UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ARINA LÁZARO ROCHETTI

Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas.

Pirassununga

2015

ARINA LÁZARO ROCHETTI

Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas.

"Versão Corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Rochetti, Arina Lázaro
R677c Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas / Arina Lázaro Rochetti. -- Pirassununga, 2015.
74 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu.

1. Câncer de pulmão 2. *Paullinia cupana* 3. Células-tronco cancerosas. I. Título.

ARINA LÁZARO ROCHETTI

Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células tronco cancerosas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data de aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

A pessoa que nunca perdeu a esperança

Ao maior exemplo de vontade de viver que eu já conheci

Àquela pessoa que é capaz de alegrar o seu dia apenas com um simples "BOOOM DIIIIA"

A ela que apesar de tudo, sempre põe um sorriso no rosto.

À minha Tia Leda

AGRADECIMENTOS

A Deus e A Nossa Senhora por me dar uma nova chance de viver e aproveitar da melhor maneira a vida, se não fosse por eles, hoje talvez eu não estivesse aqui, por isso só tenho a agradecer à Eles todos os dias;

Aos meus queridos pais, Silvio e Lucimari, exemplo de simplicidade e de companheirismo; Agradeço por serem meus pais, não poderia escolher ninguém melhor que vocês para esta tarefa árdua; Agradeço por SEMPRE cuidarem de mim durante toda essa minha jornada e sei que não foi fácil, hoje só temos que olhar pra traz e rir de tudo o que aconteceu e não mais "chorar". Só tenho a agradecer a vocês, pois com vocês aprendi que nesta vida não é preciso muito para ser feliz; como também aprendi que nada em nossas vidas é por acaso, (como a Mãe sempre diz: – "Se tiver que acontecer, vai acontecer e tem que ser com você, não importa quando, como, ou onde, mas você terá que passar por isso para aprender a viver!"). Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos, Rafael e Flavia, por todo momento que passamos juntos, por todas as horas de reflexão e de "papos jogados pro ar" e por me darem a chance de estudar, pois se não fosse por vocês (e vocês sabem disso) eu não teria condições de ter me formado em Biologia, que eu amo tanto quanto vocês... hehehehe;

A minha prima "QUASE IRMÃ" Joyce, que sempre está ao meu lado, me atormentando loucamente e me fazendo rir mesmo quando não podemos;

A TODA minha família que eu adooorrooo e... mesmo sendo muito, mas muuuiiito grande (rs), sempre dão um jeitinho de se reunir e passar ótimos dias juntos, além de estarem sempre presente em todos os momentos, não importa se bons, ruins ou "mais ou menos", sempre estamos juntos. E... como eu sempre digo: "FAMÍLIA pra mim está em PRIMEIRO lugar, o resto fica pra depois se sobrar tempo"

Ao pessoal do "colete amarelo" pela "longa" amizade (melhor não mencionar o quão longa)... só sei de uma coisa: quanto mais o tempo passa, (não importa o tempo que ficamos sem nos encontrar), mais a gente se diverte =D

Aos meus amigos Anderson, Ju, Mi e Pri e seus "respectivos" Michele + João Vitor, Pera, Willie e Krebs + Yguinho, que apesar da distancia e de 6 anos depois de formados, sempre que estamos junto é tudo de bom, sempre temos muitas coisas pra contar, dos mais variados assuntos (e bota variado nisso), mas parece que nunca estivemos longe uns dos outros.

A Lígia Marcela, que sempre me deu altos conselhos e sempre que eu peço faz aquele bolo de morango com cobertura de chocolate, pra gente sentar e jogar conversa fora.

A toda a turma do LMMD (desde estagiários, ICs, Pós-Graduandos, Pós-Doc, Funcionários e Professores – "sem citar nomes"), que desde o meu "início de FZEA" estiveram presentes e me ensinaram muitas coisas, que sou muito grata por isso!

A toda a turma do LOCT inclusive os "Strefezzet's", desde os Pré-ICS aos Doutorandos, sem exceção, (obs: também não vou citar nomes pra não ter perigo de esquecer ninguém); Obrigada por toda ajuda (apesar de ser só de vez em quando – rsrsrs), toda paciência que têm comigo e com meu "baixíssimo" nível de grosseria =D... Além das discussões e de vez em quando algumas "caras viradas", gosto muito de todos... afinal, passamos mais tempo juntos dentro do LOCT do que a gente deveria (rs) e acho que a gente podia ter logo aquela mesa de pebolim e de tênis-de-mesa pra desestressar e relaxar um pouquinho... #ficaadica. Obrigada por TUDO, sem vocês meus dias não seriam a mesma coisa.

A "Lindsay Maria" por todos os momentos de risadas, desabafos e confissões durante estes anos de USP.

A Julia, a Silvia e a Flavia por todas as dicas, conselhos, paciência e ajuda (sempre "quebrando um galho" – ou melhor, sempre quebrando uma árvore inteira - rs)

A todas as Professoras do Laboratório de Medicina Preventiva e Aplicada por me cederem o laboratório para poder realizar algumas análises.

A Aninha e a Naira que nestes últimos meses tem sido as mais companheiras de todas, para tudo e para todos os momentos (muitas risadas e às vezes até rolava aquele "chororo", altos conselhos e longas discussões – até mesmo na mesa do bar, onde todos ficavam olhando e a gente nem ligava) e... não pode faltar aqui a italiana – Claudia.

A Patrícia V. B Palma, por me salvar várias vezes, por todas as dicas que me deu, por aguentar nós "3" ai na sua salinha te atormentando só pouquinho e claro, deixando seu dia mais feliz... rs.

As funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Diretor Presidente Dimas Tadeu Covas;

Ao Heidge, meu orientador e, o "su-chefe" mais mala que alguém possa ter, mas que apesar de tudo e de todas as desavenças durante estes (quase) 6 anos de trabalho juntos, sempre me entendeu, me apoiou e, mesmo algumas vezes reclamando sobre minhas atitudes, me ensinou tudo o que eu deveria saber pra trabalhar em um laboratório, além de "me ensinar" a falar "Oi/Bom Dia/ Boa Tarde/Boa Noite" ao chegar a qualquer lugar... e... de sempre acreditar e confiar em mim para tomar conta de todas as coisas do seu laboratório. "Obrigada!"

Ao meu "chefe de verdade ou de papel" Ricardo Strefezzi, não sei nem o que dizer, mas não podia deixar você de fora... pois, apesar de eu não fazer muita coisa pra você, porque o Heidge não deixa (rs), você é o "chefe de verdade" que eu mais gosto!

E por fim a FZEA-USP, pelo apoio, aprendizado de todos esses anos e pelos amigos que aqui fiz.

Muito Obrigada!!!

Lute por seus sonhos, ideais e objetivos,

Se precisar renuncie um orgulho,

Deixe rolar uma lágrima no rosto,

Mas nunca renuncie o seu direito de ser feliz,

De ser você.

"*Jucimara Araujo*"

RESUMO

ROCHETTI, A. L. **Caracterização dos efeitos antitumorais do guaraná sobre modelo murino de células-tronco cancerosas.** 2015. 74 pág. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O câncer de pulmão está entre os tipos de câncer com maiores índices de mortalidade no mundo. Na década de 90, houve a descoberta de populações de células tumorais com características de células-tronco e implicou na hipótese das células-tronco cancerosas (CTCs). Se a hipótese das CTCs for correta, a recorrência/recidiva dos cânceres é gerada por uma porcentagem de células (CTCs) que prolifera pouco e é resistente a quimioterapia convencional. Desta forma, a busca por novos alvos terapêuticos que tenham como alvo estas CTCs tem enorme implicação no desenvolvimento de novos fármacos ou modalidades terapêuticas contra o câncer. O guaraná (*Paullinia cupana Mart var. sorbilis*) tem demonstrado efeitos promissores sobre o câncer, em especial efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos. Portanto, objetivando-se neste projeto avaliar a presença de CTCs a partir de células tumorais de pulmão de camundongo, onde se possa conseguir rapidamente uma alta porcentagem deste tipo celular para posteriores estudos, além de avaliar os efeitos do extrato etanólico do guaraná e de suas frações butanólica e aquosa, sobre as células tumorais e em especial verificar os efeitos sobre a população rica em CTCs, onde foi possível observar a presença de possíveis CTCs, a partir de cultivo de células tumorais de pulmão de camundongo, como também que o guaraná apresentou um efeito sobre estas possíveis CTCs devido a diminuição da expressão dos genes ABCG2 e ALDH1a1.

Palavras chave: Câncer de pulmão, *Paullinia cupana*, células-tronco cancerosas.

ABSTRACT

ROCHETTI, A. L. **Characterization of the antitumor effects of guarana on murine model of cancer stem cells.** 2015. 74 pág. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Lung cancer is among the cancers with the highest mortality rates in the world. In the 90's, there was the discovery of tumor cell populations with stem cell characteristics implied in the case of cancer stem cells (CSCs). If the hypothesis is correct CSCs of the recurrence / relapse of cancers is generated by a percentage of cells (CSCs) that growth low and are more resistant to conventional chemotherapy. Thus, the search for new therapeutic targets that target these CSCs has huge implications in developing new drugs or therapeutic approaches against cancer. Guarana (*Paullinia cupana Mart var. Sorbilis*) has shown promising effects on cancer, especially chemopreventive and anticancer effects. Therefore, the objective in this project is to evaluate the presence of CSCs from tumor cells of mouse lung, where it can quickly get a high percentage of this cell type for further studies and to evaluate the effects of ethanol extract of guarana and its butanol and aqueous fractions on tumor cells and in particular to verify the effect on the population rich in CSCs, where it was possible to observe the possible presence of CSCs from cultivation of tumor cells from mouse lung, as well as guarana presented an effect on these CSCs possible to decreased expression of ABCG2 and ALDH1a1 genes.

Key words: Lung cancer, *Paullinia cupana*, cancer stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência e mortalidade de câncer no mundo. 18
Figura 2 – Estimativa de incidencia e mortalidade por câncer nos Estados Unidos em 2015. 20
Figura 3 – Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2014/2015. 21
Figura 4 – Estimativa das taxas brutas de incidência de novos casos por 100 mil habitantes, em relação ao sexo e localização primária 23
Figura 5 – *Paullinia cupana* (folhas, flores e frutos) 27
Figura 6 - Células de pulmão de camundongo. 32
Figura 7 - Esquema ilustrativo - Experimento 1. 34
Figura 8 - Esquema ilustrativo – Experimento 2 35
Figura 9 – Esquema ilustrativo do método utilizado para a técnica de *Scratch Wound* 38
Figura 10 – Modelo utilizado para calcular o tempo de fechamento do *Scratch* 38
Figura 11 – Esquema ilustrativo do método utilizado para o teste *Transwell* 40
Figura 12 – Esquema ilustrativo utilizado para contagem das células. 40
Figura 13 – Esquema ilustrativo da comparação da atividade enzimática de ALDH entre uma célula regular e CT ou CTC 41
Figura 14 - Esquema ilustrativo para preparação do EEB, BUF e FAQ do guaraná. 43
Figura 15 – Esquema ilustrativo Teste de citotoxicidade do guaraná por MTT. 45
Figura 16 – Diferença morfológica entre as linhagens E10 e E9 com relação a disposição dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto. 50
Figura 17 – Migração das células e fechamento do *Scratch wound* 52
Figura 18 – Diferença entre a quantidade de células E10 e E9 capazes de invadir a ECM gel-*Transwell* 53
Figura 19 – Análise da atividade de ALDH presentes em células E10 e E9 56
Figura 20 – Avaliação da citotxicidade do Extrato de *Paullinia cupana* e das frações butanólica e aquosa 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores de células-tronco cancerosas mais utilizados em alguns tumores sólidos. 25
Tabela 2 - *Primers* utilizados na realização das RT-PCRs..... 47
Tabela 3 – Tempo de duplicação das linhagens E10 e E9. 48
Tabela 4 – Porcentagem de células ALDH positivas presentes em E10 e E9 55
Tabela 5 – Valores da concentração de inibição de 50% da viabilidade celular (IC50), após tratamento com *Paullinia cupana.* 59
Tabela 6 – Análise da expressão gênica para os genes 18s, ABCG2, ALDH1A1 e CK18 em células E9..... 62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Índice de mortalidade em homens no âmbito mundial – 2012. 19
Gráfico 2 – Índice de mortalidade em mulheres, no âmbito mundial – 2012..... 19
Gráfico 3 – Incidência de novos casos câncer no Brasil para 2014/2015, separados por sexo. 21
Gráfico 4 – Neoplasias com maiores índices de mortalidade no mundo. 23
Gráfico 5 – Análise do tempo de migração, comparando os tempos de 0 (zero) horas e 26 horas.....51
Gráfico 6 – Comparação da capacidade de invasão após teste de *Transwell* 54
Gráfico 7 - Análise da atividade enzimática de ALDH presente nas células E10 e E9 por Citometria de fluxo.....58
Gráfico 8 – Quantificação relativa da expressão gênica por RT-PCR em células E9..... 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 A RELEVÂNCIA DO CÂNCER 17

2.2 CÂNCER DE PULMÃO 21

2.3 CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS O NOVO ALVO PARA TERAPIAS 24

2.4 GUARANÁ - *Paullinia cupana (P.c)* 26

3 HIPÓTESE 29

4 OBJETIVOS 30

5 MATERIAIS E MÉTODOS 31

5.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO 31

5.4 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRESENÇA DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS A PARTIR DE MODELO MURINO DE CÉLULAS DE PULMÃO. 36

5.4.2 Tempo de duplicação celular 36

5.4.3 Análise morfológica celular através de marcação com faloidina 37

5.4.4 Teste de migração – *Scratch wound* 37

5.4.5 Teste de invasão – *Transwell* 39

5.4.6 Análise da atividade enzimática de ALDH em CTCs através de citometria de fluxo 41

5.5 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E SUAS FRAÇÕES: BUTANÓLICA (BUF) E AQUOSA (FAQ) DE GUARANÁ, SOBRE A POPULAÇÃO DE CTCs EM CÉLULAS TUMORAIS – E9. 42

5.5.1 Preparo do extrato etanólico bruto e suas frações butanólica e aquosa 42

5.5.2 Teste de citotoxicidade e ensaio colorimétrico por MTT 44

5.5.3 Extração de RNA e PCR em tempo real (RT-PCR) 46

5.5.4 Análise estatística 47

6 RESULTADOS 48

5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRESENÇA DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS (CTCS) A PARTIR DE MODELO MURINO DE CÉLULAS DE PULMÃO 48

5.1.1 Tempo de duplicação celular 48

5.1.2 Análise morfológica das células 49

5.1.3 Teste de migração – *Scratch Wound* 51

5.1.4 Teste de Invasão – *Transwell* 52

5.1.5 Análise da atividade enzimática de aldeído desidrogenase nas CTCs através de Citometria de Fluxo 54

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES BUTANÓLICA (BUF) E AQUOSA (FAQ) DE *PAULLINIA CUPANA*, SOBRE A POPULAÇÃO DE CTCS DAS CÉLULAS TUMORAIS E9 59

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade do EEB, BUF e FAQ de *Paullinia cupana* (*P.c.*) 59

5.2.2 Análise da expressão gênica 61

Ao analisar todos estes dados da expressão gênica, pode-se dizer que o guaraná apresentou efeito agindo sobre as CTCs, devido a diminuição da expressão dos genes ABCG2 e ALDH1a1, que são altamente expressos em células-tronco cancerosas e que as células analisadas se mantinham viáveis, devido a não alteração da expressão de CK18, que é bastante importante para manter a integridade celular. 62

6 DISCUSSÃO 63

7 CONCLUSÃO 68

8 REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) publicou em 2014 os dados da estimativa para a incidência de novos casos de câncer no Brasil validos para 2014 e 2015 onde ocorreriam cerca de 580 mil novos casos de câncer, sendo que destes, aproximadamente 27 mil são de câncer de pulmão (INCA, 2014). Mesmo com o passar dos anos e o grande aumento no número de estudos relacionados aos cânceres, o tratamento e cura ainda são considerados um dos maiores desafios da medicina das últimas décadas (CHABNER; ROBERTS, 2005). Contribuindo para esta dificuldade está a grande gama de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem no câncer, já que mesmo tumores de um mesmo tipo e grau histopatológico podem ter alterações genéticas completamente diferentes (CHABNER; ROBERTS, 2005). Desta maneira, a busca por alvos terapêuticos que tenham como objetivo a supressão da proliferação tumoral e metastatização são altamente necessários.

Na década de 90, foi descoberta uma população de células tumorais, com características de células-tronco (BONNET; DICK, 1997), estas são conhecidas como células-tronco cancerosas (CTCs), do inglês, *Cancer Stem Cells* – CSCs, pois elas apresentam características semelhantes à de células-tronco normais, como pluripotência, capacidade de auto-renovação, diferenciação em diferentes tipos de células, resistência a múltiplas drogas (CRIPE et al., 2009). Se esta hipótese das CTCs for correta, a recorrência/recidiva dos cânceres é gerada por uma pequena porcentagem de células (as ditas CTCs) que proliferam pouco e são mais resistentes a quimio ou radioterapia convencional, pois estas terapias têm como alvo as células que se proliferam rapidamente, não atingido assim, as possíveis CTCs (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Desta forma, a busca por novos alvos terapêuticos que tenham como alvo estas CTCs tem enorme implicação no desenvolvimento de novos fármacos ou modalidades terapêuticas contra o câncer. Esta busca tem tido grande ênfase nos produtos naturais, reconhecidamente fontes de novas moléculas para estudo e avaliação experimental em diversas áreas da medicina e em especial no câncer (SURH, 2003). Dentro desta área, a análise dos efeitos do guaraná (*Paullinia cupana Mart var. sorbilis*) tem demonstrado

efeitos promissores sobre o câncer, em especial efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos (FUKUMASU, 2008; FUKUMASU et al., 2006).

