

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *Bauhinia glabra* EM CÉLULAS LINFOCITÁRIAS NORMAIS

EVALUATION OF *IN VITRO* CYTOTOXICITY OF *Bauhinia glabra* EXTRACT IN NORMAL LYMPHOCYtic CELLS

Krísala Fernanda Costa Ferreira¹
Jeanine Marie Nardin²

RESUMO

Nos últimos anos vem crescendo a utilização de derivados de plantas como medicamentos antineoplásicos, sendo que a obtenção dos extratos de tais plantas auxilia no tratamento das mais diversas patologias. Neste estudo foi avaliada a atividade citotóxica *in vitro* do extrato da *Bauhinia glabra* sobre as células linfocitárias normais, tendo em vista a toxicidade dos fármacos convencionais. O uso de novas terapias para o tratamento do câncer, como, por exemplo, a utilização dos fitoterápicos pode vir a ser uma alternativa, visto seus efeitos colaterais mais brandos quando comparados com os tratamentos convencionais. As células foram obtidas através do creme leucocitário (*buffycoat*) obtido após centrifugação de amostras de sangue periférico. As células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade e a porção na qual estão presentes os linfócitos foi cultivada *in vitro* na presença de 50µg/mL e 100µg/mL do extrato da planta. Foram observadas as curvas de crescimento celular após 48 horas de incubação das células mononucleares suplementadas com 10% de soro bovino fetal e diferentes concentrações do extrato de *Bauhinia glabra*. O cultivo foi realizado em poços de placas estéreis, incubadas a 37°C por 2 dias. Todo o processo foi monitorado por contagens de célula em hemocitômetro. Após a análise dos dados foi verificado que as concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL do extrato parecem não ter exercido qualquer efeito sobre a viabilidade das células cultivadas ($p = 0,668$ e $0,759$ respectivamente). Apesar da baixa toxicidade em células linfocitárias saudáveis, não é possível afirmar que o extrato não teria alguma ação sobre o equivalente neoplásico das células linfocitárias, uma vez que diferentes mecanismos moleculares governam tais células.

Palavras-chave: Citotoxicidade, *Bauhinia glabra*, células, tratamento.

ABSTRACT

In recent years growing use of plant-derived anticancer drugs such , and obtaining the extracts of such plants aids in the treatment of several pathologies. This study will evaluate in vitro cytotoxic activity of Bauhinia glabra on normal lymphocytic cells. In view of the toxicity of conventional drugs the use of new therapies for the treatment of cancer, such as the use of herbal medicines may prove to be an alternative, as its minor side effects compared with conventional treatments. The cells are obtained from buffycoat obtained after centrifugation of peripheral blood samples. Mononuclear cells will be separated by density gradient and the portion in which are present in lymphocytes is stimulated in vitro with phytohemagglutinin (PHA) . Be observed growth curves cells after 48 hours of incubation of the mononuclear cells supplemented with 10% fetal bovine serum and different concentrations of the Bauhinia glabra extract . The cultivation is carried out in sterile wells plates, incubated at 37 ° C for 2 days . The entire process is monitored by cell counting by hemocytometer . After the data analysis it was verified that the concentrations of 50µg/mL and 100µg/mL extract appear to have exerted any effect on the viability of cultured cells (p = 0.668 and 0.759 respectively). Despite the apparent lack of action on healthy lymphocyte cells, we can't say that the statement would not have any action on the equivalent neoplastic lymphocytic cells, since different molecular mechanisms governing such cells. The use of new therapies for the treatment of cancer, such as herbal medicines may prove to be an alternative in view of their mild side effects when compared with conventional treatments.

Key words: Cytotoxicity, *Bauhinia glabra*, cells, treatment.

¹Acadêmica do curso de Biomedicina do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). Rua Binem Schechter, nº 80 – CEP 82020-310, Curitiba (PR), Brasil. E-mail: krisalaferreira@gmail.com. ² Professora da Disciplina de Hematologia, Escola de Saúde do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). Analista de Pesquisa Clínica, Hospital Erasto Gaertner.

INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma proliferação celular maligna que advém da ruptura do equilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular, na qual células neoplásicas aumentam a proliferação celular e se evadem da apoptose⁽¹⁾. As alterações moleculares que originam as neoplasias podem estar relacionadas com o meio ou ter origem hereditária e estão relacionadas com genes que regulam o ciclo celular. Com a proliferação celular ocorre a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos para nutrir tais células, que se acumulam formando massas e dando origem aos tumores, estes podem ou não migrar para outros locais disseminando-se pelo organismo, em um processo denominado metástase^(1,2).

O tratamento farmacológico deste tipo de doença tem como objetivo eliminar as células neoplásicas para que o organismo volte a produzir células normais. Os protocolos de tratamento do câncer são realizados em múltiplas etapas e têm como objetivo restaurar a normalidade morfológica e numérica das células. Após a poliquimioterapia (associação de vários medicamentos antineoplásicos) o resultado esperado é o desaparecimento das células anormais, ou seja, quando os exames de sangue ou imagem não mostram mais indícios de células alteradas ou da presença de tumores. Apesar da aparente normalidade, é sabido que ainda podem restar no organismo células doentes, sendo necessário muitas vezes dar continuidade ao tratamento para que não haja recaída. Sendo assim o tratamento segue com outros protocolos farmacológicos de acordo com cada tipo de câncer⁽³⁾.

Apesar de bem estabelecidos os protocolos de tratamento para o câncer, inúmeros pacientes não conseguem completar todas as fases e células residuais resistentes aos tratamentos propostos acabam por levar à progressão da doença. Devido a isso a comunidade científica continua a buscar novas alternativas de tratamento para combater células neoplásicas, sejam elas residuais ou não. Como padrão, os primeiros testes de avaliação de uma nova molécula ou substância quanto a sua atividade antineoplásica é testá-la em doenças fáceis de serem reproduzidas ou mantidas *in vitro*, tais como as leucemias, conhecidas como neoplasias do tecido sanguíneo.

A utilização de derivados de plantas como potenciais medicamentos antineoplásicos só vêm aumentando nos últimos tempos, tendo muito ainda que se descobrir quanto ao aspecto farmacológico desses vegetais⁽⁴⁾.

A utilização de extratos vegetais das mais diferentes origens auxilia no tratamento de diversas patologias e a utilização dos mesmos baseia-se frequentemente em conhecimentos populares. Usualmente de baixo custo e de fácil obtenção, e sabendo-se há muito das suas

possíveis propriedades terapêuticas, biológicas e tóxicas, muitos destes extratos vêm sendo utilizados como fonte de potências substâncias ou moléculas terapêuticas⁽⁵⁾.

Com este estudo, pretende-se avaliar o potencial de ação da *Bauhinia glabra*, pertencente ao gênero *Bauhinia*, sobre células linfocitárias normais e leucêmicas. Tal gênero pertence à tribo Cercideae, família Leguminose e subfamília Caesalpinioideae. Popularmente a *Bauhinia glabra* é chamada de cipó-de-escada, ocorrendo principalmente em áreas tropicais^(6,7,8). Especificamente sobre a *Bauhinia glabra* muita pouca informação é disponível quanto ao seu potencial citotóxico, contudo outras espécies do gênero têm demonstrado dados interessantes quanto aos seus efeitos biológicos.

Uma vez verificada a ação biológica de várias espécies do gênero *Bauhinia*, e o potencial de ação deste gênero sobre células neoplásicas, o presente estudo tem como objetivo verificar a ação citotóxica *in vitro* do extrato alcoólico a quente da casca de *Bauhinia glabra* sobre células linfocitárias isoladas de indivíduos saudáveis, para posterior estudo em seus equivalentes neoplásicos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este projeto trata-se de um estudo experimental *in vitro* para avaliar o potencial citotóxico do extrato da *Bauhinia glabra* sobre células linfocitárias normais. O estudo foi realizado nas Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil), em parceria com um hospital oncológico de Curitiba-PR.

Neste estudo foram incluídos dois voluntários, com idade entre 22 e 23 anos, saudáveis, e que se propuseram a doar sangue. Foram considerados indivíduos sadios aqueles que atendessem aos critérios para doar sangue em agências transfusionais de acordo com a portaria do Ministério da Saúde n.1353 de 13 de junho de 2011⁽⁹⁾.

