

**TATIANE MARQUES PORANGABA DE OLIVEIRA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE  $\beta$ -FICOCIANINA EM AMOSTRAS DE  
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili

**São Paulo  
2010**

## RESUMO

OLIVEIRA, T. M. P. **Clonagem e expressão de  $\beta$ -ficocianina em amostras de *Escherichia coli***. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

C-ficocianina (C-PC) é um pigmento solúvel em água e está presente em algumas microalgas de coloração azul esverdeada como, por exemplo, *Arthrospira platensis*. Este pigmento é constituído por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , com massas moleculares de 16 e 17 kDa, respectivamente. Recentemente foi demonstrado que a subunidade  $\beta$  da C-PC de *Anabaena* tem atividade antitumoral, pois é capaz de promover apoptose em células cancerígenas e inibir a proliferação celular. Os principais objetivos deste estudo foram clonar e expressar a subunidade  $\beta$  de C-PC ( $\beta$ -PC) de *A. platensis* em amostras de *Escherichia coli* e verificar a capacidade da proteína recombinante e da proteína C-PC em induzir ou não apoptose em células tumorais (HEp-2) e não tumorais (fibroblastos). Após expressão, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade. As células fibroblásticas e HEp-2 foram tratadas com 100  $\mu$ g das proteínas recombinante e C-PC por 6 h. Após tratamento, as células foram coradas com azul de toluidina (Método: Concentração Crítica de Eletrólitos - CCE). As células em apoptose foram detectadas pela coloração e por alterações morfológicas. Os resultados obtidos demonstram que ambas as proteínas,  $\beta$ -PC recombinante e C-PC, são capazes de induzir apoptose em células tumorais HEp-2 e não induzi-la em células fibroblásticas.

**Palavras-chave:** *Arthrospira platensis*. Subunidade  $\beta$  ficocianina. Clonagem. Expressão gênica. CCE. Apoptose. Fibroblastos. Células HEp-2.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, T. M. P. **Cloning and expression of  $\beta$ -phycoyanin in *Escherichia coli* strains.** 75 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

C-phycoyanin (C-PC) is a water soluble pigment and is present in some blue-green microalgae such as *Arthrospira platensis*. It is consisted of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , with molecular masses of 16 and 17 kDa, respectively. Recently it was shown that the  $\beta$  subunit of C-PC *Anabaena* has antitumor activity, since the  $\beta$ -PC inhibits cell proliferation and promotes cancer cell apoptosis. The main objectives of this study were cloning and expression the  $\beta$  subunit of C-PC ( $\beta$ -PC) of *A. platensis* in *Escherichia coli* and check the ability of the C-PC and recombinant proteins in apoptotic induction in cancer (HEp-2) and non-cancer (fibroblasts) cells. After expression, the recombinant protein was purified by affinity chromatography. The fibroblasts and HEp-2 cells were treated with 100  $\mu$ g of recombinant and C-PC, proteins respectively for 6 h. After treatment, the cells were stained with toluidine blue (Critical Electrolyte Concentration Method- CEC). Apoptosis cells were detected by staining and morphological changes. The results show that the recombinant  $\beta$ -PC and C-PC proteins are able to induce apoptosis in HEp-2 cells and don't induce it in fibroblasts cells.