Portanto, o objetivo do presente estudo, foi primeiramente avaliar a presença de CTCs a partir de um modelo murino de tumor epitelial, neste caso, tumor de pulmão, para posteriores estudos sejam de caracterização desta sub-população ou mesmo para avaliação de novas terapias sobre este tipo celular. A segunda parte deste projeto foi avaliar os efeitos do extrato etanólico do guaraná e de duas frações deste extrato: butanólica e aquosa, sobre as células tumorais e em especial verificar os efeitos sobre a população rica em CTCs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

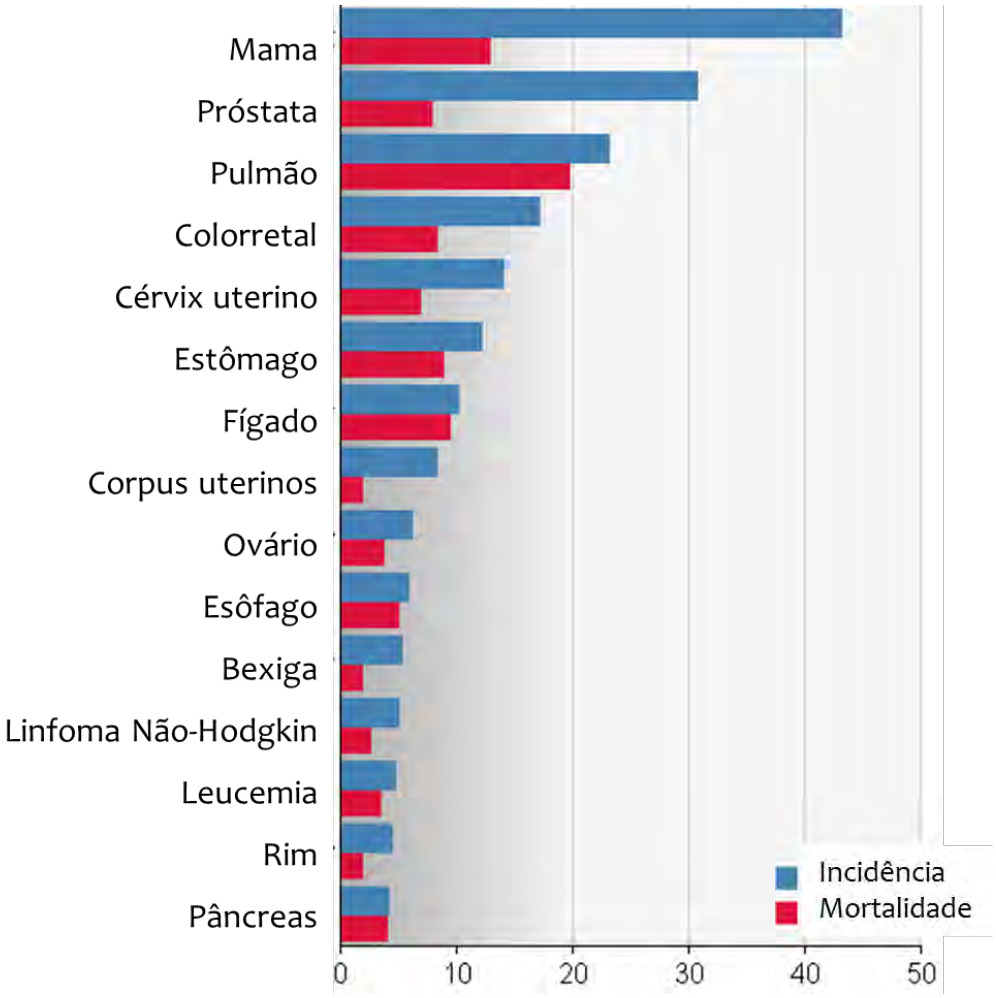
2.1 A RELEVÂNCIA DO CÂNCER

O câncer ou "neoplasia" (do grego – *Neo* = novo e *plasis* = crescimento, multiplicação celular) é o nome designado a mais de cem diferentes tipos de doenças, conhecidas por apresentar uma proliferação desenfreada das células, desrespeitando os limites normais da divisão celular, formando uma massa de células (INCA, 2014; JOHN, 2005). Além disso, algumas células podem apresentar um comportamento invasivo e metastático, ou seja, são capazes de invadirem tecidos adjacentes, atingirem o sistema circulatório, migrar para novos tecidos e dar origem a uma formação secundária, finalizando assim o processo (ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, 2010).

O câncer está entre as doenças com maior índice de mortalidade no mundo. É um dos maiores desafios da medicina, pois sua grande complexidade implica em encontrar um tratamento efetivo e sua cura (CHABNER; ROBERTS, 2005). Mesmo com o elevado número de pesquisas relacionadas ao tratamento desta enfermidade e a grande divulgação sobre como prevenir vários tipos de câncer, ainda existe um aumento alarmante na incidência, prevalência e mortalidade em todo mundo, independente de raça, sexo, idade, condição social ou localização quanto a distribuição geográfica ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]; KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006). A IARC (*International Agency for Research on Cancer* – Organização Mundial da Saúde) registrou em 2012, um aumento de 8% na mortalidade por câncer, chegando a 8,2 milhões de mortes, além de um aumento de quase 10% na incidência da doença, correspondendo a 14,1 milhões de novos casos ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]). Sabe-se que alguns órgãos são mais predispostos a desenvolver neoplasias e na Figura 1, estão destacados os tipos de neoplasias mais frequentes no âmbito mundial; em homens a neoplasia responsável pelo maior número de mortes é a neoplasia pulmonar, seguida por fígado, estômago, colorretal e próstata (Gráfico 1); nas mulheres, a neoplasia mamaria apresenta o maior

índice de mortes, seguida por pulmonar, colorretal e cérvix uterino (Gráfico 2) (“Globocan 2012 - Home”, [s.d.]).

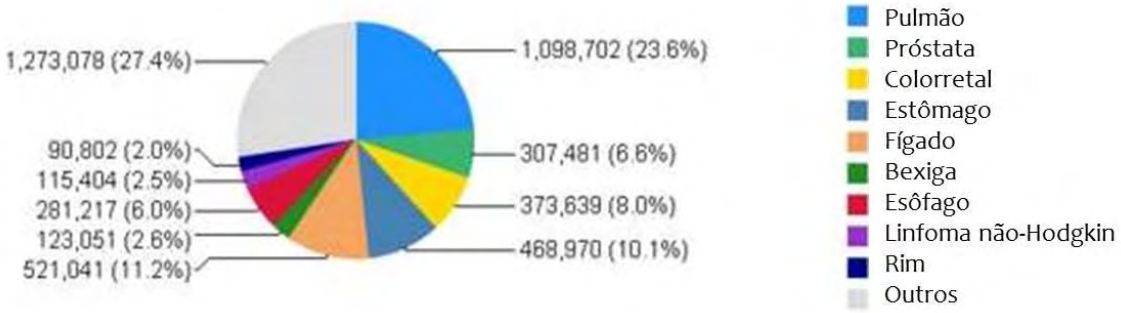
Figura 1 – Incidência e mortalidade de câncer no mundo.



Fonte: Adaptado de - (“Globocan 2012 - Home”, [s.d.]) – International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde.

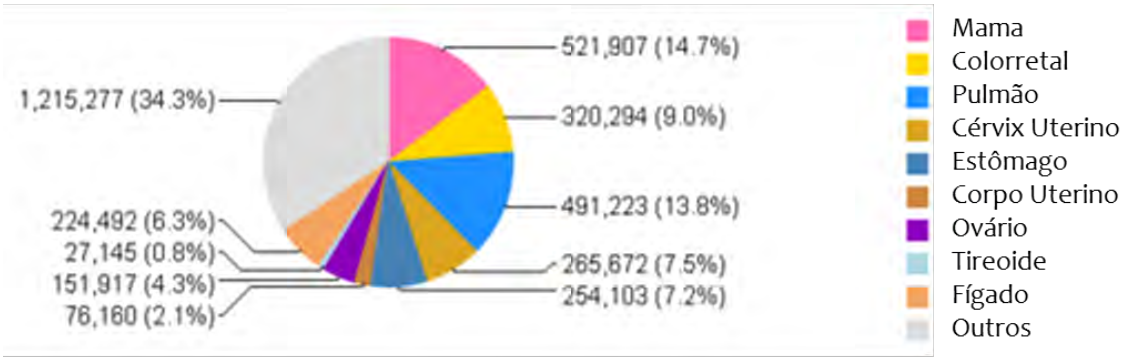
Legenda: *Age-standardised rate (W) - ASR(W) rate per 100.000*, taxa referente ao número de novos casos de câncer por 100.000 pessoas por ano, com até 75 anos.

Gráfico 1 – Índice de mortalidade em homens no âmbito mundial – 2012.



Fonte: Adaptado de - ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]) – International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde.

Gráfico 2 – Índice de mortalidade em mulheres, no âmbito mundial – 2012.



Fonte: Adaptado de - ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]) – International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde.

Nos Estados Unidos, de acordo com as estimativas da *American Cancer Society*, o câncer está em segundo lugar na classificação de doenças com maiores índices de mortes por ano, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, 2015). Os dados mostram que para o ano de 2015 a estimativa era de cerca de 1,7 milhões de novos casos, tendo como maiores índices de incidência e mortalidade, neoplasias mamarias, de próstata, pulmão e colorretal (Figura 2) (SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, 2015)

Figura 2 – Estimativa de incidencia e mortalidade por câncer nos Estados Unidos em 2015.

Estimativa de novos casos

Homens				Mulheres		
Próstata	220.800	26%		Mama	231.840	29%
Pulmão e Brônquios	115.610	14%		Pulmão e Brônquios	105.590	13%
Cólon e Reto	69.090	8%		Cólon e Reto	63.610	8%
Bexiga	56.320	7%		Corpus uterinos	54.870	7%
Melanoma de pele	43.670	5%		Tireoide	47.230	6%
Linfoma Não-Hodgkin	39.850	5%		Linfoma Não-Hodgkin	33.000	4%
Rim e Pelve renal	38.270	4%		Melanoma de pele	31.200	4%
Cavidade oral e Faringe	32.670	4%		Pâncreas	24.120	3%
Leucemia	30.900	4%		Leucemia	23.370	3%
Fígado e Ducto Biliar	25.510	3%		Rim e Pelve renal	23.390	3%
Todos	848.200	100%		Todos	810.170	100%

Estimativa de óbitos

Homens				Mulheres		
Pulmão e Brônquios	86.380	28%		Pulmão e Brônquios	71.660	26%
Próstata	27.540	9%		Mama	40.290	15%
Cólon e Reto	26.100	8%		Cólon e Reto	23.600	9%
Pâncreas	20.710	7%		Pâncreas	19.850	7%
Fígado e Ducto Biliar	17.030	5%		Ovário	14.180	5%
Leucemia	14.210	5%		Leucemia	10.240	4%
Esôfago	12.600	4%		Corpus uterinos	10.170	4%
Bexiga	11.510	4%		Linfoma Não-Hodgkin	8.310	3%
Linfoma Não-Hodgkin	11.480	4%		Rim e Pelve renal	7.520	3%
Rim e Pelve renal	9.070	3%		Cérebro e Sistema Nervoso	6.380	2%
Todos	312.150	100%		Todos	277.280	100%

Fonte: Adaptado de - (SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, 2015)

No Brasil, os índices de incidência e de mortalidade devido ao câncer também são bastante elevados e assim, como no resto do mundo, também se enquadra como uma das doenças com maior índice de mortalidade, representando aproximadamente 16%, sendo a terceira maior causa de morte, ficando atrás apenas de doenças crônicas não transmissíveis e doenças do sistema circulatório (“Ministério da Saúde – Portal da Saúde - www.saude.gov.br - Cidadão”, [s.d.]). De acordo com os dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer em 2014, (dados estes que valem para o biênio de 2014 e 2015), no Brasil ocorreriam aproximadamente 395 mil novos casos, excluindo neoplasias de pele não melanoma e cerca de 580 mil novos casos incluindo todos os tipos de câncer (Gráfico 3 e Figura 3) (INCA, 2014).

Gráfico 3 – Incidência de novos casos câncer no Brasil para 2014/2015, separados por sexo.

Fonte: Adaptado de - (INCA, 2014)

Figura 3 – Estimativa dos dez tipos de câncer que apresentam maior incidência no Brasil para os anos de 2014/2015.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: (INCA, 2014).

2.2 CÂNCER DE PULMÃO

Até o começo do século XX, o câncer de pulmão era considerado raro, devido ao fato de que o seu maior causador, o tabaco, também não era muito comum até então, porém, após a 1ª Guerra Mundial, período este em que ocorreu uma fabricação em massa e a liberação de cigarros aos soldados da guerra, houve um grande aumento em relação à quantidade do uso de tabaco por toda a população mundial (INCA, 2014; JOHN, 2005;

OBID, 2007). Contudo, o aumento do número de casos de câncer de pulmão aconteceu em meados de 1930 e, como comentado anteriormente, ele está entre os tipos de câncer com altas taxas de incidência e mortalidade no mundo (JOHN, 2005; KESHAMOUNI; ARENBERG; KALEMKERIAN, 2009).

Apesar de ser uma neoplasia bastante incidente, pode ser facilmente evitado, devido à grande associação ao fumo (A.C.CAMARGO. 2015), uma vez que cerca de 80 a 90% dos casos de câncer de pulmão são causados pela exposição aos produtos do tabaco, os outros 10 a 20%, estão relacionados à exposição à carcinógenos ambientais e riscos ocupacionais como a poluição do ar, amianto, níquel, arsênico, entre outros, como também o excesso ou deficiência de vitamina A, infecções pulmonares e tuberculoses, são fatores de predisposição ao câncer de pulmão (INCA, 2014; KESHAMOUNI; ARENBERG; KALEMKERIAN, 2009; WARSHAWSKY; LANDOLPH JR., 2005). No Brasil, o tabaco é considerado a segunda droga mais consumida pela população ficando atrás apenas do álcool (OBID, 2007) e, de acordo com os dados do INCA, 2014, o câncer de pulmão está entre os tipos mais ocorrentes no Brasil, com aproximadamente 27 mil novos casos (Figura 4) (INCA, 2014). Esta neoplasia se enquadra como a maior causadora de mortes no âmbito mundial com aproximadamente 1,6 milhões mortes por ano (gGráfico 4) ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]).

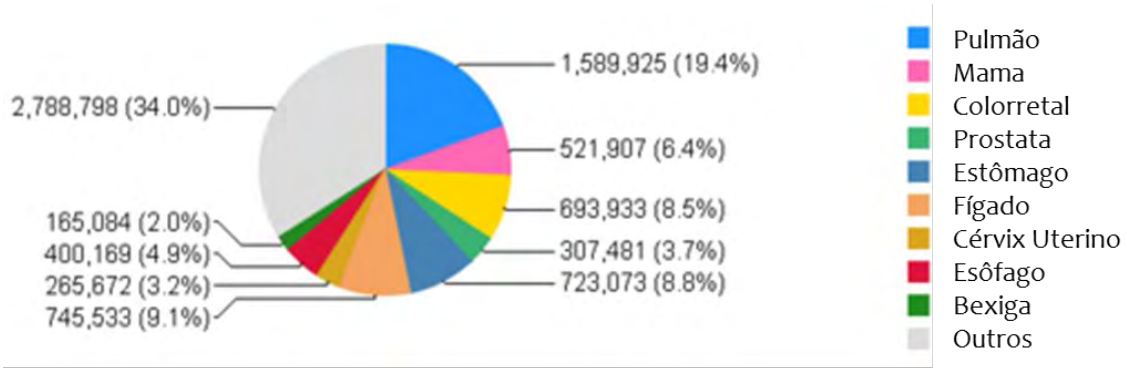
Figura 4 – Estimativa das taxas brutas de incidência de novos casos por 100 mil habitantes, em relação ao sexo e localização primária

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traquéia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Fonte: (INCA, 2014)

Legenda: Valores arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Gráfico 4 – Neoplasias com maiores índices de mortalidade no mundo.



Fonte: Adaptado de - ("Globocan 2012 - Home", [s.d.]) – International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde.

As neoplasias pulmonares surgem geralmente de células epiteliais atípicas e podem ser separadas em dois grupos principais, com relação a sua histologia, podendo ser "câncer de pulmão de células não pequenas" (do inglês – *Non Small Cell Lung Cancer* ou NSCLC) ou "câncer de pulmão de células pequenas" (do inglês – *Small Cell Lung Cancer* ou SCLC), com aproximadamente 80% e 20% de incidência respectivamente (LUNDIN; DRISCOLL, 2013). Os NSCLC englobam adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes, pois apresentam um padrão de crescimento e tratamento parecidos, já os SCLC são formados por células bem pequenas, podendo também ser chamado de carcinoma de células pequenas indiferenciadas, sendo menos comum, porém, o tipo mais agressivo, pois apresentam um crescimento mais rápido, podendo fazer metástase logo no início da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; JOHN, 2005; KESHAMOUNI; ARENBERG; KALEMKERIAN, 2009)

Apesar da existência de inúmeras terapias e do avanço no diagnostico e tratamento, o prognostico de pacientes com câncer de pulmão ainda é ruim e, muitas evidências tem sugerido que este mal prognóstico das neoplasias pulmonares, como de outros tipos de neoplasias, possam estar relacionadas a existência de uma população de células chamadas de células-tronco cancerosas (WU; CHEN; WANG, 2012)

2.3 CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS O NOVO ALVO PARA TERAPIAS

Em 1997, Bonnet e Dick descobriram uma população de células tumorais, que apresentariam características de células-tronco que posteriormente foram caracterizadas e surgiu a hipótese de células-tronco cancerosas (CTCs) que postula a existência de sub-populações de células responsáveis pela resistência a múltiplas drogas e recidiva tumoral após tratamento convencional, como a quimioterapia ou radioterapia (CRIPE et al., 2009). Esta teoria propõe uma organização hierárquica das células de determinado tumor, no qual uma população de células com características de células-tronco seriam responsáveis pela manutenção do crescimento tumoral, demonstrando ser mais resistentes aos tratamentos (VISVADER; LINDEMAN, 2008).