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate ao Câncer, e após aprovação do mesmo as amostras foram coletadas. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Apêndice I)

Foram coletadas amostras (10mL) de sangue de cada voluntário. Estas foram colocadas em tubos contendo heparina, sendo posteriormente centrifugadas por 25 minutos a 2000 rotações por minuto (rpm). O plasma foi descartado e com o auxílio de uma pipeta Pasteur foi coletado o creme leucocitário (*buffycoat*), passando o mesmo para um tubo Falcon de 15mL no qual foi adicionado a 9mL de solução salina tamponada (PBS).

Em um tubo Falcon de 15mL contendo uma alíquota de 3mL de Ficoll-Paque™PLUS (Amersham, Biosciences) $1,077\text{g/cm}^3$, foi vertido cuidadosamente o conteúdo do tubo anterior, sendo o mesmo centrifugado por 30 minutos a 1000rpm, para obtenção das células mononucleares (linfócitos e monócitos). Com uma pipeta Pasteur foram removidas as células mononucleares e em seguida as mesmas foram lavadas em PBS, seguido de homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 2500rpm. Repetiu-se este procedimento por três vezes para lavagem das células e após última lavagem as células foram enumeradas com auxílio de um hemocítmetro (câmara de Neubauer) e sua concentração ajustada para 10^6 células/mL em meio de cultivo RPMI 1640 (Cultilab), para posterior plaqueamento. A viabilidade celular dos linfócitos isolados para o ensaio foi avaliada com azul de tripano a 0,4% (p/v), e apenas amostras com viabilidade superior a 90% foram preparadas para o cultivo.

O extrato alcoólico a quente da casca da *Bauhinia glabra* foi fornecido pelo laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Paraná. Posteriormente foi transfigurado, utilizando-se 5mg do extrato bruto diluindo o mesmo em 1mL de DMSO.

A influência do extrato da *Bauhinia glabra* sobre proliferação de linfócitos humanos foi investigada por meio de curvas de crescimento celular determinadas após 48 horas de incubação. Células mononucleares (2×10^5 células) foram ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$, foram adicionadas a poços de placas estéreis de 24 cavidades. As células foram incubadas a 37°C por 48 horas, em atmosfera de 5 a 10% de CO_2 , na presença do extrato de *Bauhinia glabra* em concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, assim como na ausência do extrato (grupo controle) e estimulados pela presença de 10% de fitohemaglutinina - PHA (controle positivo). Os cultivos tanto dos controles quanto dos testes foram realizados sempre em duplicata. Todo o processo foi monitorado por contagens de célula em hemocítmetro (câmara de Neubauer).

Antes da realização do experimento propriamente dito foi necessário validar a contagem manual de células. Para tal, 10 μL de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram adicionados em 190 μL do líquido de Turk, prosseguindo a contagem das células leucocitárias desta diluição em hemocítmetro. Em cada experimento, 6 contagens deveriam ser realizadas com a mesma diluição. A técnica foi considerada validada quando se obteve três experimentos com contagens dentro de dois desvios padrões e coeficiente de variação inferior a 10%.

Os resultados foram apresentados através de estatística descritiva simples (média e

desvio padrão), em que se realizaram os ensaios sempre em duplicata, utilizando amostras normais com e sem o extrato de planta. O efeito citotóxico foi avaliado através do índice de citotoxicidade (IC) adaptado (GAINES)⁽¹⁰⁾, em que a média aritmética das duplicatas dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir:

$$IC = n^{\circ} \text{ células no teste} / n^{\circ} \text{ células no controle}$$

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste *t*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Diante dos resultados mostrados na figura 1 podemos avaliar que, durante o procedimento de validação das contagens manuais do manipulador, todas elas ficaram dentro de dois desvios padrões e o coeficiente de variação das três contagens mostrou-se abaixo de 10%. Quatro ensaios foram realizados e os três últimos, apresentados na figura 1, considerados satisfatórios, viabilizaram o seguimento dos cultivos para o estudo.

