**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Ariel Viscardi

Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de plantas em linhagens celulares humanas de câncer de mama, fígado e próstata

São Carlos
2018

ARIEL VISCARDI

Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de plantas em linhagens celulares humanas de câncer de mama, fígado e próstata

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

V822a Viscardi, Ariel
 Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de plantas em linhagens celulares humanas de câncer de mama, fígado e próstata / Ariel Viscardi; orientador Andrei Leitão. São Carlos, 2018.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2018.

 1. Câncer. 2. Produtos naturais. 3. Screening de substâncias bioativas. 4. Ensaios Biológicos. 5. Agentes antineoplásicos. 6. Química Medicinal. I. Título.

ARIEL VISCARDI

Título: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS
HIDROALCOÓLICOS DE PLANTAS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE
CÂNCER DE MAMA, FÍGADO E PRÓSTATA"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 27/04/2018

Prof. Dr. Andrei Leitão (Orientador)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Não votante

Profa. Dra. Fernanda Canduri	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Prof. Dr. Fábio Gonçalves Pinto	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Homologado em: ____/____/____

*Dedico esse trabalho à memória do
meu pai Vair e à minha mãe, Olga.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha amada mãe, Olga, que sempre me acolheu em todos os momentos e sempre me incentivou e encorajou em todas as dificuldades e desafios da vida. Obrigado por tudo, te amo muito!

Ao meu irmão e cunhada, Wesley e Rafaela, que sempre me apoiaram e me incentivaram em toda minha jornada, desde a graduação.

A todos os outros membros da minha família, minhas tias, tios, primos e avós. Em especial, ao meu amado e falecido pai, Vair, que mesmo longe e distante, sei que está presente de alguma forma e torcendo por mim.

Ao meu querido companheiro Ronald, por todo o suporte, carinho, amor e ajuda em todas as dificuldades e desafios. Você é muito especial na minha vida.

Ao Prof. Dr. Andrei Leitão por todos os ensinamentos, pela paciência, pela oportunidade e disponibilidade em me orientar como aluno de mestrado e, principalmente, por compreender todas as minhas dificuldades nesse longo caminho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari por me permitir fazer parte do grupo de pesquisa NEQUIMED, à técnica Fabiana por todo suporte profissional e a todos os amigos de laboratório que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial aos amigos atuais e antigos de laboratório: Camila, Murillo, Sabrina, Heloísa, Fernanda e Júlio (em memória), por sempre me ajudarem quando necessário e por confiarem no meu trabalho.

Às minhas duas amigas e companheiras mais próximas de laboratório, Daiane e Talita, que tanto me ajudaram em todas as etapas desse trabalho e por todos os momentos de diversão, força e apoio emocional, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao amigo de laboratório Júnior pelos ensinamentos, por me mostrar o mundo das células e dividir seu conhecimento, sendo sempre um exemplo de dedicação e profissionalismo.

À amiga Marta a quem eu tenho muito carinho e que, mesmo distante, sempre me ajudou e apoiou nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Fábio Macêdo Nunes, por ceder os extratos naturais e por estar presente de alguma forma na elaboração desse trabalho, tirando dúvidas e acrescentando profissionalmente.

A todos os professores do programa aos quais tive contato através das disciplinas por todo o conhecimento compartilhado e às amigas de pós-graduação, Thayz e Jorgeane, pela amizade e troca de conhecimento.

À minha sempre amiga Jakeline, por todas as conversas, por todo o apoio e por ser sempre um exemplo de pessoa e profissional.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e todos seus funcionários, principalmente às funcionárias da biblioteca.

A todo o programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia e todos seus funcionários, em especial a secretária Márcia e a Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis por todas as dúvidas sanadas, conversas, apoio e incentivo.

Por fim, aos órgãos de fomento FAPESP, CNPq e especialmente, CAPES, pelo apoio financeiro, para que esse trabalho pudesse ser realizado e pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

RESUMO

VISCARDI, A. **Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de plantas em linhagens celulares humanas de câncer de mama, fígado e próstata.** 2018. 123f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O câncer é uma das doenças que mais acometem a população no mundo. Dessa forma, estudar suas terapêuticas é importante para o entendimento dos mecanismos e alvos biológicos por detrás da doença. Apesar dos tratamentos convencionais apresentarem uma boa eficácia, eles também provocam respostas indesejadas, como danos moleculares, resistência de células neoplásicas e efeitos colaterais fortes, colaborando para uma maior taxa de reincidência de neoplasias e mortalidade de pacientes. Sendo assim, a busca por alternativas é um importante desafio da Ciência Moderna para aprimorar e/ou substituir esses tratamentos. As plantas medicinais, como alternativa, são o foco de muitos estudos voltados ao câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de 59 extratos em linhagens celulares humanas de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF7), próstata (PC-3 e DU 145) e fígado (HepG2). Foi realizada, inicialmente, uma triagem dos extratos por MTT em duas diluições 100x e 1000x para análise da viabilidade celular desses extratos. No total, 35 extratos obtiveram uma resposta para, pelo menos, uma das linhagens de câncer. A próxima etapa envolveu estudar os extratos pré-seletivos na triagem através de curvas-resposta quantificando a seletividade desses extratos para cada linhagem testada. Para essa etapa, foram selecionados 31 extratos. No câncer de mama, para a linhagem MDA-MB-231 nove extratos foram seletivos, e para MCF7 foram seis extratos. No câncer de próstata, para a linhagem PC-3, quinze extratos foram seletivos, e para DU 145 dezesseis extratos foram seletivos, mostrando uma maior sensibilidade do câncer de próstata comparado ao câncer de mama e fígado (HepG2 – sete extratos seletivos) em relação aos extratos testados. De todos os resultados apresentados, algodão de seda (*Calotropis procera*), camomila (*Matricaria chamomilla*), casca de anta (*Drimys winteri*), erva de São Caetano (*Momordica charantia* L.), estigmas de milho (*Zea mays*), graviola (*Annona muricata*), ipê roxo (*Tabebuia* sp.), malva – folhas (*Malva sylvestris*) e unha de gato (*Uncaria tomentosa*) foram os extratos mais amplamente significativos atingindo as linhagens celulares apresentando altos índices de seletividade. Com a realização desse trabalho podemos concluir que os extratos apresentam atividade antiproliferativa e seus fitoquímicos podem ser utilizados no estudo de novos fitoterápicos. O próximo passo é elucidar os mecanismos moleculares onde eles atuam.

Palavras-chave: Câncer. Produtos naturais. *Screening* de substâncias bioativas. Ensaio biológico. Agentes antineoplásicos. Química medicinal.

ABSTRACT

VISCARDI, A. **Evaluation of antiproliferative activity of hydroalcoholic plant extracts in breast, liver and prostate cancer human cell lines.** 2018. 123f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Cancer is one of the most common diseases overworld. Studying the therapeutics of it is important to understand the biological mechanisms and targets behind this disease. Although conventional treatments show a good outcome against some types of cancer, they also currently cause undesired responses, such as molecular damage, neoplastic cell resistance and strong side effects, increasing recurrence of neoplasms, metastasis formation, and patient mortality. Therefore, the search for new alternatives is a challenge for Modern Science to improve or replace conventional treatments. In view of their antiproliferative effects medicinal plants have become the focus of many cancer studies as an alternative. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic and antiproliferative effect of 59 plant extracts in human cancer cell lines as breast cancer (MDA-MB-231 and MCF7), prostate cancer (PC-3 and DU 145) and liver cancer (HepG2). Initially, the extracts were screened in two different dilutions 100x and 1000x by MTT to analyze the cellular viability and cytotoxicity effects of them. To 59 extracts analyzed, 35 were effective against at least one of the tested lineages. The next step involved studying those pre-selective extracts through response curves to quantify the selectivity of these extracts for each cell lineage tested. For this stage, 31 extracts were selected. In breast cancer, for MDA-MB-231, nine extracts were selective and for MCF7 were six extracts. In prostate cancer, for PC-3, fifteen extracts were selective and for DU 145 were sixteen extracts. For liver cancer (HepG2) only seven extracts were selective. Comparing all the cancer lineages we can see a greater sensitivity of prostate cancer lineages compared to breast cancer and liver cancer in response of these tested extracts. Of all the results presented, silk cotton (*Calotropis procera*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), winter's bark (*Drimys winteri*), bitter melon (*Momordica charantia* L.), corn silk (*Zea mays*), graviola (*Annona muricata*), purple trumpet tree (*Tabebuia* sp.), malva – folhas (*Malva sylvestris*) e unha de gato (*Uncaria tomentosa*) silk cotton (*Calotropis procera*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), graviola (*Annona muricata*) and mallow-leaves (*Malva sylvestris*) were the most effective extracts reaching different cell types and present high selectivity indices. With the accomplishment of this work we can conclude that the natural extracts of plants presented antiproliferative activity in cancer lines and their phytochemicals can be used to study new herbal medicines. The next step, then, is to understand the molecular mechanisms where they act.