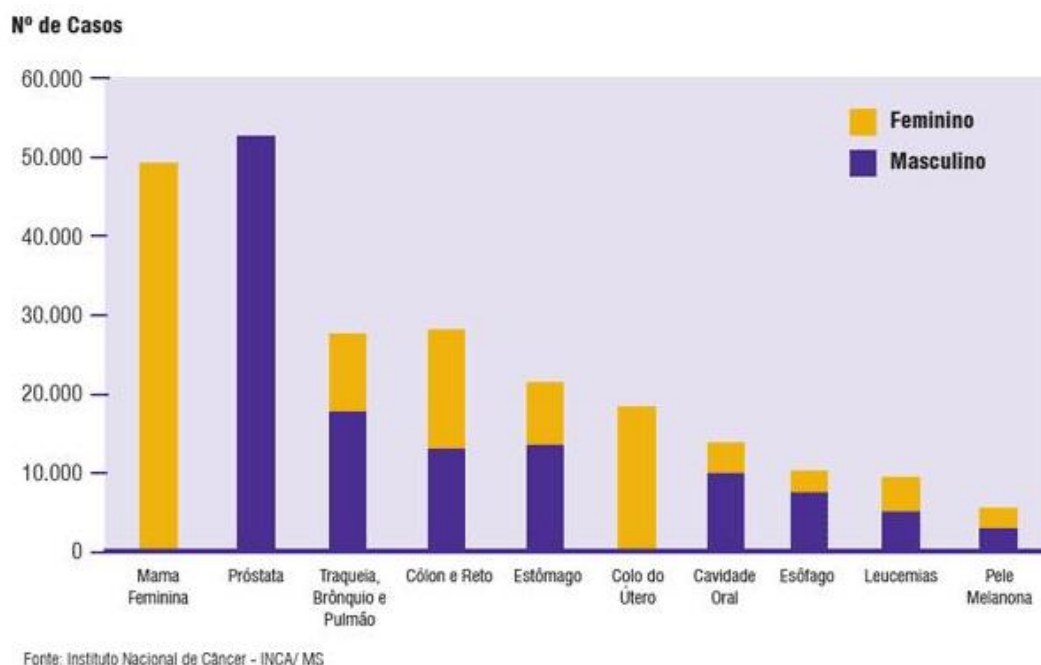
**Key words:** *Arthrospira platensis*.  $\beta$  subunit phycoyanin. Cloning. Gene expression. CEC. Apoptosis. Fibroblasts cells. HEp-2 cells.

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Estimativa do câncer no Brasil

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento incontrollável e desordenado de células, as quais possuem capacidade de invadir tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2010). Muitos fatores podem estar relacionados com o surgimento desta doença e entre eles estão a exposição excessiva a radiação solar, o tabagismo, o alcoolismo e os fatores hereditários (INCA, 2010).

No Brasil, as estimativas apontam que devem ocorrer aproximadamente 489.270 casos novos de câncer em 2010. Na figura 1 observamos que os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (INCA, 2010).



**Figura 1** – Número de casos estimados para 2010 dos tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, na população brasileira.

Como o número de casos de câncer é crescente na população brasileira, são necessários mais investimentos em ações que têm por finalidade o controle e o tratamento da doença. Pesquisas utilizando produtos naturais e/ou seus derivados estão sendo realizadas com o objetivo de descobrir novos tratamentos para o câncer (WANG et al., 2007; ROY et al., 2007).

## **1.2 Produtos naturais**

Desde os primórdios da civilização humana, o homem faz uso de produtos naturais para o tratamento de doenças. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro enumera aproximadamente 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO et al., 2002).

Muitos fármacos originaram-se de produtos naturais ou de seus derivados semi-sintéticos. Newman e Cragg (2007) citam em seu trabalho que das 100 substâncias ativas antitumorais surgidas entre 1982 e 2006, nove originaram-se de produtos naturais e, dezessete, de proteínas ou peptídeos isolados de um organismo ou produzidos em organismos hospedeiros por métodos biotecnológicos.

Atualmente, com tantos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento das mais diversas doenças, o uso de produtos naturais é uma alternativa. É de conhecimento geral, por exemplo, a ingestão de vegetais verde-escuros para o tratamento de anemia assim como a ingestão de frutas cítricas para o tratamento da gripe (SPETHMANN, 2003).

## **1.3 *Arthrospira platensis***

*Arthrospira* é uma alga unicelular microscópica azul esverdeada que tem origem em lagos salgados e alcalinos. Por ser extremamente adaptável ao ambiente, mesmo quando sujeita a condições extremas, o cultivo desta cianobactéria, assim como de outras microalgas, se tornou muito interessante. É utilizada na alimentação como dieta suplementar em muitos países (CHAMORRO et al., 1996) e possui grande interesse comercial, pois apresenta em sua composição

proteínas, lipídios, vitaminas, carboidratos, pigmentos e minerais (SANCHEZ et al., 2003).