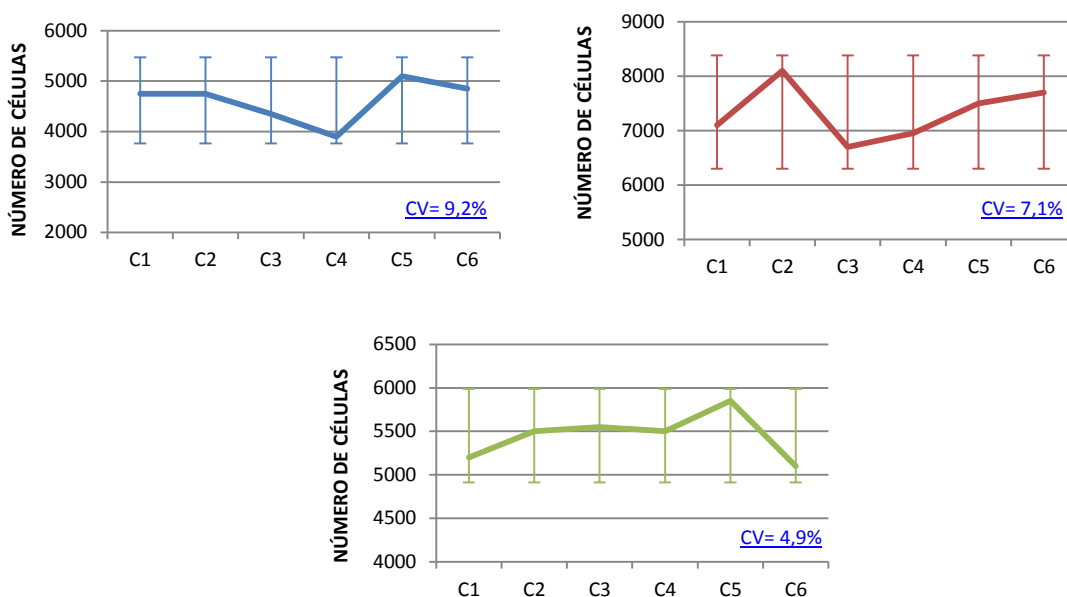


Figura 1: Média, desvio padrão e coeficiente de variação das 6 contagens celulares de cada um dos 3 ensaios em hemocitômetro para validação do manipulador. São apresentados apenas os três últimos ensaios realizados durante a padronização: □- ensaio 2, □- ensaio 3 e □- ensaio 4.

A partir dos resultados demonstrados nas figuras 2 e 3, pode-se concluir que a fitohemaglutinina (PHA) funcionou como um controle positivo, como se previa, e as células na sua presença aumentaram em quantidade quando comparadas com o controle, fato este podendo ser confirmado quando se observa o valor de p de 0,01 (teste *t*). Já as concentrações do extrato da *Bauhinia glabra* mostraram não ter efeito sobre as células, uma vez que os

valores de p encontrados foram de 0,668 e 0,759 para as concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL respectivamente. Ou seja, o extrato não exerceu efeito tóxico, e nem proliferativo, em nenhuma das concentrações avaliadas.

Os resultados teriam alguma consistência quanto à ação da *Bauhinia glabra* sobre as células linfocitárias caso o valor do índice de citotoxicidade fosse inferior a 1, o que significaria que o extrato teria sido citotóxico para as células (valores acima de 1 indicariam aumento na proliferação celular, como indicado para a PHA).