Keywords: Cancer. Natural products. Bioactive substances screening. Biological Assays. Antineoplastic agents. Medicinal chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa de novos casos de câncer no Brasil em 2016	28
Figura 2 – Etapas da formação do câncer	30
Figura 3 – Processo de formação de metástases	31
Figura 4 – Microambiente tumoral e seus constituintes	32
Figura 5 – Principais mecanismos de resistência de células neoplásicas	40
Figura 6 – Linhagem de cultura celular Balb/C 3T3 clone A31	50
Figura 7 – Linhagem de cultura celular DU 145	51
Figura 8 – Linhagem de cultura celular PC-3	52
Figura 9 – Linhagem de cultura celular MCF7	53
Figura 10 – Linhagem de cultura celular MDA-MB-231	54
Figura 11 – Linhagem de cultura celular Hep G2	55
Figura 12 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 1)	64
Figura 13 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 2)	65
Figura 14 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 3)	66
Figura 15 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 1)	67
Figura 16 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 2)	68
Figura 17 – Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 3)	69
Figura 18 – Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular MDA-MB-231 – Comparação entre o controle (BalbC) <i>versus</i> a linhagem de interesse (MDA-MB-231)	74
Figura 19 – Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular MCF7 – Comparação entre o controle (BalbC) <i>versus</i> a linhagem de interesse (MCF7)	77
Figura 20 – Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular PC-3 – Comparação entre o controle (BalbC) <i>versus</i> a linhagem de interesse (PC-3)	79

Figura 21 – Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular DU 145 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (DU 145) **84**

Figura 22 – Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular HepG2 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (HepG2) **89**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Estimativa das proporções mundiais dos principais tipos de câncer (exceto o câncer de pele tipo não-melanoma) de acordo com sua incidência, em ambos os sexos, em homens e em mulheres, 2012	27
Tabela 2 – Estimativa das proporções mundiais dos principais tipos de câncer (exceto o câncer de pele tipo não-melanoma) de acordo com sua mortalidade, em ambos os sexos, em homens e em mulheres, 2012	28
Quadro 1 – Relação dos extratos de plantas trabalhados	57
Tabela 3 – Cálculo das diluições para as curvas-resposta	62
Quadro 2 – Comparação entre as linhagens celulares e os tipos de câncer em relação aos extratos testados durante a triagem, de acordo com a diluição (100x e 1000x) e sua viabilidade (seletivos e potencialmente seletivos)	71
Quadro 3 – Candidatos à curva-concentração-resposta com bons resultados e seletividade em relação à Balb/C, baseados nos dados da triagem	72
Quadro 4 – Cálculo das concentrações para a curva-resposta	73
Tabela 4 – Comparação entre os IC ₅₀ dos extratos testados em BalbC e MDA-MB-231 juntamente com os índices de seletividade	76
Tabela 5 – Comparação entre os IC ₅₀ dos extratos testados em BalbC e MCF7 juntamente com os índices de seletividade	78
Tabela 6 – Comparação entre os IC ₅₀ dos extratos testados em BalbC e PC-3 juntamente com os índices de seletividade	83
Tabela 7 – Comparação entre os IC ₅₀ dos extratos testados em BalbC e DU 145 juntamente com os índices de seletividade	88
Tabela 8 – Comparação entre os IC ₅₀ dos extratos testados em BalbC e HepG2 juntamente com os índices de seletividade	91
Tabela 9 – Comparação entre a atividade de todos os extratos testados em relação as linhagens de interesse	93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
°C	–	Grau Celsius
β -lap	–	β -lapachona
μ g	–	Micrograma
μ L	–	Microlitro
μ m	–	Micrometro
μ M	–	Micromolar
a.C.	–	Antes de Cristo
A375	–	linhagem de câncer de pele (melanoma)
AAS	–	Ácido acetil salicílico
ACNH	–	linhagem de carcinoma renal
AGEs	–	Acetogeninas anonáceas
AP-1	–	Fator de transcrição (proteína 1)
Balb/C	–	Linhagem celular de fibroblasto de camundongo
Bcl-2	–	Gene que faz parte do complexo anti-apoptótico
BCRJ	–	Banco de células do Rio de Janeiro
clAP	–	Inibidor celular de apoptose 1
$C_2H_4O_2$	–	Ácido acético glacial
C_2H_6O	–	Álcool etílico 70%
$C_6H_{12}O_6$	–	Glicose
C32	–	Melanoma amelanótico
CO_2	–	Dióxido de carbono
COX2	–	Cicloxygenase-2
CT26	–	Linhagem de câncer colorretal murino
DMEM	–	Meio de cultura celular
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DSTs	–	Doenças sexualmente transmissíveis
DU 145	–	Linhagem celular humana de carcinoma de próstata
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	–	Fator de crescimento epidermal
EP	–	Erro padrão
ER	–	Receptor de estrógeno
ERKs	–	Conjunto de quinases reguladas por sinal extracelular
F12-K	–	Meio de cultura celular

GAMG	–	linhagem celular humana de glioma
g/mL	–	Gramma por mililitro
H22	–	linhagem de hepatoma murino
HDAC	–	Histona desacetilase
HepG2	–	Linhagem celular humana de carcinoma hepatocelular
HER2	–	Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIF-1 α	–	Fator induzido por hipóxia 1
HMGR	–	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
HO-1	–	Heme oxygenase tipo 1
HTGL	–	Triglicerídeo lipase hepática
HTS	–	<i>High throughput screening</i>
IARC	–	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	–	Valor médio (50%) de inibição de um composto
IL-1	–	Interleucina-1
IL-6	–	Interleucina-6
IL-10	–	Interleucina-10
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
LNCap	–	linhagem celular humana de câncer de próstata
log	–	logaritmo (base 10)
MAPK	–	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCF7	–	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	–	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
mg/mL	–	Miligramma por mililitro
MHH-ES-1	–	Linhagem celular de Sarcoma de Ewing
MMPs	–	Metaloproteinases
MT-3	–	Linhagem celular humana de câncer de mama
MTT	–	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mRNA	–	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
NaCl	–	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	–	Bicarbonato de sódio
NF- κ B	–	Fator nuclear kappa B
Nm	–	nanômetro
NO	–	Óxido nítrico
PBS	–	Tampão fosfato-salino
PC-3	–	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata
p53	–	Proteína citoplasmática envolvida na morte celular
pH	–	Potencial hidrogeniônico