Foi verificado que extratos de *Arthrospira* possuem propriedades antioxidantes, anticancerígenas, hepatoprotetoras, antivirais, antialérgicas, entre outras (SUBHASHINI et al., 2004).

Ismail et al. (2009) relataram pela primeira vez o efeito quimiopreventivo *in vivo* apresentado pela *Arthrospira* contra tumores de fígado de ratos induzidos por dibutilnitrosamina (DBN). A incidência destes tumores foi reduzida de 80 para 20%.

#### 1.4 Ficocianina

C-Ficocianina (C-PC) é um pigmento biliprotéico não tóxico solúvel em água e a principal biliproteína em *Arthrospira platensis* (BHAT e MADYASTHA, 2000). Biliproteínas são pigmentos absorvedores de luz encontrados primeiramente em algas vermelhas, cianobactérias e criptomonas. Estão localizados no exterior das membranas de tilacóide e são três os tipos encontrados em cianobactérias ou em algas vermelhas: aloficocianina e ficocianina, sempre presentes; ficoeritrina, presente somente em alguns organismos (SAMSONOFF e MacCOLL, 2001). As ficobiliproteínas são uma das principais constituintes de cianobactérias e representam até 50% do total de proteínas solúveis (FISHER et al., 1980).

C-PC pode corresponder a até 20% da massa seca da cianobactéria. Monômeros de C-PC são constituídos de duas subunidades protéicas designadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Esses monômeros possuem alta afinidade e se organizam em trímeros, hexâmeros e decâmeros (ROMAY et al., 1997). A estrutura química dos cromóforos de bilina da C-PC apresenta grande semelhança com a estrutura encontrada em bilirrubina (ROMAY; LEDON; GONZALEZ, 1998). O fato da C-PC possuir estrutura semelhante à bilirrubina é extremamente interessante porque já foi descrito por Stocker et al. (1987) que a bilirrubina possui atividade antioxidante, provavelmente por anular radicais peróxidos com a doação de um átomo de hidrogênio.

Eriksen (2008) apresentou em seu trabalho inúmeras aplicações da C-PC em alimentos, cosméticos, biotecnologia, diagnóstico e medicina.

É possível encontrar na literatura muitos trabalhos que descrevem as diversas propriedades da ficocianina, como: capacidade de inibir a atividade da

ciclooxigenase 2 (REDDY et al., 2000; REDDY et al., 2003), propriedades antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, antialérgica (ROMAY et al., 1997; ROMAY; LÉDON; GONZÁLEZ, 1998; ROMAY et al., 2003; MIRANDA et al., 1998; AYEHUNIE et al., 1998; KIM et al., 1998), antimutagênica (CHAMORRO et al., 1996) e anti-hiperalgésica (SHIH et al., 2009), capacidade de prevenir a injúria renal (FAROOQ et al., 2004), ser um potente neutralizador de radicais (ROMAY et al., 1997; BHAT e MADYASTHA, 2000) e possuir efeito neuroprotetor (RIMBAU et al., 2001; McCARTY; BARROSO-ARANDA; CONTRERAS, 2009).

Além das propriedades citadas, alguns trabalhos descrevem a capacidade antitumoral de C-PC. Esta capacidade antitumoral é devida a indução de apoptose em células cancerígenas AK-5 (células provenientes de tumor histiocítico), K562 (células provenientes de leucemia mielóide crônica) e HeLa (células provenientes de tumor do colo uterino) (PARDHASARADHI et al., 2003; SUBHACHINI et al., 2004; LI et al., 2006).

Roy et al. (2007) verificaram que o tratamento com C-PC diminuiu em 50% a proliferação de células cancerígenas tanto resistentes quanto sensíveis a doxorrubicina, enquanto o mesmo tratamento, não interferiu na proliferação dos hepatócitos primários de ratos. Com os resultados obtidos, Roy et al. (2007) sugeriram a C-PC como uma possível candidata para o tratamento de carcinoma hepato celular.

