein tyrosine kinase c-Src purified from human platelets. *J Enzyme Inhib* 2001;16(6):527-33.
183. Lazaro I, Palacios C, Gonzalez M, Gonzalez-Porque P. Inhibition of human spleen protein tyrosine kinases by phenolic compounds. *Anal Biochem* 1995;225(1):180-3.
184. Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996;271(46):28753-6.
185. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271(49):31075-85.
186. Otto K, Andersen MH, Eggert A, Keikavoussi P, Pedersen LO, Rath JC, et al. Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine* 2005;23(7):884-9.
187. Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res* 2000;24(11):965-70.
188. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97(9):2777-83.
189. Nakayama K, Kamihira S. Survivin an important determinant for prognosis in adult T-cell leukemia: a novel biomarker in practical hemato-oncology. *Leuk Lymphoma* 2002;43(12):2249-55.

190. Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, et al. XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J* 2004;5(6):489-95.
191. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, et al. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111(1):196-203.
192. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273(18):11177-82.
193. Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004;92(4):656-63.
194. Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000;60(11):2805-9.
195. Birt DF, Pelling JC, Nair S, Lepley D. Diet intervention for modifying cancer risk. *Prog Clin Biol Res* 1996;395:223-34.
196. Calcabrini A, Garcia-Martinez JM, Gonzalez L, Tendero MJ, Ortuno MT, Crateri P, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human breast cancer cells by lauryl gallate. *Carcinogenesis* 2006;27(8):1699-712.
197. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124(1-2):1-6.
198. Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G, et al. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997;57(15):3115-20.
199. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275(5303):1129-32.
200. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75(2):229-40.
201. Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellicchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cancer Res* 2003;63(23):8118-21.
202. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, et al. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996;13(1):21-9.
203. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998;187(8):1261-71.

204. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996;183(4):1533-44.
205. Finucane DM, Waterhouse NJ, Amarante-Mendes GP, Cotter TG, Green DR. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp Cell Res* 1999;251(1):166-74.
206. Miyato Y, Ibuki Y, Ohyama H, Yamada T, Goto R. Phosphatidylserine induces apoptosis in CHO cells without mitochondrial dysfunction in a manner dependent on caspases other than caspases-1, -3, -8 and -9. *FEBS Lett* 2001;504(1-2):73-7.
207. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005;106(2):408-18.
208. Schwartz J, Pinilla-Ibarz J, Yuan RR, Scheinberg DA. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003;40(1):87-96.
209. Zangemeister-Wittke U. Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1002:90-4.
210. Zeis M, Siegel S, Wagner A, Schmitz M, Marget M, Kuhl-Burmeister R, et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(11):5391-7.
211. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2683-92.
212. Wrzesien-Kus A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A, Robak T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis* 2004;9(6):705-15.