PI3K/AKT	–	Fosfatidil-inositol-3-quinase / Proteína quinase B
PI3/mTOR	–	Fosfatidil-inositol-3-quinase / Alvo da rapamicina em mamíferos
PR	–	Receptor de progesterona
PSA	–	Antígeno prostático específico
ROS	–	Espécie reativa de oxigênio
RT4	–	Linhagem de câncer de bexiga de grau I
RPM	–	Rotações por minuto
SDS	–	Dodecil sulfato de sódio
SI	–	Índice de Seletividade
SK-N-BE	–	Linhagem celular humana de neuroblastoma
Sp1	–	Fator de transcrição humano Sp1
STAT3	–	Ativador de transcrição 3
T24	–	Linhagem celular humana de câncer de bexiga
TBS/T	–	Solução salina tris-tamponada
TGF α	–	Fator de crescimento transformante α
TIMP-2	–	Inibidor tecidual de metaloproteinases 2
TNF / TNF α	–	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	–	Proteína vascular de adesão celular 1
v/v	–	Concentração volume / volume
VEGF	–	Fator de crescimento endotelial vascular
Walker-256	–	Linhagem de câncer de fígado
WHO	–	<i>World Health Organization</i>
WNT7B	–	Oncogene associado ao câncer de mama
XIAP	–	Cromossomo X ligado ao Inibidor de Apoptose (IAP)
YM-155	–	Brometo de sepantrônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Epidemiologia do câncer	27
2.2 Patologia do câncer	29
2.3 Linhagens de câncer selecionadas	33
2.3.1 Câncer de mama	33
2.3.2 Câncer de próstata	35
2.3.3 Câncer de fígado	36
2.4 Tratamentos e terapias convencionais no câncer	37
2.4.1 Mecanismos de resistência celular às terapias convencionais	38
2.4.1.1 Quimioterapia	38
2.4.1.2 Radioterapia	40
2.4.1.3 Imunoterapia	41
2.4.2 Tratamentos não convencionais	41
2.5 As plantas medicinais	43
2.5.1 Desenvolvimento de fitofármacos: um breve histórico	44
2.5.2 Os produtos naturais e o câncer	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Linhagens celulares	49
4.2 Cultura Celular	56
4.2.1 Preparação dos meios de cultura	56
4.2.2 Manutenção Celular	56
4.3 Extratos de Plantas	57
4.3.1 Preparações e diluições dos extratos	59
4.4 Método colorimétrico por MTT	59
4.5 Triagem dos extratos (citotoxicidade)	60
4.5.1 Curva-resposta	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Triagem dos resultados	63
5.2 Curvas-resposta e seletividade	73
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	103
REFERÊNCIAS	107
ANEXO I	117

1. INTRODUÇÃO

A Química Medicinal envolve aspectos biológicos, médicos e farmacêuticos baseados nos princípios da Química como forma de desenvolver compostos bioativos que, através de mecanismos biológicos, bioquímicos e farmacológicos, funcionam como terapias alternativas a tratamentos convencionais, muitas vezes invasivos ou ineficientes devido à resistência das doenças ou aos efeitos tóxicos e colaterais de seus tratamentos.

Dessa forma, a descoberta e desenvolvimento de novas substâncias com alta eficácia e baixa toxicidade é um desafio atual e um processo trivial para a Química Medicinal Moderna, uma vez que a produção de um novo fármaco é um processo longo e de alto custo.

Estudos envolvendo ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm sendo desenvolvidos com foco no tratamento de doenças como forma de minimizar essa problemática e prosperar nos ensaios pré-clínicos, principalmente as neoplasias devido à alta incidência e mortalidade e parasitoses que afetam países pobres e tropicais como malária, leishmaniose e doença de chagas, as quais são negligenciadas pelas indústrias e grandes centros de pesquisa.

Partindo desse princípio, o Grupo de Estudos em Química Medicinal – NEQUIMED – visa estudar essas doenças através da busca e estudo de alvos moleculares e da produção de novos candidatos a fármacos, focando principalmente em neoplasias e duas principais parasitoses que acometem o Brasil, a doença de Chagas e a Leishmaniose.

O processo da pesquisa com compostos bioativos envolve o estudo de diversas áreas e a contribuição de diversos tipos de profissionais de forma integrativa e multidisciplinar. Primeiramente, o protótipo é desenvolvido através do estudo do alvo terapêutico, seguido de um planejamento molecular como forma de otimizar e modelar estruturalmente uma molécula através de técnicas computacionais e, finalmente, a produção desse candidato respeitando sempre o seu mecanismo de ação e as relações entre estrutura química e atividade farmacológica. Após esse processo, os ensaios biológicos são, então, desenvolvidos como forma de relacionar os ensaios químicos e enzimáticos à real atividade

biológica (*in vitro* e/ou *in vivo*) desses compostos, onde diversos tipos de ensaios vão mostrar não só a eficácia desse novo candidato como também a toxicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia do câncer

O documento *World Cancer Report* é um relatório importante que fornece dados do GLOBOCAN, uma base de dados internacional sobre epidemiologia descritiva da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer – IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) – a estimativa mais recente a respeito da distribuição do câncer em todo o mundo (STEWART et al., 2014). Segundo esse relatório, o câncer está entre as principais causas de morte, representando uma em cada seis mortes em todo o mundo (STEWART et al., 2014). Somente em 2012, houve 14,1 milhões de novos casos registrados, onde o número de mortes relacionadas ao câncer foi de aproximadamente 8,2 milhões, representando 13% de mortes em todo o globo (STEWART et al., 2014). Previsões estatísticas indicam que o número de novos casos de câncer poderá aumentar para até 22 milhões nas próximas duas décadas, aumentando também o número de mortes (STEWART et al., 2014).

As tabelas 1 e 2 mostram as estatísticas dos principais tipos de câncer (exceto o câncer de pele tipo não-melanoma) em ambos os sexos, em homens e em mulheres, de acordo com a sua incidência e mortalidade, respectivamente.

Tabela 1. Estimativa das proporções mundiais dos principais tipos de câncer (exceto o câncer de pele tipo não-melanoma) de acordo com sua incidência, em ambos os sexos, em homens e em mulheres, 2012*

Ambos os sexos			Homens			Mulheres		
Pulmão	1.824.701	13,0%	Pulmão	1.241.601	16,7%	Mama	1.676.633	25,2%
Mama	1.676.633	11,9%	Próstata	1.111.689	11,9%	Colorretal	614.304	9,2%
Colorretal	1.360.602	9,7%	Colorretal	746.298	10,0%	Pulmão	583.100	8,7%
Próstata	1.111.689	7,9%	Estômago	631.293	8,5%	Colo Uterino	527.624	7,9%
Estômago	951.594	6,8%	Fígado	554.369	7,5%	Estômago	320.301	4,8%
Fígado	782.451	5,6%	Bexiga	330.380	4,4%	Endométrio	319.905	4,8%

Fonte: Adaptado de Stewart et al. (2014)

Tabela 2. Estimativa das proporções mundiais dos principais tipos de câncer (exceto o câncer de pele tipo não-melanoma) de acordo com sua mortalidade, em ambos os sexos, em homens e em mulheres, 2012*

Ambos os sexos			Homens			Mulheres		
Pulmão	1.589.800	19,4%	Pulmão	1.098.606	23,6%	Mama	521.817	14,7%
Fígado	745.517	9,1%	Fígado	521.031	11,2%	Pulmão	491.194	13,8%
Estômago	723.027	8,6%	Estômago	468.931	10,1%	Colorretal	320.250	9,0%
Colorretal	693.881	8,5%	Colorretal	373.631	8,0%	Endométrio	265.653	7,5%
Mama	521.587	6,4%	Próstata	307.471	6,6%	Estômago	254.096	7,2%
Esôfago	400.156	4,9%	Esôfago	281.212	6,1%	Fígado	224.486	6,3%

Fonte: Adaptado de Stewart et al. (2014)

Em relação ao Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA, a estimativa de novos casos de câncer em 2016 foi de 596 mil novos casos (BRASIL, 2015a). O tipo mais incidente foi o câncer de pele não melanoma para ambos os sexos. Nos homens, os principais tipos, em ordem decrescente, foram: câncer de próstata, vias aéreas (traqueia, brônquio e pulmão), cólon e reto, estômago e cavidade oral. Nas mulheres, também em ordem decrescente, os principais tipos foram: câncer de mama, cólon e reto, colo uterino, vias aéreas (traqueia, brônquio e pulmão) e estômago (BRASIL, 2015a) – ver Figura 1.