Chen e Wong (2008) mostraram que a ficocianina enriquecida com selênio, além de possuir um efeito protetor contra danos no DNA, é capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas A375 (células provenientes de melanoma) e MCF-7 (células provenientes de adenocarcinoma mamário) por desencadear, nestas células, apoptose mediada por mitocôndrias.

Devido a tecnologia do DNA recombinante é possível sintetizar proteínas heterólogas em diversos sistemas de expressão. Entre estes sistemas estão os microorganismos (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) e células de mamíferos e insetos. Atualmente diversas proteínas recombinantes, tais como insulina, alguns fatores da coagulação humana, anticoagulantes e fatores de crescimento hematopoiético, foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso terapêutico (FDA, 2010).

Wang et al. (2007) verificaram os efeitos da subunidade  $\beta$  recombinante da C-PC ( $\beta$ -PC) em linhagens de células cancerígenas (células provenientes de carcinoma de cabeça e pescoço e de leucemia mielóide crônica) e não cancerígenas (células derivadas de linfócitos B e T). Após o tratamento com  $\beta$ -PC, Wang et al. (2007) observaram nas células cancerígenas: despolimerização de microtúbulos e de filamentos de actina; acúmulo das atividades das caspases 3 e 8; retardamento do ciclo celular  $G_0/G_1$ ; diminuição significativa de GAPDH (gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase) nuclear e aumento da expressão de GAPDH. O trabalho supôs a interação entre  $\beta$ -PC e  $\beta$ -tubulina presente na membrana celular, sendo possivelmente esta associação a responsável pela despolimerização do citoesqueleto, microtúbulos e microfilamentos. É possível obter na literatura trabalhos, como o de Glaser, Han e Gross (2002), reportando a associação de GAPDH com  $\beta$ -tubulina, quando esta é direcionada para a membrana celular. Schmitz e Bereiter-Hahn (2002) mostraram que em situações de estresse, filamentos de actina se associam com GAPDH, podendo este trabalho, possivelmente, explicar a despolimerização de actina em células cancerígenas tratadas com  $\beta$ -PC. Wang et al. (2007) propuseram a interação entre  $\beta$ -PC e  $\beta$ -tubulina associada a GAPDH, e conseqüentemente, uma translocação do GAPDH nuclear para o citoplasma, já que foi verificado uma diminuição do nível de GAPDH nuclear e o aumento da expressão de GAPDH nas células cancerígenas tratadas com  $\beta$ -PC. Uma menor quantidade de GAPDH nuclear pode explicar o retardamento do ciclo celular em  $G_0/G_1$ , já que o GAPDH nuclear é importante para o controle transcricional de histonas, as quais são importantes na fusão da membrana nuclear, na manutenção da estrutura telomérica e conseqüentemente, necessárias para que a célula entre na fase S da divisão celular (SIROVER, 2005). Wang et al. (2007), sugeriram que GAPDH está associada com a apoptose (SCHMITZ, 2001) em células cancerígenas tratadas com  $\beta$ -PC.