Por definição, as CTCs possuem propriedades semelhantes às células-tronco normais (CTs) como pluripotência, potencial de auto-renovação, capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares e resistência a múltiplas drogas (WU; CHEN; WANG, 2012). Da mesma maneira que as CTs, as CTCs também expressam genes de resistência a múltiplas drogas (MDRs) que conferem proteção contra toxinas, sendo também resistentes aos quimioterápicos. Esta propriedade de CTs e CTCs é relacionada à maior expressão do *ATP-binding cassette, sub-family G, member 2* (ABCG2), sendo considerado uma bomba de efluxo de múltiplas drogas (GOODELL et al., 1996). Outro possível mecanismo de resistência intrínseca das CTCs é a alta expressão de aldeído desidrogenase (ALDH), uma enzima detoxificante responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares, ou seja, medeia a autoproteção destas células e colabora na resistência aos agentes quimioterápicos usados na terapia contra o câncer (KUMAR; KAPOOR, 2014; MA; ALLAN, 2011). Hoje em dia com o avanço das pesquisas, além destes mencionados, já se conhece uma variedade de marcadores específicos para CTCs presentes em diferentes tipos de neoplasias, como por exemplo, para neoplasias mamarias, de próstata e pulmonares, os mais comumente utilizados estão indicados na Tabela 1 (KLONISCH et al., 2008; WU; CHEN; WANG, 2012)

Tabela 1 – Marcadores de células-tronco cancerosas mais utilizados em alguns tumores sólidos.

Marcador	**Características**
CD24	Molécula de adesão de glicosilfosfatidilinositol pesadamente glicolisada, atua como estimulador nas células B e T, é o único ligante para P-selectina. Apesar de não ser um marcador específico para CTCs, baixos níveis deste, pode caracterizar CTCs em tumor de mama.
CD44	Molécula de adesão com múltiplas isoformas que tem papéis pleiotrópicos em sinalização, migração e homing. Pode ser utilizada para a detecção de CTC em neoplasias mamárias, próstata e pulmão.
CD133	Glicoproteina de domínio transmembranar com papel na organização da topologia da membrana plasmática. Podendo ser encontrada em

	células-tronco neuronais, hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais, além de serem utilizadas como marcadores para CTCs de neoplasias mamárias, pulmonares e próstata.
ABCG2	Membro da família ATP, envolvido no transporte de esteroides e outros lipídeos, também conhecido como transportador de múltiplas drogas. Podem ser utilizados para a detecção de CTC em neoplasias mamárias, próstata e pulmonares.
ALDH1	Aldeído desidrogenase (ALDH) pertencente a família de enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos alifáticos e aromáticos de ácidos carboxílicos, tem papel na conversão de retinol em ácido retinóico, importante na proliferação, diferenciação e sobrevivência. Podem ser utilizados para a detecção de CTC em neoplasias mamárias e pulmonares.

Fonte: Adaptado de (KLONISCH et al., 2008; VISVADER; LINDEMAN, 2008; WU; CHEN; WANG, 2012)

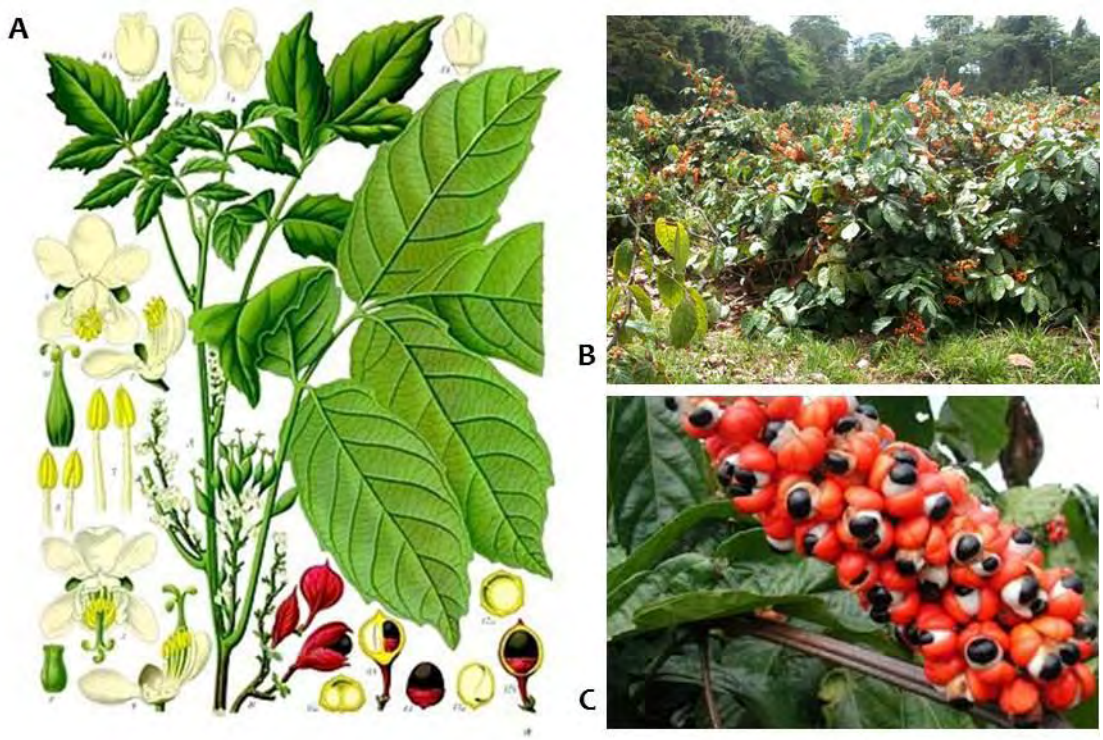
A maioria das terapias antitumorais atuais preferencialmente tem como alvo células que proliferam rapidamente, não apresentando efeito citotóxico em células com baixa taxa de proliferação. Se a hipótese das CTCs for correta, a recorrência/recidiva dos cânceres é gerada por uma porcentagem de células (as CTCs) que proliferam pouco e são mais resistentes a quimioterapia convencional. Desta forma, a busca por novos alvos terapêuticos que tenham como alvo estas CTCs tem enorme implicação no desenvolvimento de novos fármacos ou modalidades terapêuticas contra o câncer.

2.4 GUARANÁ - *Paullinia cupana (P.c)*

A espécie arbórea *Paullinia cupana* Mart Var. *sorbilis*, popularmente conhecida como Guaraná ou naranazeiro, uaraná, guaranaúva e guaranaína, é um arbusto tipicamente brasileiro podendo atingir 10 metros de altura, encontrado na região de Maués da bacia Amazônica ("Ambientebrasil - portal ambiental", [s.d.], "CEPLAC", [s.d.]; CANICEIRO, 2012), pertencente à família *Sapindaceae* é uma espécie trepadeira, cujo nome tem origem

indígena "varana", ou seja, arvore que sobe apoiada em outra ("CEPLAC", [s.d.]). Suas flores são dispostas em formas de cachos, gerando muitos frutos, encapsulados, de cor vermelho-alaranjado, envoltos por arilos brancos, com sementes grandes e de cor castanho-escuro (Figura 5) (HENMAN, 1982; SANTOS; TORRES; LEONART, 1987). Quanto a sua composição química, nas sementes do guaraná encontram-se vários compostos como as metilxantinas, tendo a cafeína, a teobromina e a teofilina, os polifenóis do tipo flavonoides como a catequina, epicatequina e procianidinas, como também as saponinas (HENMAN, 1982).

Figura 5 – *Paullinia cupana* (folhas, flores e frutos)



Fonte: ("Caiabí - Empresa Agroindustrial Ltda - Produtos da Amazonia Legal", [s.d.])

Legenda: A – Excicata de Guaraná - *Paullinia cupana*, mostrando suas folhas, flores e frutos; B – Guaranazeiro – arbustos de guaraná; C – fruto do guaraná.

O guaraná é bastante conhecido por apresentar efeitos estimulantes, sendo utilizado para este fim desde antes de 1670, pelos índios Saterê-Maue (HENMAN, 1982;

"PIB - Povos Indígenas do Brasil", [s.d.]). Além do efeito estimulante, associados à presença da cafeína, que é um de seus compostos mais relevantes, contendo entre 2,5 a quase 6% do peso do extrato seco (DE OLIVEIRA CAMPOS et al., 2011; HENMAN, 1982), o guaraná também é utilizado como tônico para o sistema digestivo e tratamento de doenças cardiovasculares (CANICEIRO, 2012; HENMAN, 1982). Hoje em dia, já são comprovados cientificamente muitos outros efeitos como, atividade antioxidante devido à presença de taninos em sua composição (ESPINOLA et al., 1997), atividade antimicrobiana (MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007), além de apresentar vários efeitos para melhoria de vida em pacientes com câncer, como na melhora da fadiga em pacientes com câncer de mama (DE OLIVEIRA CAMPOS et al., 2011) melhora de fogachos em pacientes com câncer de mama (OLIVEIRA et al., 2013), como também apresenta ação quimiopreventiva e antiproliferativa (FUKUMASU et al., 2006, 2008).

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é que o Guaraná (*Paullinia cupana*) apresente efeito antitumoral sobre células tumorais de pulmão de camundongo, apresentando efeito principalmente sobre populações de células-tronco cancerosas.

4 OBJETIVOS

- Avaliar a presença de Células-Tronco Cancerosas – CTCs a partir de modelo murino *in vitro* de neoplasia pulmonar.
- Avaliar o potencial antitumoral do extrato etanólico do guaraná, assim como das frações butanólica e aquosa em cultivo de células neoplásicas de pulmão de camundongo (E9), com especial atenção aos efeitos sobre as CTCs.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

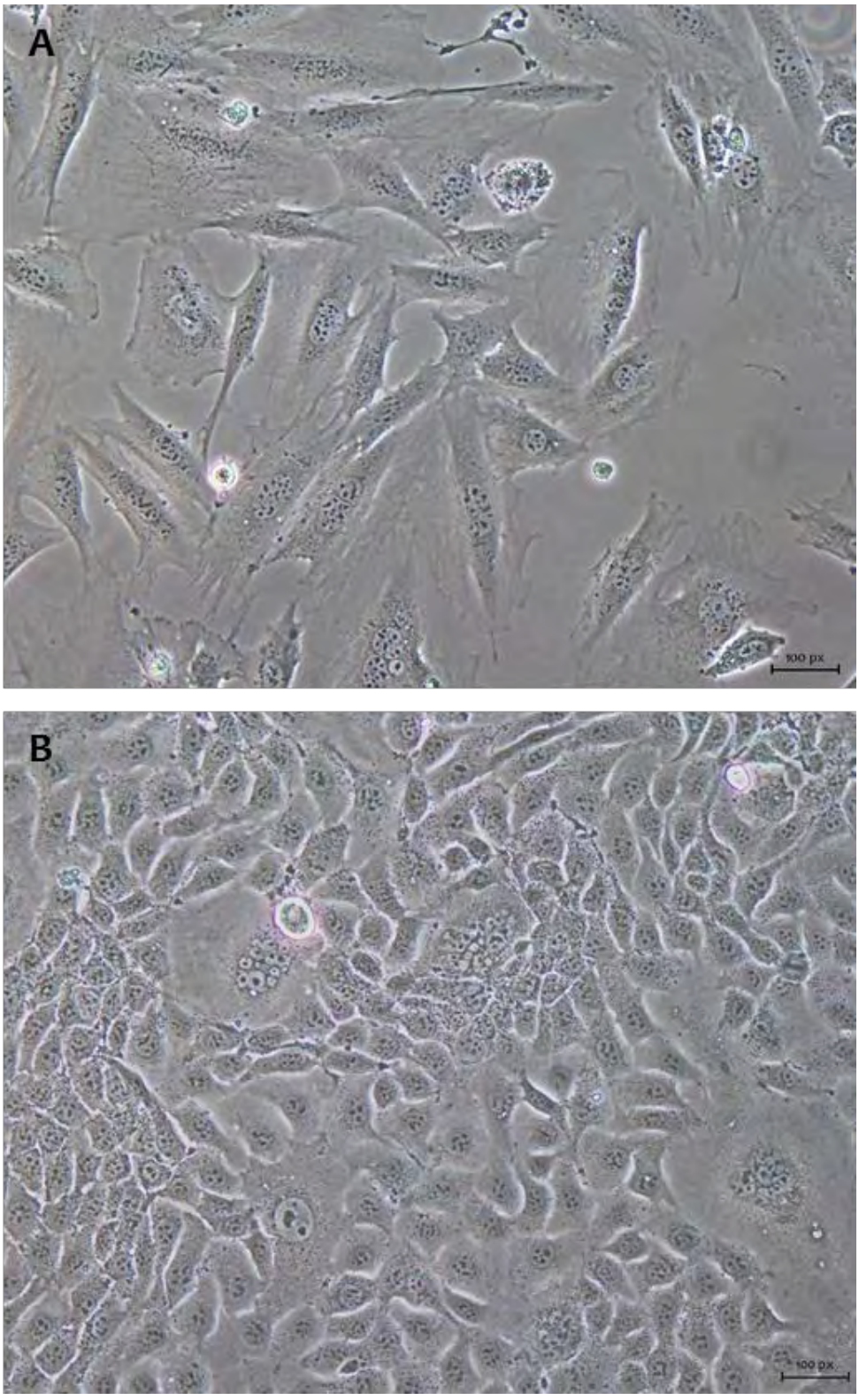
5.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional – LOCT, em parceria com o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento – LMMD e com o Laboratório de Medicina Preventiva e Aplicada – LMPA, pertencentes ao Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo, *Campus* de Pirassununga – SP, como também, parte dele foi realizado no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP), Núcleo Fluir, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo – SP e no Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

5.2 LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS

Foram utilizadas para todos os experimentos duas linhagens de células epiteliais de pulmão de camundongo, que foram gentilmente doadas pela Dra. Lucy M. Anderson aos cuidados de sua técnica Janet Fields do Laboratório de Carcinogenese Comparada, do Instituto Nacional do Câncer (Fredericks - EUA). Sendo uma linhagem não tumoral – E10 (variante não transformada) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A), utilizada omo controle dos experimentos e uma linhagem tumoral – E9 (variante transformada) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B) que foram cultivadas seguindo a etodologia descrita abaixo neste tema.

Figura 6 - Células de pulmão de camundongo.



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: A – Célula não tumoral de pulmão de camundongo (E10); B – Célula tumoral de pulmão de camundongo (E9) (0,15µm/px – objetiva 20x).

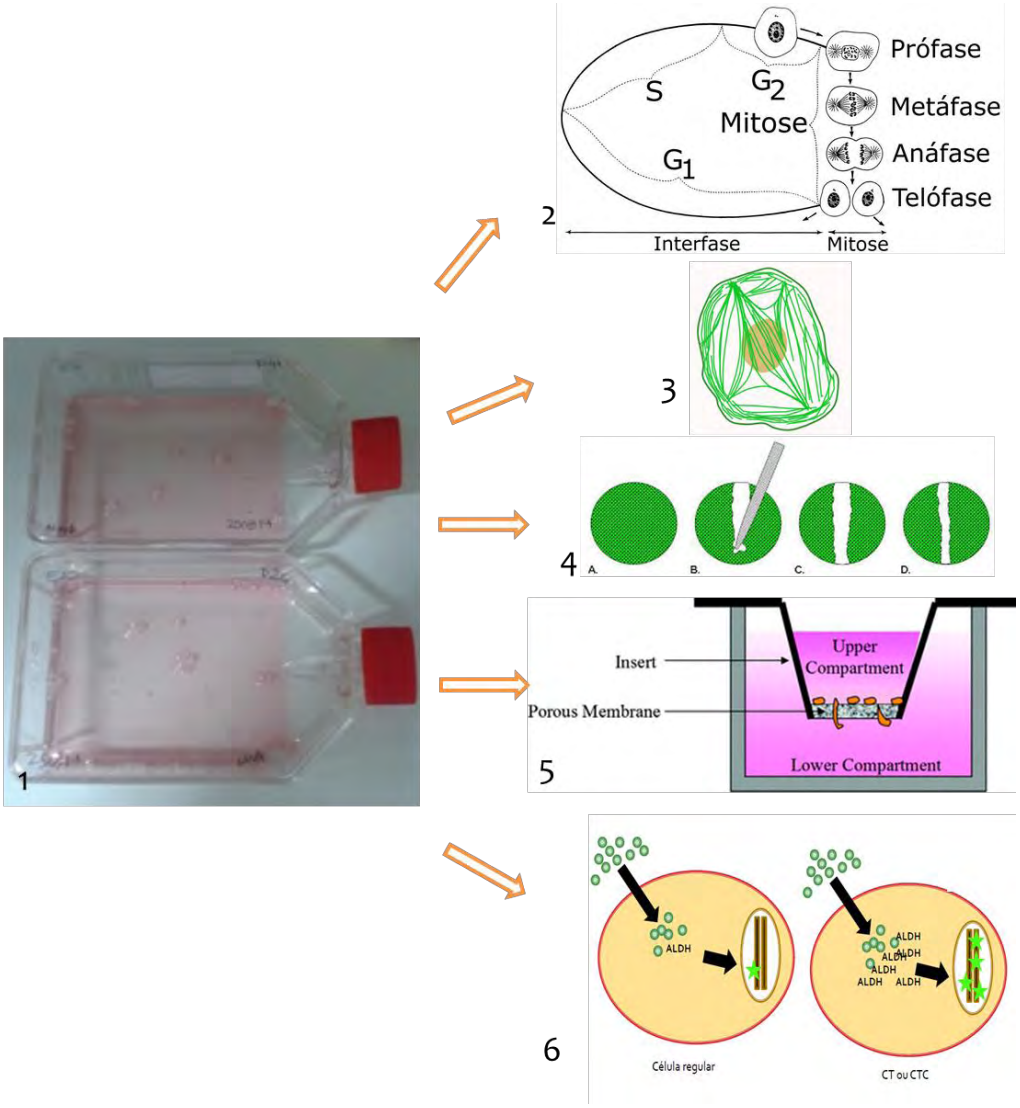
Estas linhagens de células E 10 e E9 inicialmente foram chamadas de NAL-1A, que foram explantadas de pulmão de camundongos BALB-c e cultivadas. As células E10 (variante não transformada) são clones das NAL-1A, já as células E9, são células (*siblings pairs*) que foram transformadas espontaneamente. Esta transformação espontânea ocorreu após cultivarem as células originais NAL-1A, com dexametasona, (medicamento pertencente à classe dos corticosteroides que apresenta ação anti-inflamatória e imunossupressora) com isso, o crescimento da maioria das células foi inibido, restando apenas algumas células mais resistentes que sobreviveram e estas, foram cultivados e caracterizados como células tumorais (variante transformada) (MALKINSON et al., 1997).