Figura 1. Estimativa de novos casos de câncer no Brasil em 2016*

Fonte: Adaptado de Brasil (2015a)

2.2 Patologia do câncer

As neoplasias, tanto benignas quanto malignas, são caracterizadas como uma massa anormal de células, resultante de uma proliferação excessiva, persistente e descontrolada (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

As neoplasias benignas são caracterizadas por serem, em sua maioria, mais delimitadas, de crescimento lento e apresentarem células semelhantes à dos tecidos normais. Além disso, não possuem a capacidade de se espalhar para outros tecidos e órgãos e, geralmente, não reincidem após serem retiradas (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

As neoplasias malignas, também conhecidas como câncer, são formadas quando células anormais se desenvolvem fora de sua homeostasia tornando-se imortalizadas, onde, através de mecanismos biológicos específicos e complexos, ocorre não só a sobrevivência e crescimento dessas células, mas também a colonização de outros tecidos com o auxílio dos sistemas sanguíneo e linfático (ALBERTS et al., 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, comparando com as neoplasias benignas, as células neoplásicas malignas apresentam um crescimento celular rápido, são metastáticas (invasivas) e indiferenciadas (ALBERTS et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

O desenvolvimento de um câncer pode ocorrer em qualquer região do corpo humano e seu desenvolvimento varia de acordo com a complexidade da doença e uma série de fatores internos e externos que, interligados, podem contribuir para as etapas de formação das neoplasias. Dentre todos os fatores, os principais são: idade avançada; abuso de álcool e tabaco; contato com determinadas substâncias químicas e radiação; fatores genéticos, como mutações genéticas herdadas e/ou adquiridas; estilo de vida, como uma dieta pobre em nutrientes, obesidade e sedentarismo; contato com agentes infecciosos, como bactérias, vírus e toxinas de fungos; exposição à luz solar e/ou artificial; entre outros fatores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

As etapas de formação do câncer envolvem três principais acontecimentos: a iniciação, a promoção e a progressão tumoral, demonstrados na Figura 2

(HANAHAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. Etapas da formação das neoplasias

Fonte: Adaptado de Servier (2018).

Primeiramente, na iniciação, as células sadias são estimuladas, em sua maioria, por fatores externos, como radiação, substâncias químicas e vírus. Essa exposição, em longo prazo, pode promover danos no DNA dessas células que acumulam mutações e transformam-se em células anormais. Essa replicação monoclonal de células anormais levam a formação da neoplasia primária no tecido originário (neoplasia *in situ*). Após sucessivas etapas de divisão celular e o acúmulo de alterações genéticas, essas células neoplásicas mudam suas características, aumentando seu potencial invasivo e promovendo a metástase – formação de neoplasias secundárias fora de seu local de origem (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011)

As metástases (Figura 3) ocorrem através da liberação de fatores angiogênicos, da formação de metaloproteinases (MMPs) – responsáveis pela degradação da matriz extracelular, além do recrutamento de diversos outros constituintes celulares que em conjunto formam o microambiente tumoral contribuindo cada vez mais para a formação de neoplasias maiores, malignas e

metastáticas (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Figura 3. Processo de formação de metástases

A formação de metástases é um processo muito complexo e requer a sucessão de diversos eventos biológicos nas células: **(A)** invasão através da degradação da matriz extracelular; **(B)** alcance dos vasos sanguíneos; **(C)** permanência e transporte na corrente sanguínea; **(D)** instalação em tecidos distantes do originário **(E)** sobrevivência nesse novo ambiente e **(F)** reinício da proliferação e sobrevivência celular no local metastático, processo conhecido como cascata de invasão-metástase.

Fonte: Adaptado de Valastyan e Weinberg (2011)

As células neoplásicas residem em um microambiente complexo (Figura 4) contendo várias células de suporte, matriz extracelular (MEC) e um conjunto de moléculas de sinalização. Esses componentes ambientais contribuem coletivamente para a interação entre a neoplasia e o estroma, além da progressão tumoral (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Como já mencionado, as neoplasias são compostas por tecidos complexos compostos por múltiplos tipos de células distintas que participam ativamente no processo de carcinogênese através de interações heterotípicas entre si (PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Essas interações, além de uma grande variedade genética, fazem com que as neoplasias

sejam sempre distintas entre si (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

O processo de transformação celular de uma célula normal para uma célula maligna envolve uma série de mudanças epigenéticas por três principais processos: a ativação de proto-oncogenes aumentando a expressão de moléculas proliferativas (crescimento e divisão celular); a inativação e/ou diminuição da expressão de moléculas que atuam em genes supressores de tumor aumentando a probabilidade de formação de uma neoplasia; e/ou ainda a inativação ou diminuição de moléculas que atuam nos genes de reparo do DNA fazendo com que danos moleculares sejam sucedidos (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Figura 4. Microambiente tumoral e seus constituintes

Fonte: Pattabiraman e Weinberg (2014)

Apesar da heterogeneidade do câncer, durante o desenvolvimento das neoplasias alguns mecanismos biomoleculares são comuns a todos os tipos de câncer garantindo o desenvolvimento da doença (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). São eles:

- A)** Manutenção da sinalização proliferativa;
- B)** Evasão dos supressores de crescimento;
- C)** Resistência à morte celular por apoptose;

- D) Ativação da imortalidade replicativa;
- E) Indução da angiogênese;
- F) Ativação do processo de invasão e, conseqüentemente, formação de metástases;
- G) Reprogramação do metabolismo energético;
- H) Evasão do sistema imune.

2.3 Linhagens de câncer selecionadas

O mecanismo de resistência celular, explicado em detalhes posteriormente, resulta na morte parcial do número de células cancerígenas, contribuindo para a resistência celular e, conseqüentemente, o aumento da taxa de mortalidade e/ou reincidência de neoplasias.

Devido às suas taxas de incidência e/ou mortalidade (STEWART et al., 2014), três principais órgãos atingidos pelo câncer foram escolhidos, de acordo com as linhagens celulares disponíveis no laboratório, para esse presente estudo, dentre elas duas linhagens celulares de câncer de mama, duas linhagens celulares de câncer de próstata e uma linhagem celular de câncer de fígado.

O câncer de fígado, principalmente de origem primária, é muito agressivo e de difícil diagnóstico sendo responsável por uma alta taxa de mortalidade. O câncer de mama, assim como o câncer de próstata, apresenta uma alta taxa de incidência podendo não só resistir, mas também reincidir após cinco anos, representando um número elevado de mortes em todo o mundo (STEWART et al., 2014).

2.3.1 Câncer de mama

A mama é um órgão glandular par, situada na parede anterior do tórax, na porção superior, onde encontra-se apoiada sobre o músculo peitoral, se estendendo da segunda à sexta costela no plano vertical. Sua estrutura é composta por lobos (glândulas produtoras de leite), por ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e por estroma, um tecido adiposo e conjuntivo que preenche o órgão envolvendo os dutos e lobos, além de vasos sanguíneos e linfáticos (BRASIL, 2014a).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete e mata mulheres no Brasil (BRASIL, 2014b; 2015a) e no mundo (STEWART et al., 2014) após o câncer de pele, representando de 25 a 30% de novos casos por ano no Brasil.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de mortes devido ao câncer de mama em 2013 foi de 14.388 casos (BRASIL, 2014b ; BRITT; ASHWORTH; SMALLEY, 2007). A incidência do câncer de mama aumenta, principalmente, a partir dos 35 anos de idade, onde o risco de desenvolver a neoplasia aumenta progressivamente desde então, sendo majoritariamente frequente após os 50 anos, devido à menopausa (BRASIL, 2014b). Fatores como nuliparidade e primeira gravidez após os 35 anos (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; RUIZ et al., 2017), reposição hormonal por mais de 5 anos (BRASIL, 2014b), sedentarismo, obesidade e sobrepeso (BRASIL, 2014b) além de um histórico familiar de câncer nos órgãos genitais femininos podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento da doença (BRASIL, 2014b).

O diagnóstico da doença é feito, principalmente, através do exame de toque, mas também por mamografia (radiografia da mama), onde quaisquer alterações morfofisiológicas de cor e textura, além da presença de caroços na mama, devem ser notados, uma vez que um prognóstico precoce reduz a mortalidade e melhora a resposta da paciente ao tratamento recebido (BRASIL, 2014b; U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018). Os tratamentos convencionais indicados incluem radioterapia, quimioterapia e a mastectomia (cirurgia de retirada parcial ou total da mama) (BRASIL, 2014a).