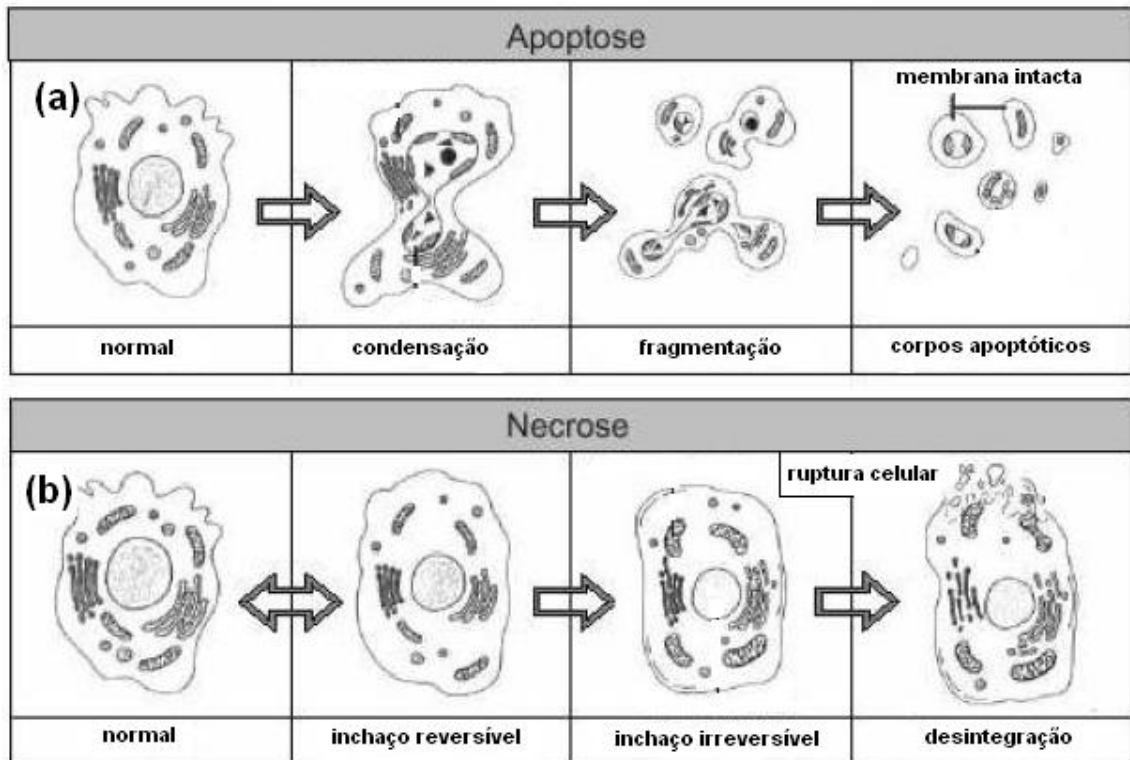
Os mecanismos que C-PC desencadeiam a apoptose parecem ser diferentes dos supostos para  $\beta$ -PC, pois, trabalhos sugerem que a C-PC insere-se no citoplasma de células cancerígenas (SUBHASHINI et al., 2004), enquanto a  $\beta$ -PC se acumula principalmente sobre a membrana plasmática (WANG et al., 2007). Além disso, não há evidências de que C-PC tenha algum efeito sobre GAPDH citoplasmático ou nuclear, já  $\beta$ -PC diminui o nível de GAPDH nuclear da célula (WANG et al., 2007).



Como a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásico e, vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, o conhecimento pelos mecanismos moleculares de apoptose e sua possível aplicação no tratamento do câncer tornaram-se muito interessantes.

## **1.5 Apoptose**

Apoptose, também conhecida como morte celular não seguida de autólise, é um tipo de autodestruição celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Geralmente está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos. A figura 2a apresenta um esquema ilustrativo das alterações morfológicas de uma célula em apoptose. Entre estas alterações estão a perda da integridade celular, a condensação e segregação cromatínica, a formação de massas cromatínicas granulares uniformes e delimitadas contra o envelope nuclear e a condensação do citoplasma. A progressão desta condensação é acompanhada pela invaginação das membranas celular e nuclear, fragmentação nuclear (cariorex) e o surgimento de corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos, sem ocasionar um processo inflamatório (GERSCHENSON e ROTELLO, 1992; MANJO e JORIS, 1995). Outra característica marcante da morte por apoptose é o padrão característico da fragmentação internucleossomal do DNA, gerando fragmentos entre 180 a 200 pb (WYLLIE; BEATHE; HARGREAVES, 1981; ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).