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em dois experimentos sendo eles independentes.

Para o primeiro experimento – "Avaliação *in vitro* da presença de células-tronco cancerosas a partir de modelo murino de células de pulmão", foi realizado a padronização do cultivo celular a partir da utilização das duas linhagens de células de pulmão de camundongo, linhagem não tumoral E10 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A) e linhagem tumoral E9 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B). Para cada teste foram utilizadas diferentes quantidades de células, devido aos diferentes tamanhos de placas de cultivo utilizadas para os diferentes testes, como o teste de tempo de duplicação (*Doubling Time*); análise morfológica, utilizando marcação por Faloidina; migração, utilizando o método de *Scratch wound*; Invasão utilizando a método de *Transwell* e Citometria de Fluxo, para análise da atividade enzimática de ALDH (Figura 7) e as análises estatísticas foram realizadas através do software *GraphPad Prism* 5.0 (*GraphPad,* EUA).

Figura 7 - Esquema ilustrativo - Experimento 1.



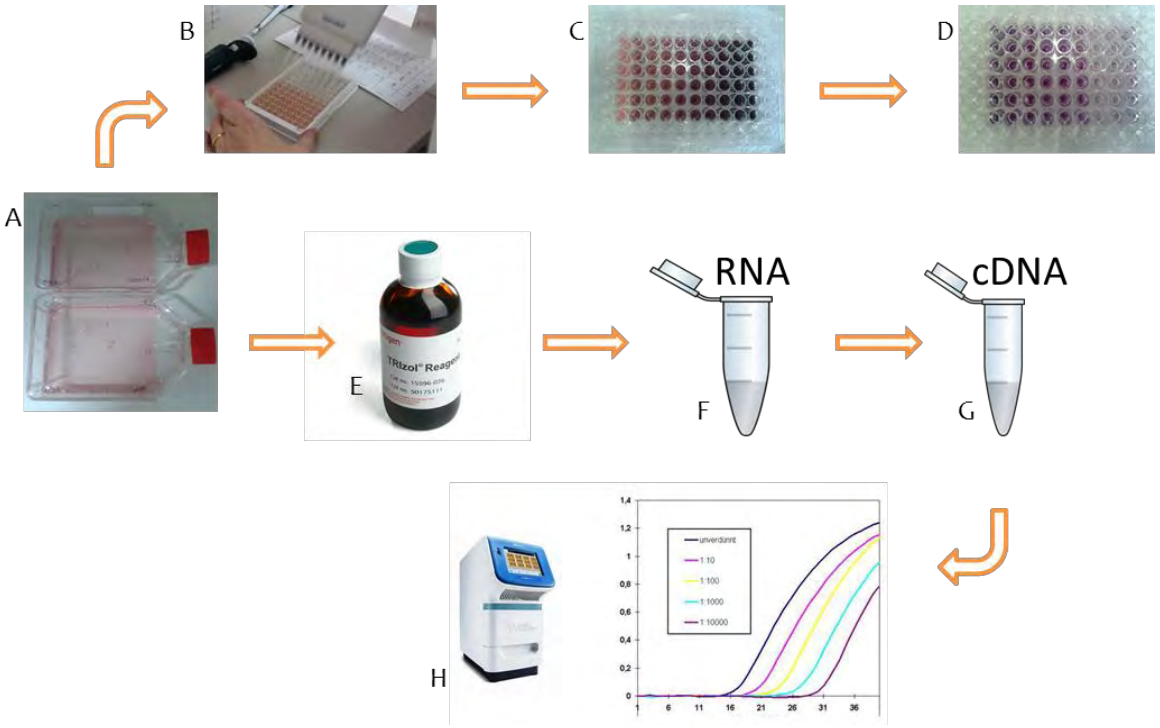
Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: 1 – Células E10 e E9 em cultivo, utilizadas para todos os experimentos, sendo: 2 – Teste de tempo de duplicação do ciclo celular; 3 – Análise morfológica; 4 – Teste de migração; 5 – Teste de invasão.

Para o segundo experimento – "Avaliação do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações: butanólica (BUF) e aquosa (FAQ) de guaraná, sobre a população de CTCs em células tumorais – E9", primeiramente foi preparado o extrato bruto (EEB) e as frações butanólica (BUF) e aquosa (FAQ) do guaraná. Após ter o extrato e as frações, foi analisada a citotoxicidade destes sobre as duas linhagens E10 e E9, utilizando o teste colorimétrico de MTT, para encontrar a dose de inibição de 50% da viabilidade celular

(Figura **8** - Esquema ilustrativo – Experimento 2Figura **8**8 – B, C e D), para posterior análise da expressão gênica de 18s, ABCG2, ALDH1a1 e CK18, utilizando RT-PCR (Figura **8**8 – E, F, G e H) e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0 (*GraphPad,* EUA).

Figura 8 - Esquema ilustrativo – Experimento 2



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2014

Legenda: A – Células em cultivo utilizadas para os dois experimentos (B, C e D – Teste colorimétrico) e (E, F, G e H – Extração de RNA e RT-PCR); B – plaqueamento das células para teste colorimétrico – MTT em placas de 96 poços; C – placa após 48 horas de tratamento com o guaraná + MTT; D – cristais de formazan sendo solubilizados para finalização do teste de MTT e leitura da absorbância; E e F – Extração de RNA utilizando o reagente Trizol; G e H – preparação da cDNA, para realização da RT-PCR.

5.4 **EXPERIMENTO 1 –** AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRESENÇA DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS A PARTIR DE MODELO MURINO DE CÉLULAS DE PULMÃO.

5.4.1 Cultivo celular

As células (E10 e E9) foram mantidas em nitrogênio líquido até sua utilização. O processo de descongelamento foi feito mantendo o criotubo a 37°C até o descongelamento parcial do conteúdo, sendo então rapidamente homogeneizado com dez volumes de meio de cultivo CMRL1066 (GIBCO – *Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de Glutamina (Glutamax – GIBCO – *Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*) e 1% de Antibiótico (10.000 U/mL *Penicillin* e 10.000 µg/ml *Streptomycin – Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*). Estas foram centrifugadas a 250g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi re-suspendido em meio de cultivo, idem ao mencionado acima, então foram colocadas em garrafas de cultivo e mantidas em estufa à 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO_2. Ao atingirem 80% de confluência eram tripsinizadas da garrafa com solução de tripsina 0,05% (*Trypsin-EDTA* (0.5%), *no phenol red – Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*) a 37°C por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, as células eram lavadas em dez volumes de meio de cultivo e contadas. Para a contagem das células, 10 µl da suspensão celular eram diluídos em 10 µl de solução de Azul de Tripan 0,025% (*Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*) e colocados em câmara de Neubauer para contagem e verificação da viabilidade celular em aumento de 100x em microscópio óptico comum.

5.4.2 Tempo de duplicação celular

Cerca de $3x10^4$ células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em estufa umidificada a 37°C a 5%CO_2. A cada 24 horas as células eram tripsinizadas e

contadas em câmara de Neubauer, utilizando azul de tripan. Este procedimento foi realizado sempre no mesmo horário, durante seis dias, analisados nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e o cálculo do tempo de duplicação foi realizado utilizando o software online "*Doubling Time Online Calculator*" (Disponível em 16/11/2015: http://www.doubling-time.com/compute.php).

5.4.3 Análise morfológica celular através de marcação com faloidina

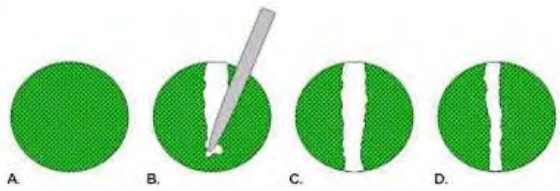
Cerca de 2x10³ células foram cultivadas em placa de 96 poços e foram mantidas em estufa umidificada a 37°C a 5%CO_2. Após 24h o meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados 2x com tampão fosfato 1x pH7,4 (PBS1x), logo em seguida as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA4%) por 30 minutos, foram novamente lavadas com PBS1x, depois foi adicionado faloidina [1:100] (*Phalloidin Atto 565 – Sigma Aldrich*) e mantido por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, após este passo, os poços, foram novamente lavados com PBS1x, em seguida foi adicionado *DAPI* (*4',6-diamidino-2-phenylindole - ThermoScientific – Carlsbad, CA*, EUA) [2µg/mL] por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente, depois foram novamente lavadas com PBS1x e para finalizar e manter por mais tempo a fluorescência, foi adicionado uma solução de 2 gotas de *ProLong* (*ProLong Antifade Reagent for Fixed Cells - (ThermoScientific – Carlsbad, CA*, EUA)) por mL em PBS1x e mantido no escuro a 4°C até serem analisadas em microscópio invertido (*ZEISS - Axio Vert A1*) e fotografado com a câmera acoplada (*Axio Can 503*).

5.4.4 Teste de migração – *Scratch wound*

Foram plaqueadas para este teste, 1x10^5 células em placas de 6 poços e mantidas em estufa umidificada a 37°C a 5%CO_2. Após atingir 100% de confluência, o meio foi retirado e adicionado um meio isento de soro fetal bovino, em seguida foram novamente mantidas em estufa umidificada a 37°C a 5%CO_2, por mais 24 horas, depois, com o auxilio

de uma ponteira de 100µL estéril, foi feito um risco "*Scratch Wound*" no centro do poço (figura 9), o meio com o excesso de células soltas foi retirado, um meio novo isento de soro fetal bovino foi adicionado, as células foram analisadas em períodos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando um microscópio invertido (*Nikon Eclipse TS100* – Japão) e fotografadas com uma câmera digital acoplada (*Nikon DS-Ri1* – Japão).

Figura 9 – Esquema ilustrativo do método utilizado para a técnica de *Scratch Wound*



Fonte: (HULKOWER; HERBER, 2011)

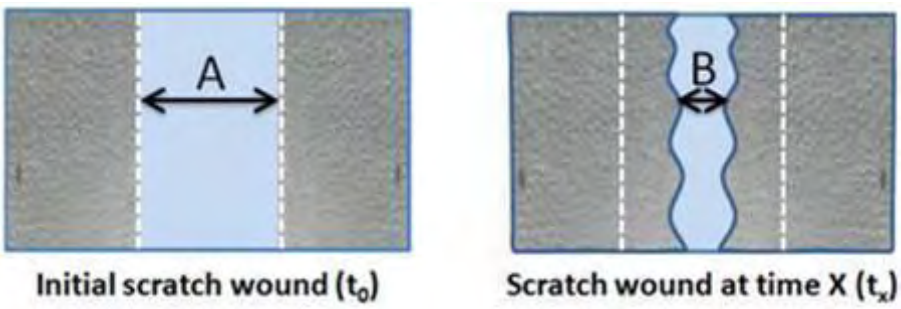
Legenda: (A) poço com 100% de confluência das células; (B) modelo de como fazer o risco com uma ponteira estéril; (C) *Scratch wound* pronto; (D) Células migrando e diminuindo o espaço do *Scratch wound*

Para calcular o tempo de migração e fechamento completo do *Scratch*, foi utilizado o método descrito por "BUACHAN e colaboradores, 2014" (fórmula 1) onde se calcula a porcentagem de confluência entre as horas analisadas,

$$(\%\ Confluência\ do\ Scratch = (A + B) \times 100\% \div A) \qquad (1)$$

como mostra a Figura **10**10. Para realizar os cálculos, as medidas dos *Scratch*, foram feitas com o software *ImageJ*.

Figura 10 – Modelo utilizado para calcular o tempo de fechamento do *Scratch*



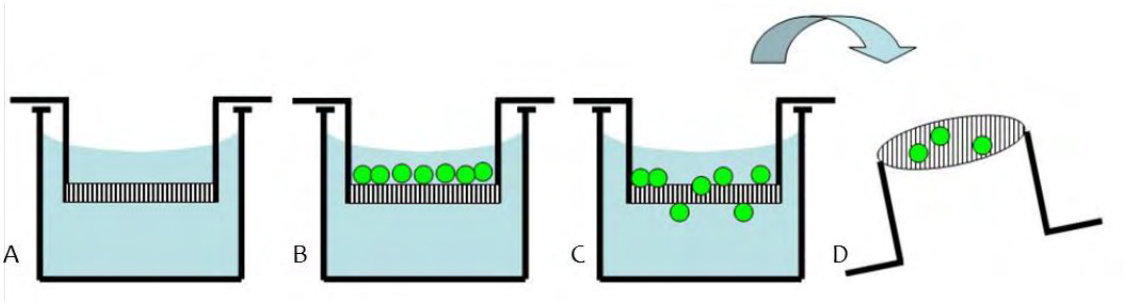
Fonte: (BUACHAN; CHULAROJMONTRI; WATTANAPITAYAKUL, 2014)

Legenda: Método utilizado para calcular a porcentagem de confluência para fechamento do *Scratch Wound*, podendo estimar o tempo de migração das células.

5.4.5 Teste de invasão – *Transwell*

As células E10 e E9 foram cultivadas como citado anteriormente, porém, 24 horas antes de plaqueá-las na placa de *Transwell* (*Corning® Costar® Transwell® - Sigma Aldrich*), o meio completo foi retirado e um novo, livre de soro fetal bovino foi adicionado. Para este experimento, todo o material que foi utilizado como, a *ECM Gel* (*Sigma Aldrisch,* E1270), placa *transwell* com os insertos, foram mantidos na geladeira 12 horas antes do seu uso. A *ECM Gel* foi diluída [1:10] em PBS1x, 100µl foram adicionados aos insertos (figura 11 A) e a placa foi levada a incubadora de CO_2 por 4 horas para polimerização do gel. Após este período, as células foram tripsinizadas, 100 µl de meio sem soro fetal bovino contendo $3x10^4$ células, foram adicionadas no inserto sobre a *ECM gel* (figura 11 B), 600µl de meio contendo 10% SFB foi adicionado no compartimento abaixo do inserto e a placa foi mantida na incubadora de CO_2 por 24 horas. Após 24h, com o auxílio de uma pinça, os insertos foram retirados dos poços, lavados com PBS1x, o excesso de *ECM gel* foi retirado com o auxílio de um swab, deixando apenas as células que invadiram para a parte de baixo do inserto (figura 11 C e D). Estas células foram fixadas por 10 minutos em Glutaraldeído (*Synth* – Brasil) 5% diluído em PBS1x, depois foram lavadas em PBS1x, coradas por 2 minutos em Cristal Violeta (*Synth* - Brasil) 1% diluída em etanol 2%. Feito isso, os insertos foram lavados novamente em PBS1x para retirar o excesso do corante, então foram analisados utilizando um microscópio invertido (*Nikon Eclipse TS100* – Japão) e fotografados com a câmera digital acoplada (*Nikon DS-Ri1* – Japão). As fotografias foram tiradas nos pontos em que continham células seguindo o esquema da mostrado na figura 12, todas as células foram contadas utilizando o software *ImageJ*.

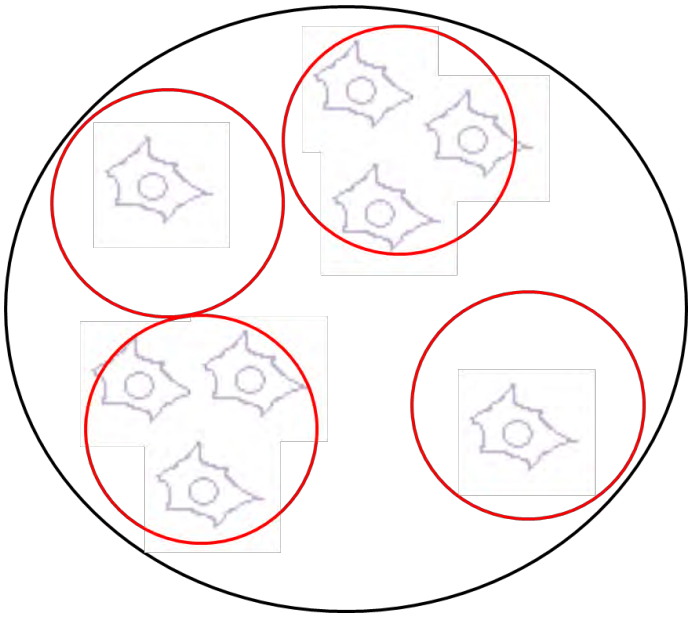
Figura 11 – Esquema ilustrativo do método utilizado para o teste *Transwell*



Fonte: (HULKOWER; HERBER, 2011)

Legenda: (A) Poço da placa de *Transwell* com inserto e ECM gel; (B) células inseridas no inserto; (C) células invadindo a ECM gel e o inserto; (D) inserto apenas com as células que invadiram.

Figura 12 – Esquema ilustrativo utilizado para contagem das células.



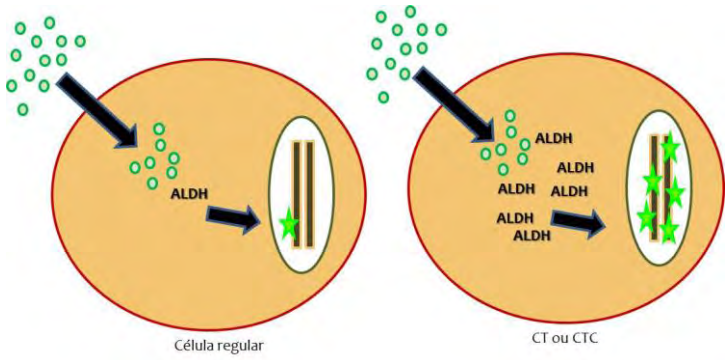
Fonte: ROCHETTI. A. L, 2015

Legenda: Esquema indicando o método utilizado para capturar as imagens onde continham as células, para posterior contagem das células que invadiram os insertos.