As linhagens celulares de câncer de mama selecionadas para este trabalho, MCF7 e MDA-MB-231, estão entre as mais utilizadas nos ensaios *in vitro* (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; MILANEZI; CARVALHO; SCHMITT, 2008).

As células da linhagem MCF7 expressam receptores de estrógeno (ER+) e progesterona (PR+), porém não expressam em excesso receptores do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2- /+). Isso implica em uma melhor resposta à terapia hormonal, uma vez que apresentam dependência em relação aos receptores estrógeno e progesterona, tendo sua replicação ativada por estas vias. Já as células da linhagem MDA-MB-231 apresentam-se como triplo negativas, isto é, não expressam receptores de estrógeno (ER-), receptores de progesterona (PR) ou receptores do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2-), apresentando um crescimento acelerado e maior resistência às terapias

convencionais, uma vez que não apresentam um alvo molecular específico. Devido às diferenças apresentadas, as duas linhagens são comumente utilizadas em ensaios de triagem em conjunto para observar a bioatividade de substâncias (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; MILANEZI; CARVALHO; SCHMITT, 2008).

2.3.2 Câncer de próstata

A próstata é um órgão glandular pequeno presente apenas nos homens. Localizada logo abaixo da bexiga e envolvendo a porção inicial da uretra, a próstata secreta cerca de 60% do fluido seminal. Esse líquido é eliminado no interior da uretra durante a ejaculação para ajudar a neutralizar os fluidos ácidos na uretra masculina e na vagina feminina. Essa função é importante, porque os ácidos podem ter um efeito adverso sobre os espermatozoides e, em concentrações mais elevadas, podem destruí-los (BRASIL, 2017a; U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018).

O câncer de próstata, após o câncer de pele, é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens no Brasil (BRASIL, 2015a; 2017a) e no mundo (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; STEWART et al., 2014). Em relação à mortalidade, considerando apenas o sexo masculino, é o quinto tipo de câncer que mais mata no mundo (STEWART et al., 2014). Segundo o INCA, o número de mortes devido ao câncer de próstata em 2013 foi de 13.772 casos (BRASIL, 2017a).

Assim como no câncer de mama, cerca de três quartos dos casos de câncer de próstata no mundo ocorrem a partir da terceira idade (65 anos), sendo a faixa etária avançada um fator de risco. Outros fatores como obesidade e dieta irregular, histórico familiar, andropausa, sedentarismo, inflamação na próstata e doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem aumentar a chance de desenvolvimento da doença (BRASIL, 2017a; MARKOZANNES et al., 2016; PUHR et al., 2016).

O diagnóstico da doença é feito, principalmente, através do exame de toque retal ou ultrassom transretal, mas também pode ser feito através de ressonância magnética ou pelo teste de dosagem do PSA (antígeno prostático específico) no sangue, um antígeno produzido em maior quantidade quando o paciente apresenta câncer de próstata (BRASIL, 2017a; U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018). A partir da detecção da neoplasia, os tratamentos convencionais indicados

são: a radioterapia, a prostatectomia (cirurgia de retirada parcial ou total da próstata), a quimioterapia e tratamentos hormonais, quando necessário (BRASIL, 2017a).

Existem diversas linhagens celulares de câncer de próstata que podem ser utilizadas para analisar o perfil biológico de substâncias e extratos bioativos. Para este trabalho, duas linhagens celulares frequentemente utilizadas no estudo do câncer foram selecionadas, DU 145 e PC-3, ambas hormônio independentes e de morfologias diferentes (CUNNINGHAM; YOU, 2015).

2.3.3 Câncer de fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano de função glandular, tanto endócrina quanto exócrina. Encontra-se localizado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma (JUZA; PAULI, 2014; BRASIL, 2017b).

O fígado é um órgão fundamental na coordenação do metabolismo e fisiologia do organismo, desempenhando diversas funções regulatórias, entre elas as principais: **A)** síntese, armazenamento e quebra de glicogênio; **B)** emulsificação de gorduras no processo digestivo, através da produção e secreção da bile; **C)** síntese do colesterol; **D)** biotransformação de compostos como hormônios, metabólitos, toxinas e outras substâncias nocivas; **E)** síntese de fatores de coagulação sanguínea; **F)** lipogênese; **G)** armazenamento de algumas vitaminas e minerais; **H)** manutenção da osmolaridade do sangue, através da síntese de albumina; **I)** controle da pressão sanguínea através da produção de angiotensinogênicos (JUZA; PAULI, 2014; BRASIL, 2017b).

O câncer de fígado de origem primária (a partir do próprio órgão), conhecido como carcinoma hepatocelular é o tipo mais agressivo e frequente, ocorrendo em 80% dos casos (BRASIL, 2017b; U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018).

No mundo, o câncer de fígado é o sexto tipo mais comum em incidência e o segundo em número de mortes. Os principais hábitos e fatores que podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento da doença seriam: abuso do tabaco, abuso da ingestão alcoólica (com evolução para cirrose ou não), infecções por hepatite B e C, alguns tipos de doenças (esquistossomose, helmintíases), infecção alimentar em resposta às toxinas liberadas por microrganismos, principalmente fungos (aflatoxinas e fumonisinas), e o contato com substâncias químicas carcinogênicas (CHEN et al.,

2015; CHUANG; LA VECCHIA; BOFFETTA, 2009; PERZ et al., 2006; WOGAN; KENSLER; GROOPMAN, 2012).

O tratamento mais indicado é a remoção cirúrgica do câncer por ressecção quando a neoplasia está restrita (nos casos de carcinomas primários). Caso contrário, o tratamento indicado é quimioterapia e/ou radioterapia (BRASIL, 2017b).

A linhagem celular selecionada para esse trabalho (HepG2), uma das mais utilizadas atualmente em pesquisas, é proveniente de um carcinoma hepatocelular e apresenta alta correlação com neoplasias retiradas de pacientes em relação a expressão genética (CHEN et al., 2015; XIA et al., 2013), ou seja, grande parte das funções celulares presentes nessa linhagem são semelhantes às dos hepatócitos normais, como a expressão de receptores de superfície celular específicos de hepatócitos e síntese e secreção de proteínas plasmáticas, além de um alto grau de diferenciação morfológica (CHEN et al., 2015; XIA et al., 2013).

2.4 Tratamentos e terapias convencionais no câncer

Por ser uma doença bastante complexa e diversa, o câncer pode atingir diversos tipos de órgãos e tecidos por todo o corpo humano. Logo, o emprego de um ou mais tratamentos varia muito de acordo com o tipo e localização da neoplasia desenvolvida, seu estágio de desenvolvimento, da resposta das células neoplásicas e do organismo ao tratamento, incluindo desde a diminuição da neoplasia até efeitos colaterais do paciente (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015).

Atualmente, os principais tratamentos convencionais utilizados incluem: **A)** cirurgia para remoção total ou parcial do órgão ou tecido afetado (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015); **B)** radioterapia, onde altas doses de radiação auxiliam na indução da morte de células neoplásicas com redução do tamanho de neoplasias, podendo ser indicada antes da cirurgia (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015); **C)** quimioterapia, onde o uso de fármacos combinados atinge as células neoplásicas induzindo sua morte (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015); **D)** imunoterapia, um tipo de tratamento que promove a estimulação do sistema imunológico através do uso de substâncias modificadoras da resposta biológica (U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015); **E)** terapia hormonal, onde através

da supressão ou aumento dos níveis de hormônios circulantes controla a concentração desses hormônios em neoplasias hormoniossensíveis (BRASIL, 2017c; U.S.NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018; PADMA, 2015).