**Figura 2** – Esquema ilustrativo das alterações morfológicas progressivas observadas em células em apoptose e necrose. A: Célula em apoptose. Durante a progressão da apoptose é possível observar nas células: densa condensação da cromatina, diminuição do volume celular, fragmentação e formação de corpos apoptóticos com membranas e organelas intactas. B: Célula em necrose. Durante a necrose o volume celular aumenta, organelas e membranas são rompidas e há o extravasamento de líquido intracelular para o meio extracelular (Modificado de GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Diferente da morte programada por apoptose, na necrose há o aumento do volume total celular e das organelas, ocasionando o rompimento da membrana celular e das organelas, conforme pode ser observado na figura 2b. Outra característica é a inflamação: macrófagos circulantes e outros glóbulos brancos do sistema imune vão em direção as células necrosadas e as digerem. A inflamação auxilia na limitação da propagação da infecção e na remoção de restos de tecidos, mas a atividade e as secreções dos glóbulos brancos podem danificar os tecidos saudáveis vizinhos, algumas vezes de maneira extensiva (PAULA; VIEGAS; SILVA, 2002).

A apoptose pode ser desencadeada por diversos fatores, entre eles: danos no DNA, radiação ionizante, agentes quimioterápicos, ausência de fatores do crescimento, ligação de moléculas a receptores de membrana, entre outros. A sua

ativação pode ser iniciada de duas maneiras diferentes: pela via intrínseca ou pela via extrínseca (PAULA; VIEGAS; SILVA, 2002).

Existem diferentes metodologias para detecção de apoptose e viabilidade celular. Como exemplos destas metodologias estão: o método de redução do sal {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio]} (MTT), o qual é uma análise colorimétrica baseada na atividade da enzima succinildesidrogenase presente nas mitocôndrias de células viáveis (MOSMANN, 1983); o método de exclusão por azul de tripan, o qual permite diferenciar as células viáveis das não viáveis através da coloração, pois as células viáveis conseguem bombardear para o meio extracelular o corante, enquanto as não viáveis não o conseguem, adquirindo uma coloração azul; o método de TUNEL (*TdT-mediated Nick end-labeling technique*) (GRAVIELI; SHERMAN; BEM-SASSON, 1992), o qual se baseia na fragmentação do DNA e citometria de fluxo.

Como as células em apoptose apresentam características morfológicas marcantes (GERSCHENSON e ROTELLO, 1992; MANJO e JORIS, 1995), é também possível determiná-las por alterações morfológicas.

Mello e Vidal (1993) utilizaram a metodologia conhecida como Concentração Crítica de Eletrólitos (CCE) para diferenciar RNA e DNA. Posteriormente, Vidal et al. (1996) propuseram a mesma metodologia como indicativa de apoptose. Esta técnica colorimétrica esta baseada no princípio de metacromasia apresentada pelos ácidos nucléicos quando corados com o corante azul de toluidina. Em células em apoptose é possível observar a cromatina corar-se em verde, enquanto a maior parte dos corpos apoptóticos cora-se em violeta devido a presença de RNA (Vidal et al., 1996). Desta forma, a identificação do fenótipo celular apoptótico é facilitada.

Como a maioria dos quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer não são específicos às células cancerígenas, após exposições contínuas da droga, estas podem provocar resistência celular e diversos efeitos colaterais nos pacientes. O uso de proteínas heterólogas para tratamento de doenças vêm crescendo assim como as pesquisas nesta área. O fato da proteína  $\beta$ -PC recombinante induzir apoptose em células cancerígenas, provenientes de tumor de cabeça e pescoço e de leucemia mielóide crônica, além de ter baixa toxicidade em células não cancerígenas (WANG et al., 2007) a faz ser uma possível candidata no tratamento contra o câncer.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Foi realizada a clonagem e expressão do gene  $\beta$ -pc em amostra de *E. coli* BL21.
- O fragmento clonado no vetor pET28a apresentou um códon de parada no interior da sequência de nucleotídeos.
- A proteína  $\beta$ -PC recombinante, mesmo não possuindo a mesma sequência de aminoácidos da proteína  $\beta$ -PC de *A. platensis* (UTEX 1926), foi capaz de induzir apoptose em células tumorais HEP-2.
- Tanto a proteína  $\beta$ -PC recombinante quanto a C-PC não foram capazes de induzir apoptose em células fibroblásticas.
- A detecção de apoptose foi realizada pela metodologia de CCE agregada à análise das características morfológicas.
- Os resultados obtidos incentivam a realização de outros ensaios de apoptose com outras linhagens de células cancerígenas.
- Este trabalho também incentiva a utilização de métodos eficientes e rápidos que apresentam pequenos riscos ao manipulador.
- Em resumo, este trabalho cria perspectivas promissoras para uma futura utilização das proteínas C-PC e  $\beta$ -PC recombinante nos tratamentos de tumores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABDUVALIEV, A. A.; GIL'DIEVA, M. S. Differential trypan blue staining of tumor cells for the determination of apoptosis. **Klin. Lab. Diagn.**, v.2, p. 36-38, 2006.