5.4.6 Análise da atividade enzimática de ALDH em CTCs através de citometria de fluxo

Para analisar através de citometria de fluxo a atividade da enzima Aldeído Desidrogenase presente nas células-tronco cancerosas (figura 13), utilizamos o reagente *ALDEFLUOR* (*ALDEFLUOR™ Kit, Stem Cell Technologies*, EUA).

Figura 13 – Esquema ilustrativo da comparação da atividade enzimática de ALDH entre uma célula regular e CT ou CTC



Fonte: LOCT, 2010

Legenda: Atividade da enzima aldeído desidrogenase presente nas diferentes células, indicando a baixa atividade da enzima em células normais e alta atividade em células-tronco e células-tronco cancerosas.

Para isso, as células foram cultivadas conforme descrito acima e foi seguido o protocolo do fabricante, onde para cada amostra foi feito um tubo "controle" e um tubo "teste". Para cada tubo "teste", foi colocado $1x10^6$ células por mL em tampão *Aldefluor assay buffer* (*kit ALDEFLUOR*), acrescentado 5µL/mL do reagente "Substrato Ativado *ALDEFLUOR*" (*kit ALDEFLUOR*). Logo em seguida, 500µL desta solução, foi transferido ao seu respectivo tubo "controle", onde continha 5µL/mL de DEAB "inibidor do substrato ativado *Aldefluor*" (*kit ALDEFLUOR*) e estes tubos foram imediatamente mantidos em banho–Maria a 37°C por 45 minutos, sendo homogeneizados a cada 5 minutos. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 250g, a 4°C, por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi re-suspendido em tampão *Aldefluor assay buffer*

(*kit ALDEFLUOR*), foram mantidos no gelo até realizar a análise por citometria de fluxo e 5 minutos antes de realizar a análise, foi adicionado *Hoechst 33342* [10µg/mL]. Então estas células foram separadas em duas populações, alta ($ALDH_{Higt}$) e baixa ($ALDH_{Low}$) atividade enzimática, utilizando o sistema de *Gates* para seleção das populações desejadas, onde primeiramente as células analisadas, cerca de 10.000 eventos, são separadas de acordo com sua granulosidade (*Side Scatter* – SSC) e seu tamanho (*Foward Scatter* – FSC) (SSC-A x FCS-A), depois foi feito a exclusão de células mortas através do corante *Hoescht 33342* (SSC-A x Hoechst-A), exclusão de *doublets* utilizando os parâmetros (FSC-H x FSC-A) e por último foram selecionadas as células positivas para ALDH utilizando os parâmetros (SSC-A x FITC-A). Depois de separadas, estas células foram centrifugadas a 250g, 5 minutos a 4°C, re-suspendidas em meio de cultivo com 5% SFB ou, o pellet era rapidamente congelado em N_2L, para posterior extração de RNA total e análise de expressão gênica.

5.4.7 Análise estatística

Para análise estatística dos experimentos de migração, invasão e citometria de fluxo), foi utilizado o Teste T de *Student* através do software *GraphPad Prism* 5.0 (*GraphPad,* EUA). Foi considerado $p<0,05$ para análise de significância.

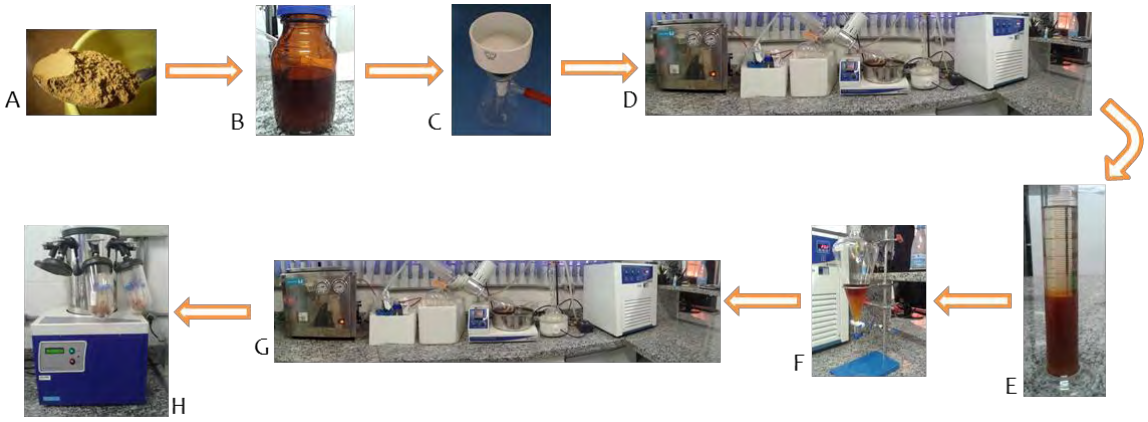
5.5 **EXPERIMENTO 2** – AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E SUAS FRAÇÕES: BUTANÓLICA (BUF) E AQUOSA (FAQ) DE GUARANÁ, SOBRE A POPULAÇÃO DE CTCs EM CÉLULAS TUMORAIS – E9.

5.5.1 Preparo do extrato etanólico bruto e suas frações butanólica e aquosa

O Guaraná, *Paullinia cupana* (*P.c.*), moído, foi gentilmente doado pelo Pesquisador André Luiz Atroch da EMBRAPA Amazônia Ocidental (Manaus – AM). Para preparar o

extrato e suas frações, 10g de Guaraná, foram diluídos em 500mL de Álcool Etílico 70% (*Synth* – Brasil) e mantido por 48 horas em temperatura ambiente. Após 48h de incubação, foi passado por um sistema de filtração a vácuo e posteriormente o etanol removido por destilação sob pressão reduzida (TE-211, *Rotary Evaporador* – *Tecnal*, Brasil), onde foi possível recuperar 110mL do extrato etanólico bruto (EEB). Uma parte deste extrato (20mL) foi congelada para posterior liofilização, a outra (90mL) foi diluída na proporção 1:1 em butanol e mantida por 48 horas a 4° C. As frações butanólica (BUF) e aquosa (FAQ) foram separadas com o auxílio de um funil de separação, depois passaram pelo processo de destilação sob pressão reduzida e posteriormente foram liofilizados (L-202, *Lyophilizer* – Liotop, Brasil) (figura 14).

Figura 14 - Esquema ilustrativo para preparação do EEB, BUF e FAQ do guaraná.



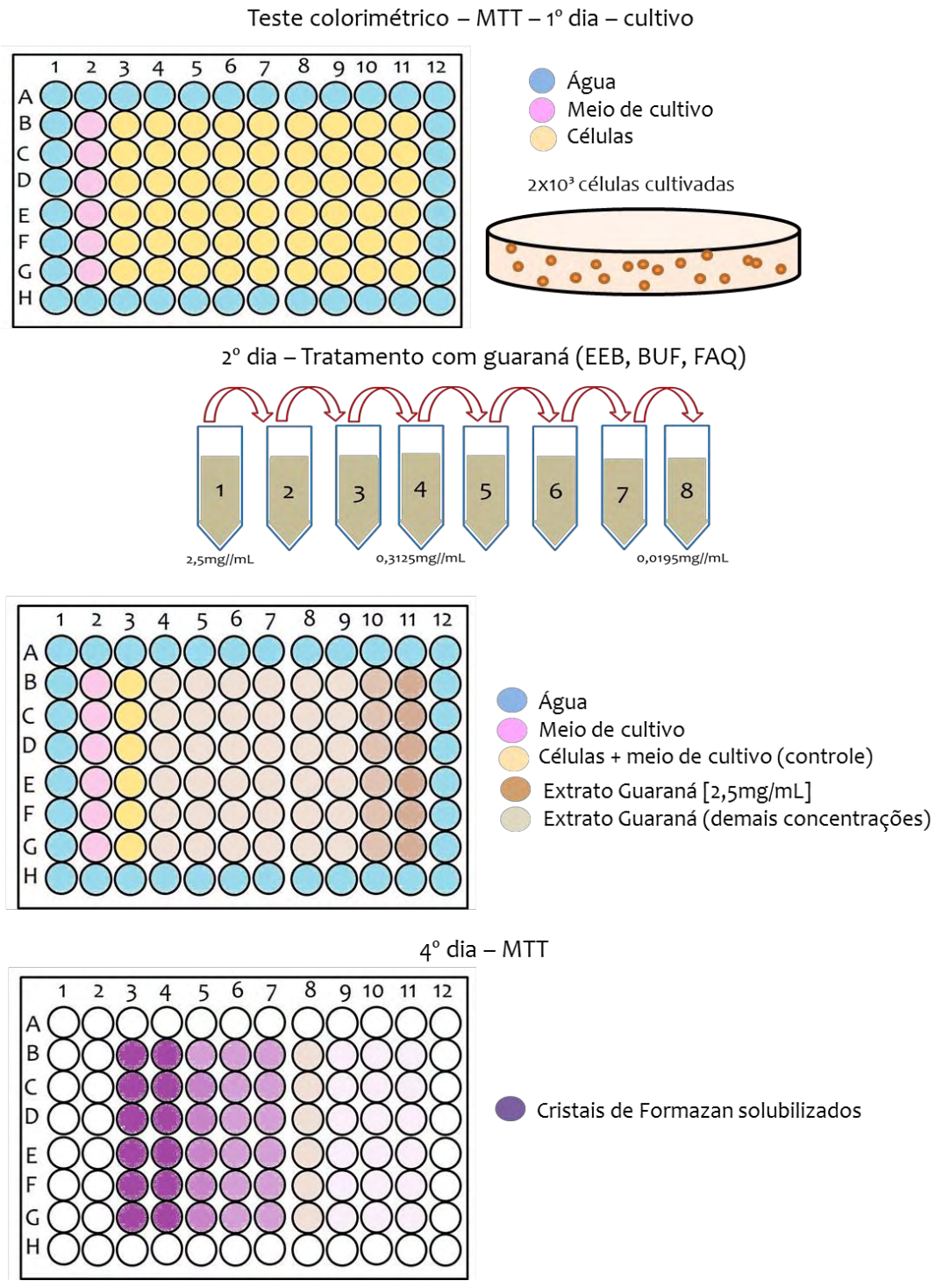
Fonte: ROCHETTI, A. L. 2014

Legenda: A – guaraná em pó para ser pesado; B – guaraná diluído em álcool etílico 70%; C – sistema utilizado para filtração a vácuo; D e G – rotoevaporador; E e F – diluição e separação das frações butanólica e aquosa; H – Liofilizador.

5.5.2 Teste de citotoxicidade e ensaio colorimétrico por MTT

Para determinar a citotoxicidade do extrato etanólico bruto (EEB) e de suas frações Butanólica (BUF) e Aquosa (FAQ), foram realizados para cada tratamento e para cada célula, teste em triplicata, sendo testes independentes, onde 100µL contendo $2x10^3$ células, foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em uma incubadora com temperatura controlada e atmosfera umidificada (37°C e 5%CO_2). Após 24 horas de incubação, todo o meio foi retirado e oito diferentes concentrações (da menor para a maior concentração) dos extratos foram adicionadas e os extratos foram diluídos de forma seriada [1:1], tendo as concentrações entre [2,5mg/mL – 0,0195mg/mL] (figura 15) e as células foram incubadas por 48 horas.

Figura 15 – Esquema ilustrativo Teste de citotoxicidade do guaraná por MTT.



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Após 48 horas, a viabilidade das células foi analisada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, (*Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide – Sigma Aldrich*). O MTT foi

diluído em meio de cultivo DMEM (*GIBCO – Invitrogen – Carlsbad, CA, USA*) em uma concentração de 5mg/mL. Depois de diluído, 10µL foi adicionado por poço e as células foram novamente incubadas por 2 horas. Depois de 2 horas, o meio de cultivo foi retirado por inversão até que os poços estivessem totalmente secos, então foi adicionado 100µL da solução (Álcool Isopropílico + 0,04N HCl) (*Synth* – Brasil), para dissolver os cristais de formazan, que foram formados através da metabolização do sal MTT pelas mitocôndrias das células ativas (figura 15). Os resultados foram analisados utilizando o equipamento FLUOstar OPTIMA e os cálculos para encontrar a concentração de inibição de 50% da viabilidade celular (IC50) foram feitos através do *GraphPad Prism* 5.0 (*GraphPad*, EUA).

5.5.3 Extração de RNA e PCR em tempo real (RT-PCR)

Para analisar a expressão gênica, foram utilizadas as células E9, antes e pós-tratadas com a IC50 de *P.c.* BUF. Para isso, foram plaqueadas 10^5 células em garrafas para cultivo T25, em duplicata (sendo 2 controles e 2 para IC50 de *P.c.* BUF), incubadas por 24h, depois disso, o meio foi descartado e um novo meio foi adicionado, contendo a concentração de IC50 do BUF e foram incubadas por mais 48h. Após 48h, o meio foi retirado e aliquotado em um tubo falcon de 15mL, as células foram tripsinizadas, recuperadas com o mesmo meio, centrifugadas a 250g por 5min, o meio foi descartado e o pellet de células foi lavado com PBS1x, centrifugado novamente e o pellet foi congelado a -20°C até a extração de RNA.

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente *Trizol* (*TRI Reagent – Sigma Aldrich*), seguindo protocolo do fabricante. Após a extração, todas as amostras foram quantificadas utilizando o *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*ThermoScientific – Carlsbad, CA*, EUA) e mantidas em freezer -80°C até a realização da RT-PCR.

Porém, antes de fazer a RT-PCR, as amostras foram tratadas com DNAse (Ambion – *Life Technologies – Carlsbad, CA*, EUA), em seguida foi feito a cDNA utilizando o kit para Transcrição Reversa *High Capacity* (*Life Technologies – Carlsbad, CA*, EUA), seguindo protocolo do fabricante e depois foi realizada a RT-PCR com o equipamento *StepOne™*

Real Time PCR (*Applied Biosystems – Carlsbad, CA*, EUA) utilizando os *primers* 18s, ABCG2; ALDH1A1; e CK18 (Tabela 2).

Tabela 2 - *Primers* utilizados na realização das RT-PCRs.

18s FW	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
18s RV	CTGTCAATCCTGTCCGTGTC
ABCG2 FW	TGGACTCAAGCACAGCGAAT
ALDH1A1 FW	CCATCACTGTGTCATCTGCTC
ALDH1A1 RV	GGCTGACAACATCATATAGCAGTTA
ABCG2 RV	CGGAAGCCAGTAAGGTGAGG
CK18 FW	GGGGCCACTACTTCAAGATCA
CK18 RV	GGCGCATGGCTAGTTCTGTC

Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Desenho dos *primers* indicados no sentido 5' – 3'.

5.5.4 Análise estatística

Para analisar a citotoxicidade de *Paullinia cupana* e calcular a concentração de inibição de 50% da viabilidade celular, foi utilizado o método de regressão não linear e para analisar a expressão gênica através de RT-PCRs, primeiramente foi avaliado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste F. Os que apresentavam distribuição normal foram analisados com teste paramétrico *T de Student* e os que não apresentavam distribuição normal, foram analisados com o teste de *Mann-Whitney*. Todas as análise foram feitas através do software GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, CA, USA). Foi considerado $p<0,05$ para análise de significância.

6 RESULTADOS

5.1 **EXPERIMENTO 1** – AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PRESENÇA DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS (CTCS) A PARTIR DE MODELO MURINO DE CÉLULAS DE PULMÃO

5.1.1 Tempo de duplicação celular

Através deste teste, obteve-se o tempo de duplicação das duas linhagens analisadas. Onde foi observado que este tempo é bem próximo, levando menos de 24 horas para completar um ciclo. Como mostra a tabela abaixo, após calcular a quantidade de células presentes nos poços durante um período de 120 horas, sendo a contagem das células feita sempre no mesmo horário, a cada 24 horas, as células não tumorais E10, levaram aproximadamente 23 horas para completar um ciclo, já as células tumorais E9 em completam um ciclo em apenas 19 horas. Sendo assim, como os experimentos seguintes foram realizados em no máximo 48 horas, o tempo de duplicação não implicaria nos resultados, pois em 48 horas, tanto as células não tumorais quanto as tumorais, teriam dado apenas dois ciclos completos.

Tabela 3 – Tempo de duplicação das linhagens E10 e E9.