2.4.1 Mecanismos de resistência celular às terapias convencionais

As células neoplásicas apresentam uma heterogeneidade em resposta as terapias antineoplásicas, respondendo sempre de maneira própria e diferenciada. Isso ocorre porque cada célula neoplásica de um dado paciente possui uma composição genética diferente dependendo não somente do tecido de origem, mas, também, do padrão de ativação de oncogenes e inativação de supressores tumorais (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; GOTTESMAN, 2002; WU et al., 2014). Esse padrão vai variar de acordo com o início da carcinogênese, onde as células neoplásicas transportam as mutações nesses genes, os quais serão expressos de forma aleatória. Como resultado, cada tipo de neoplasia expressa uma variedade diferente de genes resistentes aos tratamentos. Além disso, mesmo que as neoplasias não sejam intrinsecamente resistentes a um tratamento antineoplásico específico, essa heterogeneidade genética e epigenética em contraste com a seleção imposta por potentes agentes antineoplásicos resulta em um crescimento excessivo de variantes resistentes (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; GOTTESMAN, 2002; WU et al., 2014).

De fato, a resistência é intrínseca ao câncer, devido aos seus mecanismos comuns como: proliferação independente de sinais ambientais; evasão de supressores de crescimento; indução da angiogênese; potencial replicativo descontrolado; e resistência à morte celular. Esses mecanismos comuns, somados a mecanismos específicos, podem tornar-se cada vez mais eficazes evoluindo para uma resistência adquirida (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; GOTTESMAN, 2002; WU et al., 2014).

2.4.1.1 Quimioterapia

Em relação aos quimioterápicos, a resistência tumoral ao tratamento quimioterapêutico resulta de uma variedade de fatores, incluindo duas causas gerais: fatores intrínsecos do hospedeiro e alterações genéticas específicas das

células neoplásicas. Esses fatores podem incluir (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014):

- A)** Má absorção, metabolismo acelerado ou excreção da substância antineoplásica, resultando em baixos níveis séricos;
- B)** Má tolerância aos efeitos da substância antineoplásica, especialmente em pacientes idosos, resultando em uma necessidade de reduzir a dose abaixo dos níveis ótimos;
- C)** Incapacidade de administrar uma substância antineoplásica direcionada ao local específico da neoplasia, como poderia ocorrer com neoplasias volumosas ou com agentes biológicos de alto peso molecular e baixa penetração tecidual, como anticorpos monoclonais e imunotoxinas;
- D)** Fatores presentes no microambiente tumoral e organismo do hospedeiro que podem afetar a resposta da neoplasia, incluindo o metabolismo local da substância antineoplásica por células não neoplásicas, características incomuns do suprimento de sangue na neoplasia afetando o tempo de trânsito dessa substância dentro das neoplasias e a forma como as células neoplásicas interagem entre si e com células normais do hospedeiro.

Um mecanismo conhecido de resistência aos fármacos se faz pela expressão de um ou mais transportadores dependentes de energia, principalmente do tipo ABC, responsáveis por detectar e expulsar quimioterápicos das células. Além dos mecanismos de transporte, a insensibilidade das células neoplásicas em resposta à apoptose induzida pelos tratamentos antineoplásicos e a indução de mecanismos de desintoxicação do organismo pelas células neoplásicas, também desempenham um importante papel na resistência contra as neoplasias (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014; GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014). A Figura 5. demonstra bem os mecanismos envolvidos nesse processo de resistência em cultura celulares (GOTTESMAN, 2002).

Figura 5. Principais mecanismos de resistência de células neoplásicas às terapias convencionais

Fonte: Adaptado de Gottesman et al. (2002)

2.4.1.2 Radioterapia

A radioterapia fornece a entrega direcionada de doses de radiação à neoplasia de forma precisa, enquanto poupa seus tecidos circundantes, porém, infelizmente, uma recorrência da neoplasia após esse tratamento é comum e muitas causas podem estar relacionadas a isso, incluindo a formação de metástases, hipóxia, repovoamento por células sobreviventes durante o tratamento e resistência celular à radiação (GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014).

Existem quatro fatores gerais que determinam um resultado clínico ineficiente ao tratamento por radioterapia, são eles: **A)** reparação de danos causados ao DNA; **B)** redistribuição de células no ciclo celular; **C)** repovoamento; e **D)** reoxigenação de regiões neoplásicas hipóxicas (GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014).

As enzimas de reparo do DNA e as proteínas antiapoptóticas são expressas em níveis elevados em células neoplásicas resistentes à radioterapia, dessa forma, após o tratamento algumas células persistentes se tornam mais agressivas. Outro efeito observado é que a radiação ionizante estimula um fenótipo adaptativo conhecido como estresse e resposta de recuperação ao dano do DNA gerando um comportamento metastático (GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014).

2.4.1.3 Imunoterapia

A imunoterapia utiliza a resposta imune antineoplásica ou componentes do sistema imunológico como forma de afetar o desenvolvimento do câncer. Entre os produtos imunoterápicos empregados podemos incluir citocinas, anticorpos monoclonais e anticorpos imunomarcados, além de imunotoxinas. Para que ocorra a evasão do sistema imune, as células neoplásicas reduzem a expressão de antígenos tumorais, o que leva à inibição de linfócitos ativados e, consequentemente, a resistência à apoptose mediada pelo sistema imune efetor. Além disso, a expressão alterada do transportador de membrana em células neoplásicas faz com que a apresentação de antígenos seja reduzida (GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014).

Por fim, algumas neoplasias ainda são capazes de escapar da morte celular programada tornando-se insensíveis aos sinais apoptóticos derivados do sistema imunológico celular (GOTTESMAN, 2002; MOLNÁR et al., 2010; WU et al., 2014).

2.4.2 Tratamentos não convencionais

A dificuldade em estabelecer um tratamento para uma linhagem específica de câncer sem comprometer os demais tecidos saudáveis somado aos mecanismos de resistência celular ainda são os principais impasses médicos e científicos na aplicação dos tratamentos convencionais. Dessa forma, terapias não convencionais mais modernas e menos invasivas estão sendo estudadas e desenvolvidas por pesquisadores e indústrias como alternativas no intuito de direcionar ou isolar o tratamento apenas para a neoplasia. É o caso da terapia gênica, da terapia fotodinâmica e do estudo de alvos moleculares (KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; ASHRAFI HAFEZ, 2016; SILVA; MATTE; GIUGLIANI, 2001).

A terapia gênica é o tratamento baseado na inserção de genes saudáveis com o uso de técnicas de DNA recombinante, o qual é introduzido no organismo através de um vetor, geralmente um vírus ou plasmídeo. A ideia é suplementar com alelos funcionais aqueles que são defeituosos ou deletados (KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; ASHRAFI HAFEZ, 2016; SILVA; MATTE; GIUGLIANI, 2001).

No caso do câncer, geralmente, é utilizado um vírus específico, o adenovírus, o qual possui material genético na forma de dupla-hélice que ao infectar o seu

hospedeiro introduz sua molécula de DNA. Essa molécula, por sua vez, não é incorporada ao material genético da célula hospedeira, ficando livre no seu núcleo sendo transcrito, porém nunca replicado durante a divisão celular causando, assim, um sinal para essas células produzidas que são induzidas à morte celular (KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; ASHRAFI HAFEZ, 2016; SILVA; MATTE; GIUGLIANI, 2001). Outra possibilidade seria a inserção de genes no DNA humano, através de um vetor diferente, que se reproduz em células neoplásicas ou que codifica uma proteína exógena fazendo com que o organismo passe a produzi-la permanentemente. Em ambos os casos, o resultado é o recrutamento do sistema imunológico que através de sinais ou estímulos passa a atacar as células neoplásicas causando sua morte seletiva (KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; ASHRAFI HAFEZ, 2016; SILVA; MATTE; GIUGLIANI, 2001).