AYEHUNIE, S.; BELAY, A.; BABA, T. W.; RUPRECHT, R. M. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 18, p. 7-12, 1998.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **IDEAL.**, v. 275, p. 20-25, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; FAVILA, L.; BOURGES, H. Pharmacology and toxicology of *Spirulina* alga. **Rev. Invest. Clin.**, v. 48, p. 389-399, 1996.

CHEN, T.; WONG, T. S. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 4352-4358, 2008.

ERIKSEN, N. K. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 80, p. 1-14, 2008.

FAROOQ, S. M.; ASOKAN, D.; SAKTHIVEL, R.; KALAISELVI, P.; VARALAKSHMI, P. Salubrious effects of c-phycocyanin against oxalate-mediated renal cell injury. **Clin. Chim. Acta.**, v. 348, p. 199-205, 2004.

---

**\*De acordo com:**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FISHER, R. G.; WOODS, N. E.; FUCHS, H. E.; SWEET, R. M. Three-dimensional structures of C-phycoyanin and B-phycoerythrin at 5-A resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 11, p. 5082-5089, 1980.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA approved drug products**. Available from: < <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>>. Acesso em 05 fev. 2010.

GE, B.; SUN, H.; FENG, Y.; YANG, J.; QIN, S. Functional biosynthesis of an allophycoyanin beta subunit in *Escherichia coli*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 107, n. 3, p. 246-249, 2009.

GERSCHEINSON, L. E.; ROTELLO, R. J. Apoptosis a different type of a cell death. **FASEB J.**, v. 6, p. 2450-2455, 1992.

GLASER, P. E.; HAN, X.; GROSS, R. W. Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyses membrane fusion: implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 22, p. 14104-14109, 2002.

GRAVELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 493-501, 1992.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 06 jan. 2010.

ISMAIL, M. F.; ALI, D. A.; FERNANDO, A.; ABDRABOH, M. E.; GAUR, R. L.; IBRAHIM, W. M.; RAJ, M. H. G.; OUHTIT, A. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. **Inter. J. Biol. Sci.**, v. 4, p. 377-387, 2009.

KIM, H. M.; LEE, E. H.; CHO, H. H.; MOON, Y. H. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 1071-1076, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, B.; GAO, M.; ZHANG, X.; CHU, X. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 43, p. 155-164, 2006.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDARA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; ZIPURSKY, S. L.; DARNELL, J. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054 p.

LORIMIER, R.; BRYANT, D. A.; PORTER, R. D.; LIU, W. Y.; JAY, E.; STEVENS, S. E. Genes for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of phycocyanin. **Microb.**, v. 81, p. 7946-7950, 1984.

McCARTY, M. F.; BARROSO-ARANDA, J.; CONTRERAS, F. Oral phycocyanobilin may diminish the pathogenicity of activated brain microglia in neurodegenerative disorders. **Med. Hypotheses**, 2009. [s. pag.]