Células/Horas	0h	24h	48h	72h	96h	120h	Tempo de Duplicação
E10 x 10^4	3	2,1	7,1	22,75	44	80	**23,19h**
E9 x 10^4	3	6	21,3	79,25	216	392	**19,08h**

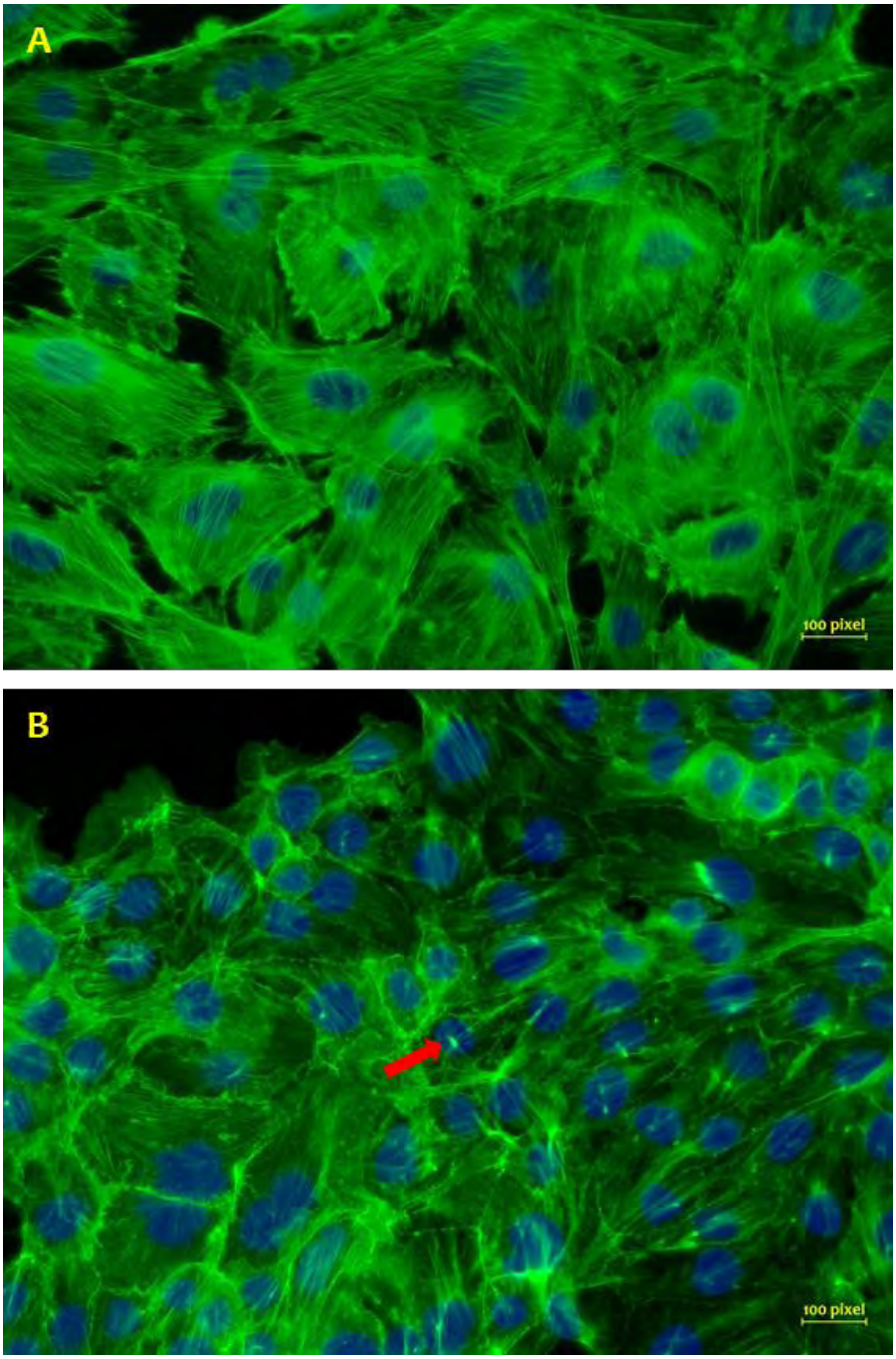
Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Contagem das células realizada sempre no mesmo horário, a cada 24 horas, por um período de 120 horas.

5.1.2 Análise morfológica das células

Ao analisar morfologicamente o citoesqueleto das células, através da marcação dos filamentos de actina utilizando Faloidina – em verde e o núcleo marcado com DAPI – em azul (figura 16 A e B), pode-se notar que há diferença morfológica entre as duas linhagens de células. As células não tumorais E10, apresentam os filamentos de actina de maneira organizada (figura 16 A), onde é possível observar estes filamentos (em verde) dispostos paralelamente, já, as células tumorais E9, a apresentação destes filamentos encontra-se de forma desorganizada com a presença de pontos, que são formados devido à perda de proteínas de adesão gerando um aglomerado de fibras (figura 16 B – seta vermelha).

Figura 16 – Diferença morfológica entre as linhagens E10 e E9 com relação a disposição dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto.



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

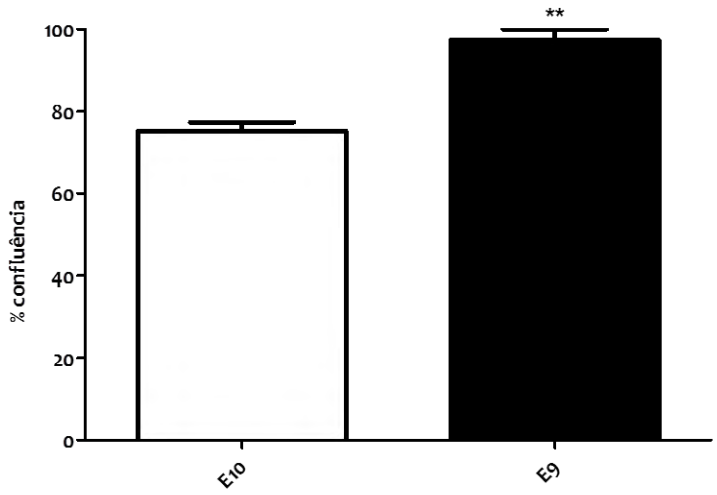
Legenda: Filamentos de actina marcados com FALOIDINA – em verde; e núcleo corado com DAPI – em azul. A – célula não tumoral – E10, apresentando os filamentos dispostos paralelamente e de maneira organizada; B – célula tumoral – E9, filamentos desorganizados com a presença de pontos – aglomerados de fibras, (seta vermelha). Imagens capturadas em aumento de 400x (*0,11µm/px – objetiva de 40x)

5.1.3 Teste de migração – *Scratch Wound*

Após 26 horas do inicio do teste, foi analisada a porcentagem de confluência para fechamento do *Scratch* utilizando o Teste *T de Student* e como mostra o

Gráfico 5, as células tumorais E9 apresentaram maior motilidade e rapidez para o fechamento total do *Scratch* que as células não tumorais E10 (p=0,0028) e na figura 17, é possível observar esta diferença, onde as células não tumorais – E10, no tempo analisado de 26 horas ainda havia um espaço em aberto do *Scratch* (figura 17 – A e B), enquanto as células tumorais – E9 neste mesmo tempo já estava praticamente fechado por completo o *Scratch* (figura 17 – C e D).

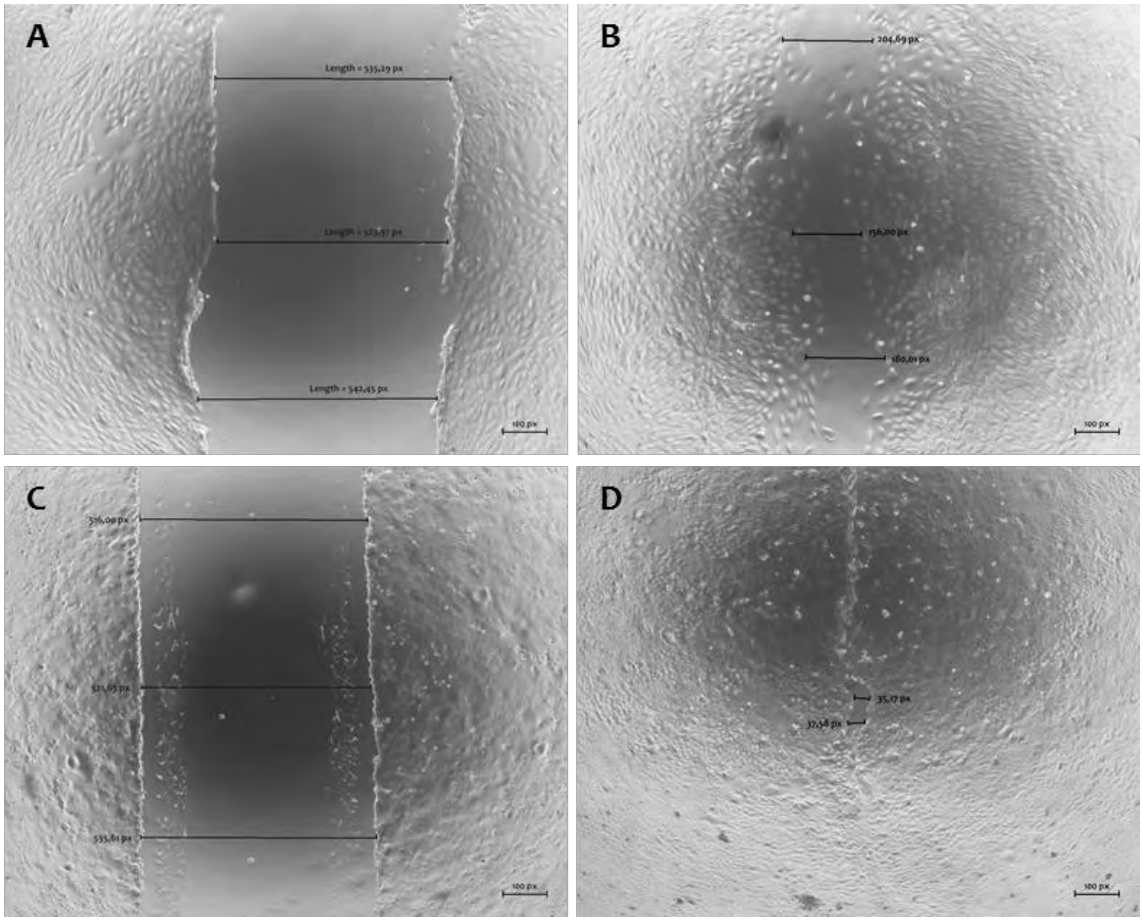
Gráfico 5 – Análise do tempo de migração, comparando os tempos de 0 (zero) horas e 26 horas



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Houve diferença significante de p=0,0028, em relação ao o tempo de fechamento do *Scratch*, comparando as duas linhagens de células E01 e E9.

Figura 17 – Migração das células e fechamento do *Scratch wound*



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

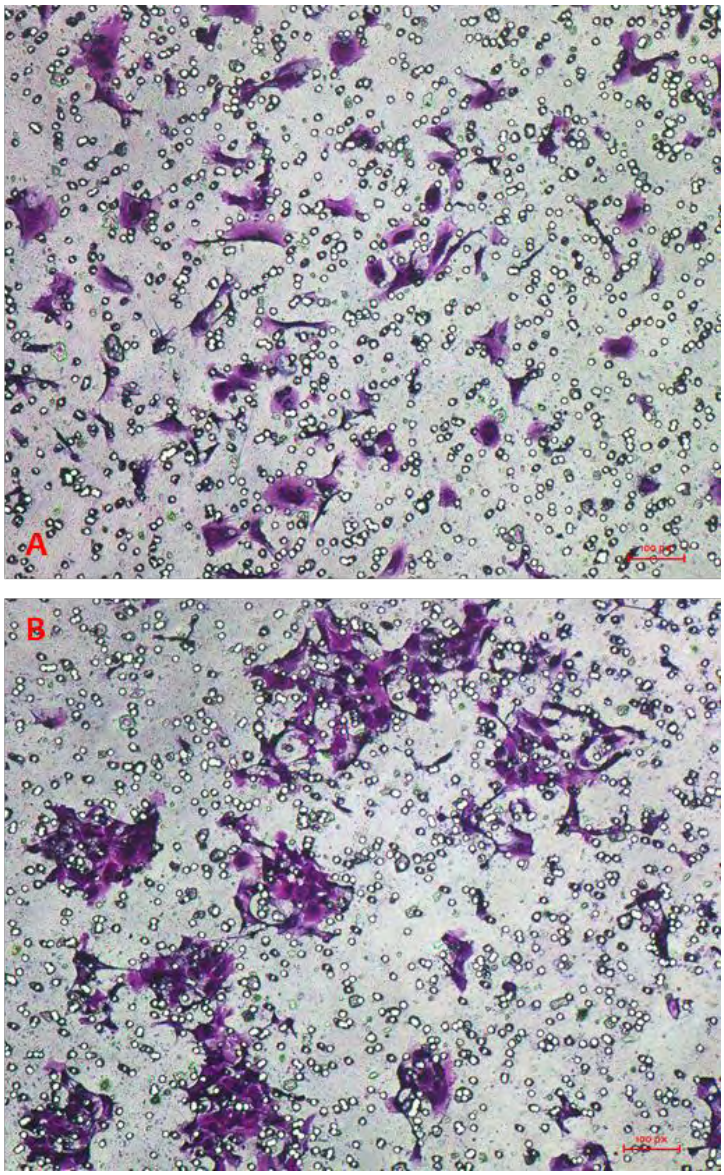
Legenda: Distâncias dos *Scratch wound* medidos em pixels e analisados em dois tempos diferentes, sendo T= 0 (zero) hora (imagens A e C) e T= 26 horas (imagens B e D), onde A e B representam as células E10 e C e D representam as células E9. Imagens capturadas em aumento de 40x (***** 0,76µm/px – objetiva 4x)

5.1.4 Teste de Invasão – *Transwell*

Através deste experimento, analisou a capacidade das células em digerir uma matriz extracelular (*ECM gel*), invadir e passarem para um novo local, no caso o inserto (*Transwell*), onde as células tumorais E9 (figura 18 B) apresentam maior capacidade de invasão que as células não tumorais E10 (figura 18 A), além de invadirem em grupos de

células. Ao comparar estatisticamente a quantidade de células E10 e E9 que foram capazes de invadir a matriz extracelular e passaram para a parte de baixo do inserto, obteve-se uma diferença significante, indicando que há um aumento (p=0,0043) na quantidade de células tumorais capazes de digerir e invadir a matriz extracelular, como mostra o Gráfico 6.

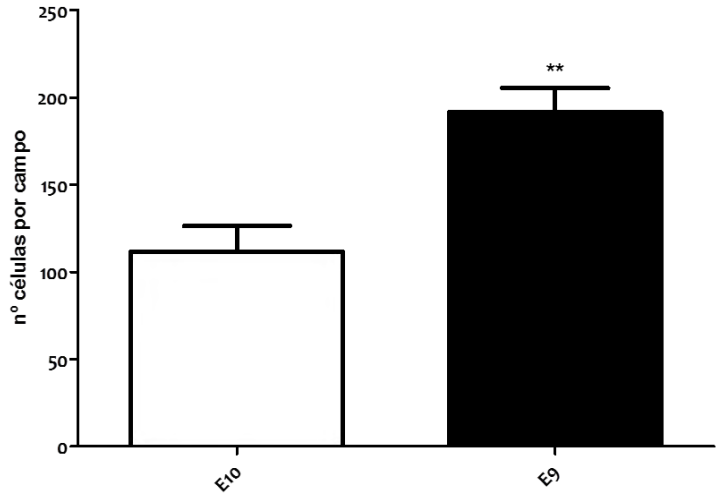
Figura 18 – Diferença entre a quantidade de células E10 e E9 capazes de invadir a ECM gel-*Transwell*



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: A – Célula não tumoral E10; B – Célula tumoral E9. Imagens capturadas em aumento de 100x, onde se observa as células que foram capazes de invadir a matriz extracelular (* 0,30µm/px – objetiva de 10x).

Gráfico 6 – Comparação da capacidade de invasão após teste de *Transwell*



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Observa-se um aumento significante (p=0,0043), quanto ao número de células tumorais, que invadiram e atravessaram a *ECM gel.*

5.1.5 Análise da atividade enzimática de aldeído desidrogenase nas CTCs através de Citometria de Fluxo

Através da análise realizada por citometria de fluxo, onde foi avaliada a atividade enzimática de ALDH presente nas células E10 e E9, observou-se que as células E10 apresentam cerca de 6x menos células como alta atividade de ALDH que as E9 como identificado na Tabela 4, onde para cada 100.000 eventos, ou seja, para cada 100.00 células analisadas, a linhagem não tumoral E10 apresentou em média, apenas 1% de células com alta atividade de ALDH, já a linhagem tumoral E9, apresentou cerca de 7% de células com alta atividade de ALDH.

Tabela 4 – Porcentagem de células ALDH positivas presentes em E10 e E9

	T1	T2	T3	Média/DVP
N° de eventos adquiridos	100.000	100.000	100.000	
E10	0,81	0,87	1,85	1,18 ± 0,5
E9	8,11	5,81	7,52	7,15 ± 1,0

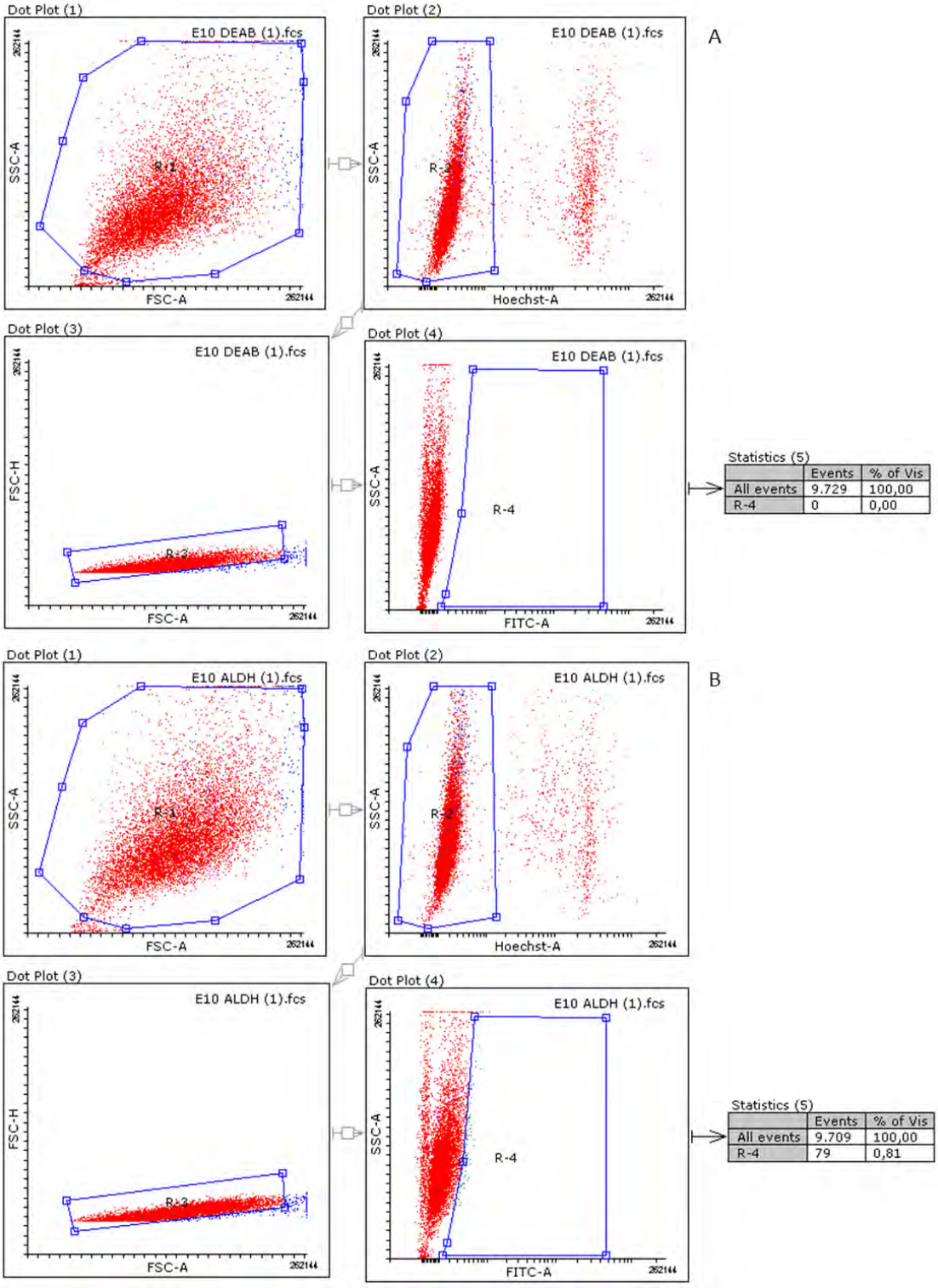
Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: T1, T2 e T3, são os valores referentes a cada uma das triplicatas, quanto às porcentagens de células ALDH^{High}. DVP – desvio padrão.