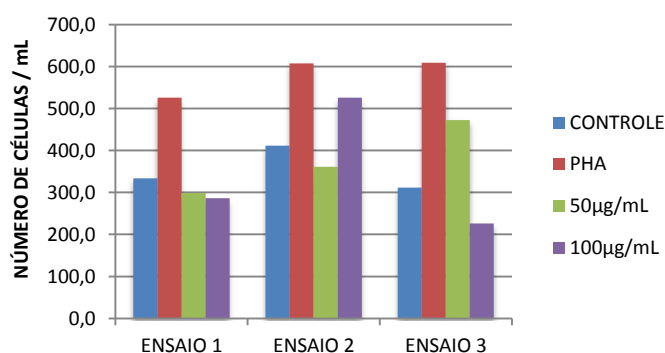


Figura 2: As colunas indicadas representam a média das duplicatas de cada ensaio. A coluna azul indica o controle, no qual as células foram cultivadas em condições ideais contendo o meio de cultivo (RPMI), antibiótico e as células. A coluna vermelha representa o teste com fitohemaglutinina (PHA), consistindo num meio com concentrações favoráveis para a proliferação celular. A coluna verde indica o teste contendo as células, o meio RPMI, antibiótico e a concentração de 50µg/mL do extrato de *Bauhinia glabra*. A coluna roxa representa o poço contendo a célula, o meio RPMI, antibiótico e a concentração de 100µg/mL do extrato de *Bauhinia glabra*.

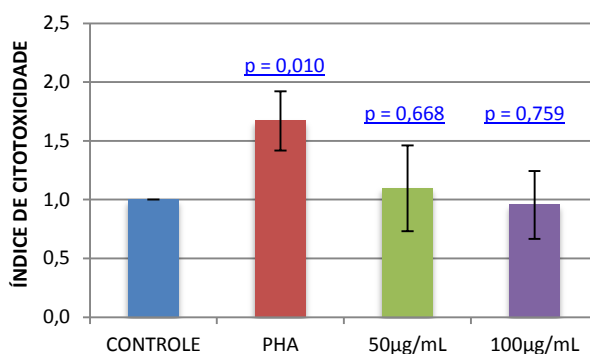


Figura 3: O gráfico foi construído conforme a fórmula $IC = n^{\circ} \text{ células no teste} / n^{\circ} \text{ células no controle}$. O número de células indicado na fórmula é a média das células contadas em todos os ensaios (para cada grupo). As linhas negras indicam o desvio padrão. O teste estatístico aplicado foi o Teste t, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O gráfico representa o índice de citotoxicidade do extrato.

DISCUSSÃO

Sabe-se que o mercado consumidor de ervas medicinais e vegetais movimenta em torno de 18 milhões de euros, o que mostra que plantas desempenham um papel importante na economia e na comunidade médica. Um em cada quatro fármacos usado em qualquer farmácia tem um ingrediente ativo derivado de uma planta⁽¹¹⁾.

Com o atual interesse no desenvolvimento de pesquisas sobre plantas medicinais é importante conhecer o potencial citotóxico e a real eficácia das plantas que são popularmente utilizadas para o tratamento das mais variadas doenças. Quando não se conhece os efeitos tóxicos, a inclusão de protocolos de citotoxicidade e toxicidade se fazem necessários, pois são úteis na determinação do potencial tóxico⁽¹²⁾.

Para avaliação da citotoxicidade do extrato da *Bauhinia glabra* sobre linfócitos humanos, os mesmos foram cultivados durante 48h em RPMI suplementado com 50 e 100µg/mL do extrato diluído em DMSO. Os resultados mostrados na figura 3 indicaram que, nas concentrações testadas, o extrato alcoólico a quente da casca da *Bauhinia glabra* não demonstrou citotoxicidade *in vitro* para os linfócitos normais.

Contudo, tais resultados não podem predizer que o extrato não seria efetivo em equivalentes linfocitários neoplásicos, uma vez que os mecanismos moleculares que regem tais células são diferenciados.

Potencialmente todos os tecidos do organismo humano seriam capazes de desenvolver câncer, dentre eles o tecido hematopoiético. Acredita-se que todas as células sanguíneas derivam de uma única célula e, a partir desta, se proliferam e formam a linhagem sanguínea de células linfóides e de células mielóides⁽¹³⁾. As leucemias, neoplasias do tecido hematopoiético, são divididas de acordo com o tipo celular atingido e o grau de maturação da célula afetada, as mais comuns são aquelas que afetam as células precursoras mielóides e linfóides, que se subdividem em agudas ou crônicas⁽¹⁴⁾. As leucemias linfóides são causadas pela proliferação maligna de células precursoras linfocitárias na medula óssea, já as leucemias mielóides iniciam-se pela proliferação das formas precursoras de granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos⁽¹⁵⁾.