MANJO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v. 59, p. 87-93, 1989.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; DANTAS, M. M.; MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Asta Histochem. Cytochem.**, v. 26, p. 1-3, 1993.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima*. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 31, p. 1075-1079, 1998.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

PARDHASARADHI, B. V. V.; ALI, A. M.; KUMARI, A. L.; REDDANNA, P.; KHAR, A. Phycocyanin - mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. **Mol. Cancer Ther.**, v. 2, p. 1165-1170, 2003.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expr. Purif.**, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **J. Chromatography**, v. 1127, p. 76-81, 2006.

PAULA, K. M.; VIEGAS, P. B.; SILVA, P. G. Apoptose para o bem e para o mal. **Bio. Terra**, v. 2, n. 2, 2002.

PILOT, T. J.; FOX, J. L. Cloning and sequencing of the genes encoding the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. **Bioch.**, v. 81, p. 6983-6987, 1984.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

REDDY, C. M.; BHAT, V. B.; KIRANMAI, G.; REDDY, M. N.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, K. M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. **IDEAL.**, v. 277, p. 599-603, 2000.

REDDY, M. C.; SUCHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase – 2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnol.**, v. 10, p. 5-12, 2005.

RIMBAU, V.; CAMINS, A.; PUBILL, D.; SUREDA, F. X.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; JIMÉNEZ, A.; ESCUBEDO, E.; CAMARASA J.; PALLÀS, M. C-Phycocyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. **Arch. Pharmacol.**, v. 364, p. 96-104, 2001.



ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 36-41, 1997.

ROMAY, C.; LEDON, N.; GONZALEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 47, p. 334-338, 1998.

ROMAY, C.; GONÇALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 4, p. 207-216, 2003.

ROY, K. R.; ARUNASREE, K. M.; REDDY, N. P.; DHEERAJ, B.; REDDY, G. V.; REDDANNA, P. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycoyanin induces apoptosis in the doxorubicin-resistant human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 47, p. 159-167, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1659 p.

SAMSONOFF, W. A.; MacCOLL, R. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. **Arch. Microbiol.**, v. 176, p. 400-405, 2001.

SANCHEZ, M.; BERNAL-CASTILHO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUES, I. *Spirulina* (*Arthrospira*): an edible microorganism. A Review. **Rev. Fac. Ciências**, v. 8, n. 1, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMITZ, H. D. Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 6, p. 419-427, 2001.

SCHMITZ, H. D.; BEREITER-HAHN, J. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cells only. **Cell Biol. Int.**, v. 2, p. 155-164, 2002.

SHIH, C. M.; CHENG, S. N.; WONG, C. S.; KUO, Y. L.; CHOU, T. C. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoerythrin. **Anesth. Analg.**, v. 4, p. 1303-10, 2009.

SIROVER, M. A. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. **J. Cell Biochem.**, v. 1, p. 45-52, 2005.

SPETHMANN, C. N. **Medicina alternativa de A a Z**. 6. ed. Uberlândia: Natureza, 2003. 392 p.

STOCKER, R.; YAMAMOTO, Y.; McDONAGH, A. F.; GLAZER, A. N.; AMES, B. N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science**, v. 235, p. 1043-1046, 1987.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDY, M. C.; REDDY, M. M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-phycoerythrin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-k562. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 453-462, 2004.

TOOLEY, A. J.; CAI, Y. A.; GLAZER, A. N. Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoerythrin holo-a subunit in a heterologous host. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, p. 10560-10565, 2001.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VIDAL, B. C.; BARBISAN, L. F.; MARIA, S. S.; RUSSO, J.; MELLO, M. L. S. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. **Apoptosis**, v. 1, p. 218-221, 1996.

WANG, H.; LIU, Y.; GAO, X.; CARTER, C. L.; LIU, Z. R. The recombinant  $\beta$  subunit of C-phycoerythrin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. **Cancer Lett.**, v.247, p. 150-158, 2007.

WYLLIE, A.H.; BEATHE, G. J.; HARGREAVES, A. D. Chromatin changes in apoptosis. **Histochem. J.**, v. 13, p. 681-692, 1981.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.