A terapia fotodinâmica consiste em excitar fotossensibilizadores que na presença do oxigênio tecidual vão produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais são capazes de provocar morte celular (por necrose e apoptose), destruição da vasculatura tumoral e ativação de processos inflamatórios (melhora no sistema imune), uma vez que células neoplásicas tem a propriedade de inibir a morte celular, estimular a angiogênese e mascarar o sistema imune. A substância fotossensível é aplicada via tópica, oral ou endovenosa e apresenta a propriedade de se acumular nas células malignas. Com a irradiação, através de uma fonte de luz visível no local da neoplasia e a presença de oxigênio nos tecidos uma reação físico-química é desencadeada, onde os fotossensibilizadores em estado fundamental ficam em um estado excitado sendo capazes de destruir apenas as células neoplásicas (AGOSTINIS et al., 2011; CALIXTO et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2009; MENEZES et al., 2007).

Além das terapias já mencionadas, o planejamento de novas substâncias bioativas e o estudo de mecanismos moleculares, como morte celular (apoptose/autofagia) e ciclo celular, e seus componentes celulares, como genes, proteínas e anticorpos, se configuram como alvos em potencial para uso terapêutico da proliferação e morte celular programada no estudo dos mecanismos de resistência aos tratamentos (DEBATIN, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2013; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2008). O aumento de interesse nesses compostos que modificam processos biomoleculares é constatado a partir da análise do número de novos estudos pré-clínicos e clínicos em terapia combinada com outras classes de

compostos e tipos de tratamentos (DEBATIN, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2013; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2008).

Nesse contexto, os produtos naturais, seja na forma isolada ou na forma de extratos, apresentam grande relevância para o estudo de substâncias antineoplásicas, conforme atestam alguns medicamentos de procedência vegetal ou inspirados em suas moléculas. Entretanto, os extratos de plantas medicinais apresentam atividades biológicas bem mais complexas e acentuadas quando comparados com seus constituintes isolados, devido às interações sinérgicas entre seus componentes químicos que, em uma única formulação, podem atuar em múltiplos alvos celulares, sendo estudados em doenças complexas como o câncer e seus diversos tipos (CASANOVA; COSTA, 2017; CRAGG; NEWMAN, 2013; DEBATIN, 2004; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2008; PRAKASH et al., 2013; YUNES; CALIXTO, 2001). Além disso, a atuação simultânea em diversos alvos garante uma melhor eficácia do tratamento e menor probabilidade de resistência tumoral. Uma forma capaz de melhorar ainda mais o potencial terapêutico dos produtos naturais seria a combinação desses com quimioterápicos já estabelecidos e/ou novos fármacos sintéticos (CASANOVA; COSTA, 2017; CRAGG; NEWMAN, 2013; DEBATIN, 2004; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2008; PRAKASH et al., 2013; YUNES; CALIXTO, 2001).

2.5 As plantas medicinais

Os produtos naturais desde a sua história até os tempos atuais têm sido de extrema importância no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos e tratamentos terapêuticos. Eles vêm sendo descritos desde os tempos remotos e envolvem tanto elementos da cultura oriental quanto ocidental. O ácido acetilsalicílico, por exemplo, é um exemplo de medicamento clássico da cultura ocidental, sendo descoberta e descrita desde o século V a.C. por Hipócrates até ser finalmente sintetizada em 1889. Em 1970, a Organização Mundial da Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa, aumentando ainda mais o interesse da indústria e pesquisadores pelos produtos naturais (PRAKASH et al., 2013; YUNES; CALIXTO, 2001).

Atualmente, os produtos naturais são responsáveis, de forma direta ou indireta, por cerca de 40% de todos os fármacos presentes na terapêutica moderna

e, se considerarmos apenas os antibióticos e antineoplásicos essa porcentagem aumenta para aproximadamente 70% (YUNES; CALIXTO, 2001).

Os avanços na Química Medicinal Moderna, durante os últimos anos, prometem tratar ainda mais – de forma mais eficiente, com recursos suficientes e em pouco tempo – muitas doenças que ainda não apresentam um tratamento adequado. Esses avanços se devem paralelamente aos avanços da biologia molecular, como o surgimento de alvos biológicos e mapeamento genético, avanços na química orgânica sintética e combinatória, técnicas de *screening* de alta escala, a bioinformática e biotecnologia recombinante moderna (YUNES; CALIXTO, 2001).

2.5.1 Desenvolvimento de fitofármacos: um breve histórico

A história do desenvolvimento dos fármacos a partir de plantas pode ser resumida em três principais períodos (YUNES; CALIXTO, 2001):

- A) Primeiro período (do ano de 1800 até 1900);
- B) Segundo período (do ano de 1900 até cerca de 1970/80);
- C) Terceiro período (entre 1970/80 até os dias atuais).

O primeiro período representa a junção da Química Orgânica Moderna e Bioquímica, no final do século XVIII e início do século XIX, nos estudos dos compostos ativos de plantas medicinais conhecidas e utilizadas pela sabedoria popular. Foi nesse período que foram descobertos diversos fármacos potentes e amplamente utilizados na terapêutica moderna como a morfina, a codeína, a efedrina, a quinina, a atropina, a emetina, entre outros (YUNES; CALIXTO, 2001).

Um caso clássico é a planta *Salix alba* usada desde a Antiguidade, mas somente estudada de forma rigorosa e científica em 1763 pelo reverendo E. Stone. Em 1828, Buchner isolou a salicina dessa planta e, em 1860, Kolbe e Lauteman sintetizaram o ácido salicílico e seu sal sódico dando início a produção e salicatos em 1874. Por fim, Felix Hofman, em 1898, sintetizou um composto de caráter menos ácido descobrindo, então, o ácido acetil salicílico (AAS) utilizado de forma tão extensa atualmente (YUNES; CALIXTO, 2001).

De forma resumida, o primeiro período foi um período de integração entre a Química Medicinal e a Fitoquímica, além da Fisiologia e Patologia, na procura de

princípios ativos apenas com a utilização de plantas consagradas na medicina popular (YUNES; CALIXTO, 2001).

O segundo período envolve, após o surgimento do AAS, a síntese de novos fármacos de origem sintética derivados de plantas como a amilocaína e a procaína. Em termos gerais, as sínteses passaram a ser realizadas, em sua maioria, ao acaso. Os principais antibióticos de importância médica surgem nessa época tendo como exemplo a penicilina (1939), a actinomicina (1940), a estreptomicina e bacitracina (1943), o cloranfenicol (1947), a neomicina (1949), entre outros (YUNES; CALIXTO, 2001).

O último período, envolvendo a década de 70/80 e os dias atuais, engloba as novas metodologias para obtenção de fármacos e que, hoje, fazem parte da Química Medicinal Moderna. Essas técnicas envolvem avanços na biologia molecular e genética, como identificação e estudo de proteínas (enzimas, receptores e canais iônicos) que envolvem processos patológicos e, por isso, são importantes alvos moleculares para a pesquisa de fármacos (YUNES; CALIXTO, 2001).

A utilização de alvos moleculares permitiu a montagem de sistemas eficientes de *screening* de milhares de compostos otimizando a pesquisa. A Engenharia Genética é uma Ciência Moderna que teve início, com as técnicas de DNA recombinante, entre 1973 e 1975. Esse tipo de técnica permitiu a obtenção de peptídeos e proteínas de importância médica como a insulina, por exemplo (YUNES; CALIXTO, 2001).

Outro método moderno que iniciou de forma experimental e hoje é um importante método na pesquisa de fármacos é a química combinatória, onde reações são realizadas por muitas etapas sintéticas em paralelo ou em misturas permitindo uma grande obtenção de produtos com uma pouca quantidade de reagentes (YUNES; CALIXTO, 2001).

Paralelamente à essas metodologias, a química computacional teve grandes avanços permitindo a modelagem de estruturas tridimensionalmente, no estudo de dados eletrônicos e estéricos da conformação bioativa das moléculas-fármacos criando assim um mapa farmacofórico do fármaco em estudo. Dessa forma é possível estudar a relação entre atividade e estrutura da bioatividade desses compostos (YUNES; CALIXTO, 2001).

2.5.2 Os produtos naturais e o câncer

Como mencionado anteriormente, foi a partir do terceiro período que a pesquisa com produtos naturais mais avançou, principalmente a partir do século XX, envolvendo primordialmente plantas e microrganismos, além de alguns organismos marinhos. Esse avanço, voltado à patologia do câncer, propiciou a descoberta de diversas substâncias bioativas atualmente empregadas na terapia antineoplásica (CASANOVA; COSTA, 2017; COSTA-LOTUFO et al., 2010; YUNES; CALIXTO, 2001).