As leucemias ainda são consideradas doenças incuráveis, pois mesmo com o tratamento farmacológico podem restar no organismo muitas células leucêmicas (doença residual), obrigando o paciente a continuá-lo para que não haja uma recaída⁽³⁾. O tipo do tratamento depende do tipo de leucemia, se aguda ou crônica, do estágio clínico, da idade do paciente, presença de sintomas e sinais de atividade da doença⁽¹⁶⁾.

Um das principais dificuldades do manejo das terapias antineoplásicas é a toxicidade associada a tais fármacos. A toxicidade dos quimioterápicos está relacionada com a dose,

idade do paciente, estágio clínico da doença, podendo ser dividida em aguda e tardia. Os quadros de toxicidade podem ser mais brandos com o uso associado de outros fármacos adjuvantes, como os antieméticos, porém, mesmo com o uso criterioso destes fármacos, a toxicidade é apenas amenizada e o paciente ainda assim apresenta sinais muitas vezes limitantes da terapia, tais como náuseas, vômitos, supressão da medula óssea, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, plaquetopenia, imunossupressão dentre outros⁽¹⁷⁾.

O uso de novas terapias para o tratamento do câncer, a exemplo os fitoterápicos, pode vir a ser uma alternativa, tendo em vista seus efeitos colaterais mais brandos quando comparados com os tratamentos convencionais.

O extrato da *Bauhinia glabra*, testado no presente estudo em células linfocitárias normais, não apresentou citotoxicidade para as mesmas, porém pode vir a apresentar atividade citotóxica em células leucêmicas, sabido da atividade antineoplásica de outras espécies do gênero *Bauhinia*. É preciso testar o extrato da *Bauhinia glabra* em células leucêmicas visto que não existem estudos desta espécie demonstrando atividade anticarcinogênica e antimutagênica.

Na medicina indiana a casca da *Bauhinia variegata* é utilizada para o tratamento de várias doenças, já a fervura das raízes é utilizada para distúrbios de digestão e age também como antídoto para veneno de cobra⁽¹⁸⁾.

Das sementes da espécie *Bauhinia bauhiniodes* foram obtidos inibidores de peptidases, elementos essenciais no processo de invasão tecidual e formação de metástases. Com ações inibidoras em cisteína e serino peptidases, e denominadas inibidoras de calicreína e cruzipaína, tais moléculas mostraram-se eficientes em inibir a elastase dos neutrófilos, a calicreína plasmática, assim como a plasmina. O efeito de tais inibidores sobre a viabilidade celular de tumores com capacidade de crescimento e invasão a outros tecidos foi comparado com a citotoxicidade de fármacos antineoplásicos, como o 5-fluorouracil. O inibidor da cruzipaína inibiu 40% da linhagem mais invasiva de células gástricas, mostrando-se mais eficiente que o 5-fluorouracil. Mesmo em altas doses ambas não interferiram na proliferação das células tronco da lamina basal e, desta forma, os inibidores da calicreína e da cruzipaína, obtidas das sementes da *Bauhinia bauhiniodes*, possivelmente bloqueiam a atividade de peptidases, podendo ser uma forma alternativa de tratamento para pacientes resistentes ao 5-fluorouracil⁽¹⁹⁾.

Outro representante do gênero, a *Bauhinia purpúrea*, é uma espécie com distribuição nos países asiáticos, utilizada para tratar doenças como o câncer gástrico e úlceras, utilizando-se a raiz, casca, caule e folha. Foi estudada a atividade antiúlcera do extrato da *Bauhinia*

purpúrea, obtido através da extração de folhas da planta. O extrato foi administrado em ratos por via oral após jejum de 24 horas. Os animais foram submetidos a etanol absoluto ou indução de úlcera gástrica pela ação da indometacina e ensaios de ligação do piloro após 30 minutos. Para avaliação da toxicidade foi utilizado uma única dose do extrato de 5g/kg e os animais foram observados por 14 dias. O extrato não produziu nenhum sinal de toxicidade nos animais, o mesmo exibiu atividade antiulcerogênica para o modelo induzido pelo etanol, e também aumentou a produtividade do muco na parede gástrica e o pH do suco gástrico de forma significativa. No ensaio de ligação do piloro, o volume total de acidez do suco gástrico foi reduzido. Assim sendo, o extrato mostrou possuir atividades antiúlcera, anti-secretora e citoprotetora, podendo este fato estar correlacionado com a presença de flavonoides e taninos⁽²⁰⁾.