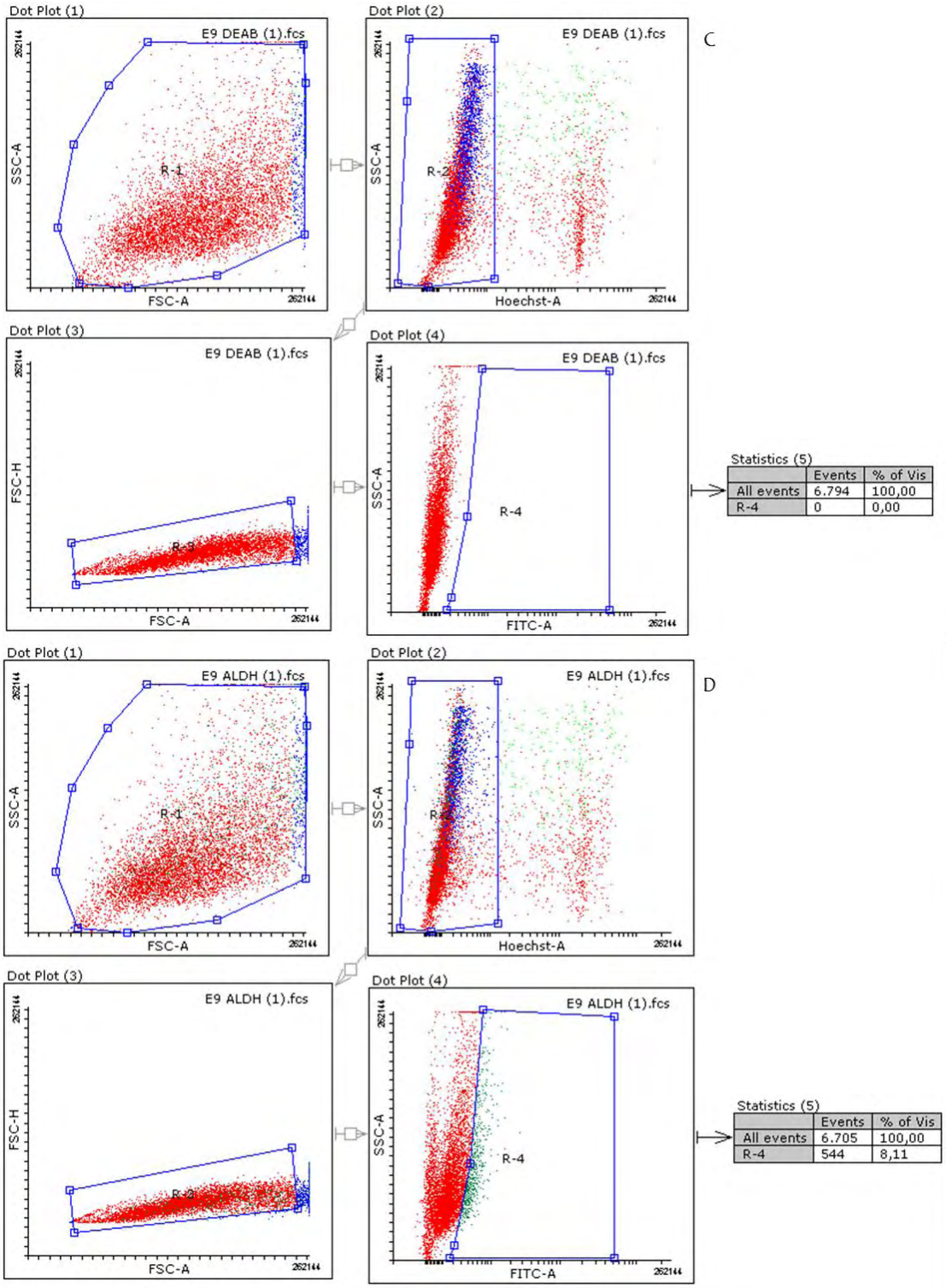
Estes dados também estão demonstrados na figura 19 (A, B, C e D), onde na figura 19 A (célula E10) e C (célula E9) encontram-se os controles da reação onde foi utilizado o reagente DEAB (inibidor do ALDEFLUOR), com isso, no *Gate* R-4 – (*Gate* onde estão sendo analisadas as células positivas para ALDH) encontram-se vazios, tendo 0% de células. Na figura 19, B (célula E10) e D (célula E9), estão às amostras sem o inibidor, ou seja, positivas para o ALDEFLUOR, sendo então possível analisar as células com alta atividade de ALDH, como mostra no *Gate* R-4 (figura 19 B) 0,81% de células E10 positivas para ALDH e no *Gate* R-4 (figura 19 D) 8,11% de células E9 positivas para ALDH e, ao analisar estes dados estatisticamente, observou-se que houve um aumento significante (p=0,0015) na quantidade de células ALDH positivas oriundas das células tumorais E9 como mostra no gráfico 7.

Figura 19 – Análise da atividade de ALDH presentes em células E10 e E9

(Continua)



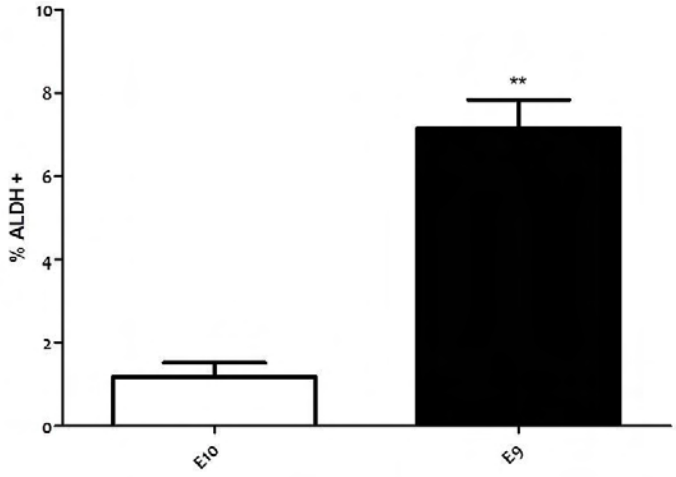
(Conclusão)



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Análise da atividade de ALDH, presentes nas células E10 (A e B) e E9 (C e D), indicando populações de possíveis CTCs. (A e C) controle utilizando "DEAB"; (B e D) positivas para o reagente ALDEFLUOR. Nos Gates R1, mostram os 10000 eventos adquiridos analisando tamanho e complexidade; nos Gates R2, estão apenas as células negativas para Hoechst, utilizado para exclusão das células mortas; nos Gates R3 indicam as *single cells*, por exclusão de *doublets*; e nos Gates R4, estão as células ALDH positivas.

Gráfico 7 - Análise da atividade enzimática de ALDH presente nas células E10 e E9 por Citometria de fluxo



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Houve uma diferença significante de p=0,0015, quando comparada à população de células ALDH positivas presente nas duas linhagens, utilizando Test *T de Student.*

5.2 **EXPERIMENTO 2:** AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E FRAÇÕES BUTANÓLICA (BUF) E AQUOSA (FAQ) DE *PAULLINIA CUPANA*, SOBRE A POPULAÇÃO DE CTCS DAS CÉLULAS TUMORAIS E9

5.2.1 Avaliação da citotoxicidade do EEB, BUF e FAQ de *Paullinia cupana* (*P.c.*)

Foram avaliados os efeitos citotóxicos do EEB e suas frações BUF e FAQ nas duas linhagens de células E10 e E9, sendo feitos em triplicatas e os dados analisados no software *GraphPad Prism* 5.0. Através deste experimento, encontrou-se a concentração de inibição de 50% da viabilidade das células (IC50) (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores da concentração de inibição de 50% da viabilidade celular (IC50), após tratamento com *Paullinia cupana.*

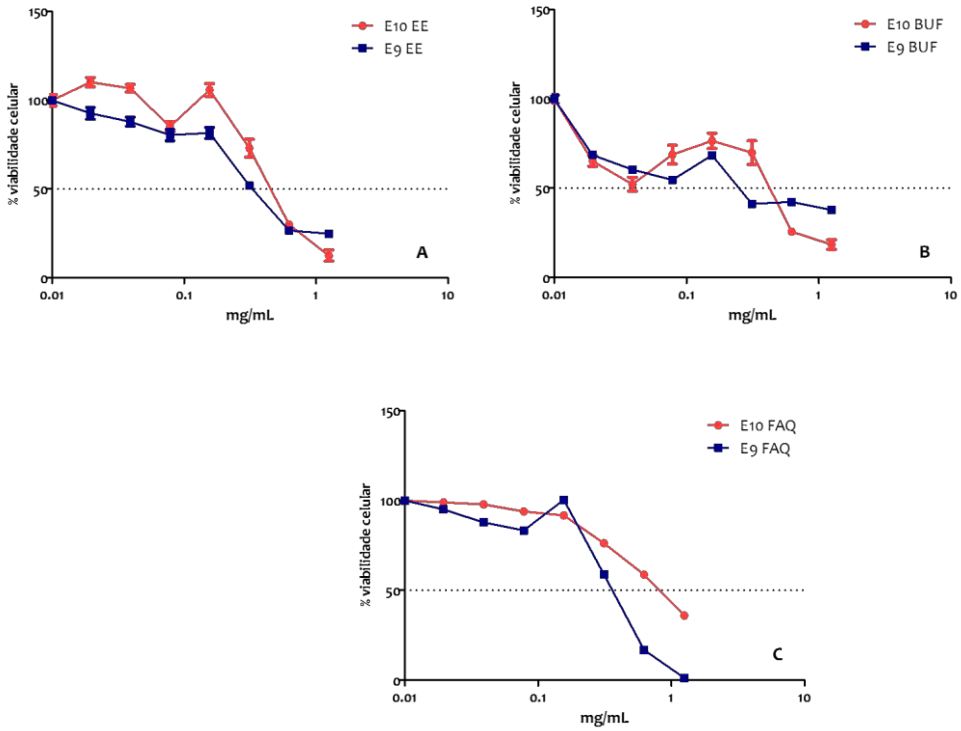
Linhagens de Células	Extrato Etanólico Bruto (EEB) µg/mL	Fração Butanólica (BUF) µg/mL	Fração Aquosa (FAQ) µg/mL
E10	550,5 ± 9	285,6 ± 33	899,7 ± 16
E9	356,6 ± 12	221,2 ± 8	355,5 ± 3

Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Média e desvio padrão das IC50 em [µg/mL] dos respectivos extratos.

Ao comparar as células após serem tratadas com os extratos, obteve-se um efeito dose-dependente e todos os extratos apresentaram efeito menos citotóxico nas células não tumorais E10, sendo mais citotóxico nas células tumorais E9 (Figura 20 A, B e C). Como após fazer a leitura de absorbância das placas utilizando o equipamento FLUOStar foi observado que na maior concentração do extrato [2,5mg/ml], devido a sua coloração escura, houve muita interferência na leitura, estes dados foram retirados das análises, sendo assim as análises feitas a partir da segunda maior concentração [1,25mg/mL].

Figura 20 – Avaliação da citotxicidade do Extrato de *Paullinia cupana* e das frações butanólica e aquosa



Fonte: ROCHETTI, A. L. 2014

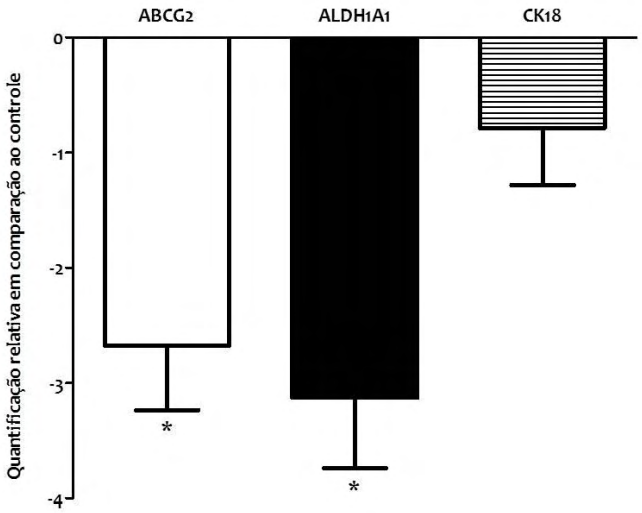
Legenda: Análise do efeito citotóxico e dose-dependente do extrato e suas frações, entre as duas linhagens de células E10 e E9. A – Extrato Etanólico Bruto de *P.c.* (EEB); B – Fração Butanólica (BUF); Fração Aquosa (FAQ). Cada ponto da curva da regressão não-linear corresponde a uma concentração diferente dos extratos, sendo o ponto inicial o controle e os demais seguem a diluição seriada [1:1] da menor concentração [0,0195mg/ml] até o último ponto com [2,5mg/ml].

Após encontrar a fração que apresentou melhor efeito sobre as células tumorais, como no caso a fração butanólica, por apresentar menor concentração de extrato necessário para atingir 50% da viabilidade celular, sendo necessário apenas 221,2µg/mL, já, para o extrato bruto seria necessário 356,6µg/mL e para a fração aquosa com 355,5µg/mL, como demonstrado na tabela 5, foi então realizada a analise da expressão gênica.

5.2.2 Análise da expressão gênica

A expressão gênica foi analisada comparando as células E9 sem tratamento e pós-tratamento com a concentração de inibição de 50% da viabilidade celular (IC50) para a fração butanólica, fração que apresentou maior eficiência no tratamento das células tumorais. Com isso, pode-se observar que após o tratamento com a IC50 houve uma diminuição da expressão dos genes ABCG2 e ALDH1A1, comparados ao controle endógeno utilizado (18s), apresentando valores significantes para $p<0,05$ e ao comparar o controle endógeno com o gene CK18, não houve diferença significante tendo $p>0,05$ como mostra o Gráfico 8.

Gráfico 8 – Quantificação relativa da expressão gênica por RT-PCR em células E9



Fonte: ROCHETTI, A.L. 2015

Legenda: Análise utilizando o método de Pfaffl, (2001), para quantificação relativa da expressão gênica, nas células E9 pós-tratamento com IC50 – BUF. (*) valor significante para $p<0,05$. ABCG2 – $p=0,0286$; ALDH1A1 – $p=0,0286$.

Na Tabela 6, encontram-se os valores das médias e dos desvios padrão de CT, ΔCT, e o LOG2 da razão de quantificação relativa, que foram utilizados para fazer a análise estatística seguindo o método descrito por Pfaffl (2001).

Tabela 6 – Análise da expressão gênica para os genes 18s, ABCG2, ALDH1A1 e CK18 em células E9.

	E9 CTRL	**E9 BUF**
CT 18s	11,4 ± 1,1	12,5 ± 0,6
CT ABCG2	25,2 ± 1,2	30,1 ± 2,4
ΔCT (18s-ABCG2)	-13,8 ± 0,1	-17,7 ± 1,8
LOG2	-0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
CT ALDH1A1	26,8 ± 1,3	32,0 ± 2,5
ΔCT (18s–ALDH1A1)	-15,4 ± 0,2	-19,6 ± 1,9
LOG2	-1,7 ± 0,1	-0,1 ± 0,1
CT CK18	19,9 ±0,8	22,0 ± 1,8
ΔCT (18s-CK18)	-8,5 ± 0,3	-9,6 ± 1,2
LOG2	-1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0

Fonte: ROCHETTI, A. L. 2015

Legenda: Células E9 (CTRL – controle sem tratamento e BUF – pós tratamento com o valor de IC50 da fração butanólica de *P.c.*). Análise utilizando o método descrito por Pfaffl (2001).

Ao analisar todos estes dados da expressão gênica, pode-se dizer que o guaraná apresentou efeito agindo sobre as CTCs, devido a diminuição da expressão dos genes ABCG2 e ALDH1a1, que são altamente expressos em células-tronco cancerosas e que as células analisadas se mantinham viáveis, devido a não alteração da expressão de CK18, que é bastante importante para manter a integridade celular.

6 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão está entre um dos maiores causadores de morte por câncer no mundo (SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, 2015), apesar de todos os estudos já realizados indicando os mais prováveis causadores desta neoplasia e de todos os estudos visando melhoria dos tratamentos sejam eles, convencionais como quimioterapia e radioterapia, ou terapias alvos, ou até mesmo a junção deles, o índice de incidência e mortalidade devido aos cânceres de pulmão ainda é bastante elevado (GORELIK; LOKSHIN; LEVINA, 2010; WU; CHEN; WANG, 2012) e a resistência às terapias convencionais, ainda é um grande problema para a medicina e as CTCs podem ser as responsáveis por essa resistência em neoplasias pulmonares (GORELIK; LOKSHIN; LEVINA, 2010). Devido a isto neste trabalho buscou-se validar a presença de populações de células-tronco cancerosas, a partir de cultivo *in vitro* de células de pulmão de camundongo, visando posterior possibilidade de ter estas células como alvo para avaliação rápida de substancias antitumorais.