Extratos da casca e do caule da *Bauhinia racemosa* também foram avaliados quanto ao potencial efeito antineoplásico. A planta foi avaliada contra o carcinoma de Ehrlich, uma neoplasia epitelial maligna transplantável em modelos animais⁽²¹⁾. Foi avaliada a atividade antitumoral e a capacidade antioxidante do seu extrato metanólico (50, 100 e 200mg/kg). Em análise da toxicidade aguda e de curta duração, verificou-se a segurança do extrato metanólico da planta. Posteriormente à inoculação do tumor, o extrato foi administrado diariamente por 14 dias e, depois de administrada a última dose após 18 horas de jejum, os ratos foram sacrificados para análise da atividade antitumoral. O extrato exibiu efeito no crescimento do tumor, na vida útil do hospedeiro e também apresentou alterações no perfil hematológico e no perfil bioquímico hepático. Foram verificadas reduções no volume do tumor, no volume globular, na contagem de células viáveis e, sobretudo, um aumento na contagem de células inviáveis, assim como também aumentou a vida útil dos camundongos portadores do tumor. O tratamento diminuiu os níveis de peroxidação lipídica e aumentou os níveis de glutathione, superóxido desmutase e catalase. Por tal efeito foi demonstrado que o extrato exibiu efeito antitumoral modulando e aumentando o sistema de defesa antioxidante nos camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich⁽²²⁾.

Destacando-se no estudo em questão o fato de a espécie *Bauhinia glabra* não ter apresentado citotoxicidade para as células normais, vindo a apresentar citotoxicidade para células leucêmicas, a mesma torna-se segura, levando em conta que produzirá maiores danos às células malignas do que às normais. Uma substância que não é tóxica para as células normais pode vir a ser tóxica para células neoplásicas, visto as diferenças bioquímicas e o crescimento de ambas, que quando combinados geram seus efeitos. Cada célula possui seu DNA que irá imprimir formas determinadas de RNA transportador, RNA ribossômico e RNA

mensageiro, e com isso distingue qual enzima será responsável pelo estímulo na célula. As enzimas empregam funções vitais às células, como sua proliferação e até mesmo sua função celular em que um desequilíbrio nesse processo resultará em alterações, sendo neste mecanismo celular alterado que os fármacos interferem⁽²³⁾.

CONCLUSÃO

Sabido que outras espécies do gênero *Bauhinia* exercem atividade antineoplásica, e sabendo que a espécie *Bauhinia glabra* não apresentou citotoxicidade em células normais, isto vem a torná-la uma alternativa para ser avaliada em células leucêmicas, podendo ser uma opção para o tratamento contra o câncer.

REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg AR. The Hallmarks of Cancer. University of California at San Francisco San Francisco, California Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts 02142. 2000. v. 100
2. Almeida LV, Leitão A, Reina BCL, Montanari A C, Donnici L. C, Lopes PTM. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Cellular Específicos e Ciclo-Cellular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. Belo Horizonte. Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005.
3. Ministério da Saúde (BR) – Instituto Nacional do Câncer. Tratamento do câncer. Disponível em :
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/tratamento>
> Acessado em : 23 out 2012.
4. CHEN-CHEN L , et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. Braz. J. Biol., v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.
5. Cunha LC, et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax e de suas frações em camundongos albinos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 44, n. 3, p. 485-491, 2008.

6. Rodrigues ACLN, Vaz AMS da F. *Bauhinia albicans* e *B. affinis*: espécies ameaçadas de extinção no estado do Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2007. Disponível em:
<http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_3/003.pdf > Acessado em :20 nov2012.
7. Torres, C.V, Aiko GM, Baviera AM, Sousa JR PT, Lopes CF, Kawashita NH. Avaliação Antidiabética do Extrato Bruto Etanólico (Ebetoh) de *Bauhinia Glabra* Jacq. Associação Brasileira de Química, Out 2010.
8. Batista S J, Arruda V de AF, de Azevedo RA, Alves AA. Composição Químico-Bromatológica do Feno de Cipó-De-Escada (*Bauhinia Glabra* Jacq.) em Cinco Estádios de Corte. Revista Brasileira de zootecnia, v. 28, n. 5, p. 914-918, 1999.
9. Ministério da saúde (BR). Portaria nº 1353, de 13 de junho de 2011. Dispõe sobre as normas e diretrizes que aprovam o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Ministério da Saúde, 2010.
10. Gaines H, Andersson L, BIBERFELS G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. Immunol Methods. 195:63-72. 1996.
11. Booth MG, Malmstrom DR, Kipp E, Paul A. Cytotoxicity of selected medicinal and nonmedicinal plant extracts to microbial and cervical cancer cells. Journal of Biomedicine and Biotechnology. v. 2012.
12. Shahid AA. Cytotoxicity evaluation of the crude extracts against Vero African Green monkey kidney cell lines. Pretória (ZA): Universidade de Pretória; 2012.
13. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11a ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 2008. p. 238, 246, 247.
14. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Fundamentos em Hematologia. Porto Alegre: editora Artmed, 5 ed. 2008. p. 167, 198,199, 201.

15. Guyton AC. Fisiologia Humana. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, S.A. 2005. p. 564.
16. Chiattonne CS. Indicações para início de tratamento na leucemia linfóide crônica. 2005. 5 f. - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo.
17. Sawada NO, Nicolussi AC, Okino L, Cardozo FMC, Zago MMF. Avaliação da qualidade de vida de paciente com câncer submetido à quimioterapia. Rev Esc. Enferm. USP.2009.
18. Agrawal RC, Pandey S. Evaluation of anticarcinogenic and antimutagenic potential of Bauhinia variegata extract in Swiss albino mice. Research Department, Jawaharlal Nehru Cancer Hospital and Research Centre, Bhopal, India. 2009.
19. Nakahata AM, Mayer B, Neth P, Hansen d, Sampaio MU, Oliva ML. Blocking the proliferation of human tumor cell lines by peptidase inhibitors from Bauhinia seeds. Department of Biochemistry, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil. Mar 2013.
20. Hisam EE, Zakaria ZA, Mohtaruddin N, Rofiee MS, Hamid HA, Othman F. Antiulcer activity of the chloroform extract of Bauhinia purpurea leaf. Faculty of Pharmacy, Universiti Teknologi MARA , Puncak Alam Campus, Bandar Puncak Alam, Selangor, Malaysia. Dez 2012.
21. Silva AE, Santos FGA, Cassali GD. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia, v.58 n.4 Belo Horizonte. Ago. 2006.
22. Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Kumarts. Antitumor activity and antioxidant role of Bauhinia racemosa against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University. Ago 2004.
23. Instituto Nacional do Câncer. Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. ver. atual. Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993.

24.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Avaliação In Vitro da Citotoxicidade de Extrato de Plantas Medicinais em Células Leucêmicas”

O projeto em questão visa avaliar a ação benéfica do extrato de plantas medicinais sobre as células afetadas pela leucemia. Para que a avaliação seja realizada necessita-se de amostras de sangue.

Para a realização do projeto necessita-se da coleta de 6mL de sangue, este que será coletado através de punção periférica no antebraço, podendo também ser utilizado o sangue oriundo de coletas rotineiras. Os riscos para o paciente são os mesmos que o de uma coleta de sangue periférico rotineiro, podendo originar hematomas e dor no local da punção.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Farm. Jeanine Marie Nardin que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Ovande do Amaral, 201. Jardim das Américas – Curitiba – PR – CEP: 81520060, Telefone (41) 3361-5195. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), no Hospital Erasto Gaertner – Rua Dr. Ovande do Amaral, 201 – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) **3218-0324**.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente

O paciente tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. É de compromisso do pesquisador utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***“Avaliação In Vitro da Citotoxicidade de Extrato de Plantas Medicinais em Células Leucêmicas”***.

Eu discuti com as alunas Krísala F. C. Ferreira e Ligia Zandoná sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do Pesquisador

Data ____ / ____ / ____