Com isso, primeiramente foi necessário realizar uma recaracterização morfológica das linhagens estudadas onde foi observado que as células E10 e E9 mantinham suas características iniciais de células não tumorais e tumorais respectivamente, como caracterizado por MALKINSON e colaboradores (1997). Esta recaracterização foi possível devido à observação da disposição dos filamentos de actina, que estão presentes no citoesqueleto das células, responsáveis pelo crescimento e divisão, sustentação e mobilidade celular (JORDAN; WILSON, 1998), onde as células não tumorais devem apresentar os filamentos dispostos de maneira organizada paralelamente, chamado de *stress-fiber* e as células tumorais devem apresentar os filamentos de maneira desorganizada, tendo a presença de pontos com aglomerados de fibras, este mesmo aspecto foi observado por MALKINSON e colaboradores (1997), ao caracterizar as células E10 e E9, como também foi observado por OLIVEIRA, R. M (2000), quando comparou uma linhagem de célula não tumoral de fibroblasto de fígado de rato BRL3A, com duas linhagens de células tumorais, A549 (carcinoma de pulmão humano) e HK2 (inóculos de HK1 – carcinoma de células grandes de pulmão). Esta presença de pontos com

aglomerados de fibras é devido à perda de proteínas de adesão e polarização da actina, que estão relacionadas com a capacidade das células tumorais fazerem migração, invasão e metástase (JORDAN; WILSON, 1998).

Corroborando com estas observações, estão os dados obtidos no presente estudo, através das metodologias de *Scratch wound* e *Transwell*, onde as células tumorais E9, apresentaram uma maior velocidade no tempo de migração e fechamento do *scratch* e também um maior grau de invasividade que as células não tumorais. Isto é possível, devido à presença de estruturas ou protrusões que são chamadas de lamelopodia e filopodia, que apresentam interação com a matriz extracelular, diferentes proteínas de sinalização, estruturais, como *actin-binding proteins* (ABP), além da presença dos filamentos de actina que são responsáveis pela extensão e retração destas estruturas, permitindo assim, a mobilidade das células (FRIEDL; WOLF, 2003; LAMBRECHTS; VAN TROYS; AMPE, 2004; YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007). A desregulação de actina, que pode ser observada em células tumorais, esta ligeiramente ligada à capacidade de migração das células tumorais, disseminação através de vasos sanguíneos e linfáticos, invasão de tecidos adjacentes e formação de metástase (LAMBRECHTS; VAN TROYS; AMPE, 2004; WANG et al., 2005).

Além disso, como descrito por vários autores, alguns tumores epiteliais como tumores lobulares de mama, de próstata, carcinomas de ovário e de células grandes de pulmão, as células tumorais utilizam um mecanismo de migração em grupos, protegendo as células que estão no interior da massa, dificultando que haja um ataque de células do sistema imune a estas células e, com isso, aumentam a chance do tumor de se manter vivo, de invadir outros tecidos e dar origem a uma formação secundária (FRIEDL et al., 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SAHAI, 2005). Esta mesma característica de invasão em grupo, também pode ser observada neste trabalho com as células tumorais através do teste de *Transwell*.

Como citado por BAO e colaboradores (2014), estas características observadas e descritas acima estão associadas a um fenótipo de maior agressividade, podendo ser relacionadas com a hipótese da existência das CTCs, que seriam as responsáveis por apresentar resistência aos tratamentos convencionais, aumentando a chance de

sobrevivência do tumor, apresentando maior capacidade de migração, invasão e metástase, além de recorrência e recidiva tumoral (BAO et al., 2014). Além destas características, sabe-se que as células-tronco cancerosas apresentam várias características semelhantes às células-tronco, além de que, para identificar e separar as CTCs se usufrui das mesmas ferramentas que utilizadas para as CTs, como alguns marcadores de CT, como por exemplo, CD34 e/ou CD133, são utilizados para identificar células-tronco hematopoiéticas (HSCs) (MA; ALLAN, 2011), fatores de transcrição como OCT3/4, Nanog, que promovem auto-renovação (KLONISCH et al., 2008), como também apresentam mecanismos de resistência e proteção aos tratamentos como a alta quantidade de transportadores de membrana, como ABCG2 e alta atividade da enzima ALDH1 (MA; ALLAN, 2011; WU; CHEN; WANG, 2012).

A análise da atividade enzimática de aldeído desidrogenase, tem sido bastante utilizado para tentar identificar e separar as CTCs de pulmão (KUMAR; KAPOOR, 2014) e foi através desta ferramenta que neste presente estudo tentou-se avaliar a existência da população de CTCs, através de citometria de fluxo. Onde foi possível verificar uma população de aproximadamente 7% de células $ALDH^{High}$ oriundas das células tumorais E9. Ainda não se sabe ao certo, qual a porcentagem de CTCs encontradas nos mais variados tipos de tumor, em WU e colaboradores (2012), diz que a porcentagem de CTCs presentes em adenocarcioma de pulmão e em SCLC, era menos de 1,5%, porém em VISVADER E LINDEMAN (2008) dizem que em estudos pioneiros de leucemias e linfomas espontâneos em camundongos, há cerca de 1% destas células, porém, apontam que em tumores sólidos, a porcentagem de CTCs é substancialmente maior que em leucemias, mas, dizem também que entre os tumores sólidos, ocorre uma variação em relação à porcentagem de CTCs.

Atualmente, a grande expectativa para se obter um tratamento mais eficaz das neoplasias é ter como alvo as CTCs, pois como elas apresentam resistência às terapias convencionais, ficando inertes durante os tratamentos e posteriormente podendo vir a gerar a recorrência e recidiva tumoral, ter as CTCs como alvo para o tratamento, além de poder prolongar a sobrevida dos pacientes, pode ser uma opção bastante eficaz no tratamento do câncer (WANG et al., 2013; XIE et al., 2015). Alguns estudos comprovam esta resistência às terapias convencionais das CTCs, quando mostram que após tratarem

as células tumorais com alguns dos quimioterápicos mais utilizados como, por exemplo, a cisplatina e doxorrubicina, as células que sobrevivem, apresentam características de CTCs, como, maior invasididade, maior malignidade, como também aumentam maior expressão de CD133,OCT3/4, Nanog, ABCG2, ALDH, entre outros (FREITAS et al., 2014).

Muitos estudos vêm avaliando a possibilidade de novos tratamentos utilizando produtos naturais, como por exemplo, algumas espécies de plantas ou até mesmo alguns compostos isolados de plantas que apresentam efeito sobre o câncer como: Propriedades anticancerígenas de PCA (*Protocatechualdehyde*), um composto polifenólico natural isolado da erva *Salvia. Miltiorrhiza* (sálvia chinesa), avaliado em neoplasia mamaria humana (CHOI et al., 2014); ação anticancerígena em diferentes linhagens de células de neoplasias humanas, como A549, H23, MCF-7, entre outras, utilizando extrato solúvel da folha de *Moringa oleífera* (acácia branca) (JUNG, 2014); como também a utilização de homeopáticos (CAM) - *Complentary Alternative Medicines,* que demonstrou ação anti-proliferativa em neoplasias de rim, cólon e mama (ARORA et al., 2013). Com base nestes estudos, no presente trabalho, tentou avaliar se o guaraná (*Paullinia cupana*) apresentava efeito sobre a população de CTCs, avaliando a expressão gênica de genes utilizados na identificação destas CTCs, como ABCG2 e ALDH1a1, pois como já apresentado na literatura, o guaraná auxilia no controle de fogachos em pacientes que estão em tratamento de câncer de mama (OLIVEIRA et al., 2013), como também apresenta atividade quimiopreventiva e antiproliferativa (FUKUMASU et al., 2006, 2008).

Como já descrito por vários trabalhos, as CTCs de diferentes tipos de neoplasias incluindo as pulmonares podem ser identificadas através da detecção de ABCG2, que são transportadores de membrana da família *ATP Binding Cassette sub-familly G2* - que remetem proteção a estas células, funcionando como uma bomba de efluxo de múltiplas drogas, expulsando os fármacos utilizados nos tratamento das neoplasias e devido a isso, ABCG2 deve ser altamente expresso nas CTCs (FREITAS et al., 2014; GORELIK; LOKSHIN; LEVINA, 2010; KLONISCH et al., 2008), como também deve apresentar alta expressão de ALDH, que são enzimas responsáveis pela oxidação de aldeídos intracelulares, mediando resistência aos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer (ERAMO; HAAS; DE MARIA, 2010; MA; ALLAN, 2011; STERLACCI et al., 2014) e no presente estudo avaliou a

expressão de uma das isoformas desta enzima, a ALDH1A1, que apresenta papel importante em CT e CTCs, como auto-proteção e diferenciação (MA; ALLAN, 2011), resistência a drogas e sua alta expressão em câncer de pulmão esta relacionada com um pior prognóstico da doença (SHIMADA et al., 2013).

Além destes, também são utilizadas algumas citoqueratinas, como por exemplo CK8 e/ou CK18, que são filamentos intermediários específicos de células epiteliais, que são essenciais na manutenção da integridade celular, envolvida na resposta a injurias, proliferação e morte celular (FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2013), como também estão envolvidos na motilidade celular e na progressão do câncer (FILLIES et al., 2006). Ainda é controversa a expressão destas citoqueratinas em câncer, como por exemplo, IYER e colabores (2013), dizem que a alta-expressão de CK8/18 contribuem para a transformação maligna de células de epitélio estratificado e a alta expressão de CK18 em células de carcinoma mamário indica ser altamente invasivas e metastáticas, mas neste mesmo trabalho, eles relatam outro resultado onde à alta expressão de CK18 em pacientes com tumor de mama esta associada a um prognóstico favorável (IYER et al., 2013). Já em outro estudo diz que a diminuição da expressão de CK8/18 está associada com metástase e quimioresistência, durante a transição epitélio mesenquimal (EMT) e que a expressão delas é mantida durante a tumorigenese – até que o tumor se torne maligno e invasivo (FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2013).

Corroborando com estas observações, estão os resultados obtidos neste trabalho, onde após o tratamento das células com a fração butanólica do guaraná, houve uma diminuição da expressão dos genes ABCG2 e ALDH1a1, genes que são altamente expressos e bastante utilizados para identificação de CTCs e não houve alteração na expressão de CK18, citoqueratina importante na mobilidade e integridade das células, podendo sugerir que o guaraná afetou principalmente as células-tronco cancerosas presentes na linhagem de células tumorais E9.

7 CONCLUSÃO

- Foi possível determinar uma população de células neoplásicas com maior atividade de aldeído desidrogenase, característica presente em células-tronco cancerosas, encontradas em células tumorais de pulmão de camundongo (E9);

- O Guaraná (*P. cupana*) apresentou potencial antitumoral, tendo como possível alvo as CTCs, devido às diminuições na expressão dos genes ABCG2 e ALDH1A1, que são utilizados para identificar a presença de possíveis.

8 REFERÊNCIAS

A. C. CAMARGO, Cancer Center. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/pulmao/33/>. Acesso em 27 out. 2015.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. [s.l: s.n.].

Ambientebrasil - portal ambiental. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/>. Acesso em: 27 out. 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Lung Cancer (Non-Small Cell)**. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf>.

ARORA, S. et al. Anti-proliferative effects of homeopathic medicines on human kidney, colon and breast cancer cells. **Homeopathy,** London, v. 102, n. 4, p. 274–282, 2013.

BAO, B. et al. Cancer Stem Cells (CSCs) and Mechanisms of Their Regulation: Implications for Cancer Therapy. **National Institutes of Health,** Bethesda. p. 1–18, 2014.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 7, p. 730–737, 1997.

BUACHAN, P.; CHULAROJMONTRI, L.; WATTANAPITAYAKUL, S. K. Selected activities of Citrus maxima Merr. fruits on human endothelial cells: enhancing cell migration and delaying cellular aging. **Nutrients**, Switzerland, v. 6, n. 4, p. 1618–34, 2014.

Caiabí - Empresa Agroindustrial Ltda - Produtos da Amazonia Legal. Disponível em: <http://www.caiabi.com.br/publicacoes/guaranazeiro-saiba-mais-sobre-planta-paullinia-cupana>. Acesso em: 27 out. 2015.

CANICEIRO, B. D. **Efeitos da Paullinia cupana e de seus principais compostos ativos na modulação da resposta imune**. [s.l: s.n.].

CEPLAC. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/>. Acesso em: 27 out. 2015.
CHABNER, B. A; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews. Cancer**, London v. 5, n. 1, p. 65–72, 2005.

CHOI, J. et al. Anticancer Activity of Protocatechualdehyde in Human Breast Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2014.

CRIPE, T. P. et al. Targeting Cancer-initiating Cells With Oncolytic Viruses. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1677–1682, 2009.

DE OLIVEIRA CAMPOS, M. P. et al. Guarana (Paullinia cupana) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine,** New York, v. 17, n. 6, p. 505–512, 2011.

ERAMO, A.; HAAS, T. L.; DE MARIA, R. Lung cancer stem cells: tools and targets to fight lung cancer. **Oncogene**, London, v. 29, n. 33, p. 4625–4635, 2010.

ESPINOLA, E. B. et al. Pharmacological activity of Guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 55, n. 3, p. 223–229, 1997.

FILLIES, T. et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **BMC cancer**, London, v. 6, p. 10, 2006.

FORTIER, A. M.; ASSELIN, E.; CADRIN, M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v. 288, n. 16, p. 11555–11571, 2013.

FREITAS, D. P. et al. Therapy-induced enrichment of putative lung cancer stem-like cells. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 134, n. 6, p. 1270–1278, 2014.

FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, Londonv. 14, n. 8, p. 777–783, 2012.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.

FUKUMASU, H. et al. Chemopreventive effects of Paullinia cupana Mart var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, Shannon, v. 233, n. 1, p. 158–164, 2006.

FUKUMASU, H. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, Paullinia cupana Mart var. sorbilis, em modelos experimentais in vivo e in vitro**. [s.l: s.n.].

FUKUMASU, H. et al. Paullinia cupana Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 4, p. 305–310, 2008.

Globocan 2012 - Home. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acesso em: 11 nov. 2015.

GOODELL, M. A et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 183, n. 4, p. 1797–806, 1996.

GORELIK, E.; LOKSHIN, A.; LEVINA, V. Lung cancer stem cells as a target for therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, Bussum, v. 10, n. 2, p. 164–171, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HENMAN, A. R. Guraná (Paullinia cupana Var. sorbilis): ecological and social perspectives on an economic plant of central Amazon Basin*. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 1, p. 311–338, 1982.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, Basel, v. 3, n. 1, p. 107–124, 2011.

INCA. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil - 2014**. [s.l: s.n.].

IYER, S. V et al. Understanding the role of keratins 8 and 18 in neoplastic potential of breast cancer derived cell lines. **PloS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e53532, 2013.

JOHN, T. M. S. **With Every Breath : A Lung Cancer Guidebook**. [s.l: s.n.].

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. **Current Opinion in Cell Biology**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 123–130, 1998.

JUNG, I. L. Soluble extract from Moringa oleifera leaves with a new anticancer activity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2014.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 24, n. 14, p. 2137–2150, 2006.

KESHAMOUNI, V.; ARENBERG, D.; KALEMKERIAN, G. Lung Cancer Metastasis: Novel Biological Mechanisms and Impact on Clinical Practice. [s.l.] **Springer Science & Business Media**, Minneapolis, 2009.

KLONISCH, T. et al. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 450–460, 2008.

KUMAR, S.; KAPOOR, A. Cancer stem cell: A rogue responsible for tumor development and metastasis. **Indian Journal of Cancer**, Mumbai, v. 51, n. 3, p. 282, 2014.

LAMBRECHTS, A.; VAN TROYS, M.; AMPE, C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 1890–1909, 2004.

LUNDIN, A.; DRISCOLL, B. Lung cancer stem cells: Progress and prospects. **Cancer Letters**, Shannon, v. 338, n. 1, p. 89–93, 2013.

MA, I.; ALLAN, A. L. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 7, n. 2, p. 292–306, 2011.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 104, n. 3, p. 1258–1268, 2007.

MALKINSON, A M. et al. Mouse lung epithelial cell lines--tools for the study of differentiation and the neoplastic phenotype. **Toxicology**, Shannon, v. 123, n. 1-2, p. 53–100, 1997.

Ministério da Saúde – Portal da Saúde - www.saude.gov.br - Cidadão. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 11 nov. 2015.

OLIVEIRA, S. S. et al. Paullinia cupana for control of hot flashes in breast cancer patients : a pilot study. v. 11, n. 11, p. 435–438, 2013.

PIB - Povos Indígenas do Brasil. Disponível em: <http://pib.socioambiental.org/pt/povo/satere-mawe/968>. Acesso em: 27 out. 2015.

SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxfird, v. 15, n. 1, p. 87–96, 2005.

SANTOS, C. A. DE M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas Medicinais: Herbarium, Flora et Scientia**. [s.l.] Scientia et Labor, Editora da UFPR, 1987.

SHIMADA, Y. et al. Cancer stem cell-related marker expression in lung adenocarcinoma and relevance of histologic subtypes based on IASLC/ATS/ERS classification. **OncoTargets and therapy**, MAcclesfield, v. 6, p. 1597–604, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics , 2015 . **CA Cancer J Clin**, Hoboken, v. 65, n. 1, p. 21254, 2015.

STERLACCI, W. et al. Putative Stem Cell Markers in Non – Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**. New York, v. 9, n. 1, p. 41–49, 2014.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 3, n. 10, p. 768–780, 2003.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 8, n. 10, p. 755–768, 2008.

WANG, P. et al. Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, 2013.

WANG, W. et al. Tumor cells caught in the act of invading: Their strategy for enhanced cell motility. **Trends in Cell Biology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 138–145, 2005.

WARSHAWSKY, D.; LANDOLPH JR., J. R. **Molecular Carcinogenesis and the Molecular Biology of Human Cancer**. [s.l.] CRC Press, 2005.

WU, X.; CHEN, H.; WANG, X. Can lung cancer stem cells be targeted for therapies? **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 38, n. 6, p. 580–588, 2012.

XIE, L.-X. et al. Rapamycin inhibited the function of lung CSCs via SOX2. **Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, Dordrecht, 3 nov. 2015.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1773, n. 5, p. 642–52, 2007.