Cerca de 60% dos fármacos antineoplásicos introduzidos no tratamento de neoplasias tem sua origem nos produtos naturais. Dentre eles, se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®). Além destes apresentados, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente envolvendo o estudo do câncer e de algumas doenças infecciosas (CASANOVA; COSTA, 2017; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Embora esses resultados sejam bastante significativos e de grande relevância no avanço das pesquisas, vários carcinomas sólidos ainda não apresentam um tratamento adequado. Os principais alvos terapêuticos desses fitoquímicos são seus efeitos na proliferação celular; na inibição da neovascularização tumoral; na indução da rediferenciação celular; e na morte celular por apoptose (CASANOVA; COSTA, 2017; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Fontes naturais ainda precisam ser exploradas, uma vez que estão disponíveis em abundância em alguns países, como, por exemplo, o Brasil, e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico, mostrando a importância dos produtos naturais no cenário da pesquisa (CASANOVA; COSTA, 2017; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Neste trabalho, foi utilizada uma série de extratos vegetais cedidos ao nosso laboratório pelo professor Prof. Dr. Fabio Macêdo Nunes (FTC – Faculdade de Tecnologia e Ciências – Salvador, Bahia), onde através de ensaios celulares foi feita uma caracterização do comportamento biológico desses compostos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa e citotóxica de extratos naturais com potencial bioativo em linhagens celulares humanas de câncer (mama, próstata e fígado) traçando um perfil biológico dos extratos a partir da seletividade de cada um em relação às linhagens testadas.

3.2 Específicos

- **Triagem dos extratos:** através do método colorimétrico por MTT avaliar a viabilidade dos 65 extratos de plantas testados, pré-selecionando aqueles de melhor perfil biológico;
- **Seleção dos extratos testados:** a partir dos resultados da triagem, avaliar, através de curvas concentração-resposta, os extratos pré-selecionados em relação à citotoxicidade e seletividade;
- **Traçar perfil biológico dos extratos:** a partir dos extratos selecionados, analisar quais apresentam melhor resposta e quantificar a seletividade dos mesmos comparando as linhagens de câncer com uma linhagem controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

- Tampão fosfato salino (PBS, em pó), antibiótico penicilina / estreptomicina e meios de cultura celular DMEM (meio Dulbecco MEM, em pó) e F12K (nutriente HAM F-12, em frasco de 500mL), adquiridos pela empresa Cultilab®;
- Soro fetal bovino (FBS) e solução 0,25% de tripsina com EDTA, adquiridos pela empresa Vitrocell®;
- D-glicose ($C_6H_{12}O_6$), Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$), dimetilsulfóxido (DMSO), dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido acético glacial 99,7% ($C_2H_4O_2$) e reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), adquiridos da Sigma-Aldrich®;
- Álcool etílico 70% (C_2H_6O) e água deionizada;
- Extratos de plantas (Tabela 3) cedidos pelo Prof. Dr. Fábio Macêdo Nunes (FTC – Faculdade de Tecnologia e Ciências – Salvador, Bahia);
- Micro balança Sartorius CPA26P (Sartorius®);
- Bancada de fluxo laminar vertical Pachane PCR (Pachane®);
- Sistema robotizado Microlab Nimbus Hamilton (Hamilton Company®);
- Leitor de microplacas multidetector BioTek™ Synergy HT (BioTek Instruments Inc.®).

4.1 Linhagens Celulares

Todas linhagens celulares usadas foram adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em nosso laboratório, mantidas em

uma estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Foram utilizadas linhagens de câncer de fígado (HepG2), de mama (MCF7 e MDA-MB-231) e de próstata (DU 145 e PC-3), além da linhagem de fibroblasto de camundongo (Balb/C 3T3 clone A31).

- **Balb/C 3T3 clone A31 (BCRJ code: 0047):** fibroblasto de camundongo* (*Mus musculus*), utilizada como controle nos experimentos por não apresentar nenhuma célula cancerígena. Indica a citotoxicidade do composto a uma célula normal (em homeostasia) em relação à uma célula cancerígena. São células sensíveis com inibição de contato elevada e por isso, necessitam ser transferidas rotineiramente apenas em diluições elevadas, caso contrário crescem em baixa densidade tornando-se mais suscetíveis a temperaturas sub-ótimas (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Dulbecco MEM – DMEM.

* As células de fibroblasto camundongo são bem estabelecidas nos testes *in vitro* e são bem semelhantes morfolologicamente a células de fibroblasto humanas. Além disso, mimetizam muito bem a próxima etapa que seriam os testes *in vivo* feitos em camundongos.

Figura 6. Linhagem de cultura celular Balb/C 3T3 clone A31

Fonte: ATCC (2016)

- **DU 145 (BCRJ code: 0078):** linhagem humana de câncer de próstata retirada a partir de uma metástase no cérebro. Apresenta morfologia epitelial com propriedade aderente e derivada de um tecido neoplásico removido da lesão metastática do sistema nervoso central de um homem de 69 anos com carcinoma de próstata em 1975. É uma linhagem não dependente de hormônio, sendo fracamente positiva para fosfatase ácida e sem a presença de 18 antígenos prostáticos específicos. Análises ultraestruturais da linhagem celular e da neoplasia original revelaram presença de microvilosidades, desmossomos, algumas mitocôndrias, Golgi bem desenvolvidos e lisossomos heterogêneos (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Dulbecco MEM – DMEM.

Figura 7. Linhagem de cultura celular DU 145

Fonte: ATCC (2016)

- **PC-3 (BCRJ code: 0269):** linhagem humana de câncer de próstata retirada a partir de uma metástase no osso. Apresenta morfologia epitelial com propriedade aderente e derivada de uma metástase óssea de um adenocarcinoma prostático de grau IV de um homem caucasiano de 62 anos. Assim como a linhagem DU 145, é uma linhagem não dependente de hormônio, apresentando baixa atividade de fosfatase ácida e 5-alfa-redutase (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Ham's F12K.

Figura 8. Linhagem de cultura celular PC-3

Fonte: ATCC (2016)

- **MCF7 (BCRJ code: 0162):** linhagem humana de câncer de mama retirada a partir de uma metástase pleural de um adenocarcinoma mamário de uma mulher caucasiana de 69 anos. Além de apresentar morfologia epitelial com propriedade aderente, a linhagem MCF7 apresenta características do epitélio mamário diferenciado como a capacidade de processar estradiol através de receptores citoplasmáticos de estrogênio (ER+). Essas células expressam o oncogene WNT7B. O crescimento de células MCF7 é inibido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Dulbecco MEM – DMEM.

Figura 9. Linhagem de cultura celular MCF7

Fonte: ATCC (2016)

- **MDA-MB-231 (BCRJ code: 0164):** linhagem humana de câncer de mama retirada a partir de uma metástase pleural de um adenocarcinoma mamário de uma mulher caucasiana de 51 anos. Apresenta morfologia epitelial com propriedade aderente. Diferentemente da linhagem MCF7, a linhagem MDA-MB-231 não é hormônio dependente (-ER), mas apresenta receptores EGF (fator de crescimento) e TGF α (fator de crescimento transformante alfa). Assim como MCF7 também apresenta o oncogene WNT7B (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Dulbecco MEM – DMEM.

Figura 10. Linhagem de cultura celular MDA-MB-231

Fonte: ATCC (2016)

- **Hep G2 (BCRJ code: 0103):** linhagem humana de hepatocarcinoma de fígado de um adolescente caucasiano de 15 anos. Apresenta morfologia epitelial com propriedade aderente. Essa linhagem celular expressa atividade de 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase ou HMGR) e lipase hepática (HTGL). A expressão de mRNA pode variar de acordo com o stress oxidativo da célula. Não existe evidência de um genoma do vírus da hepatite B para esta linhagem (CHEN et al., 2015). Para o cultivo dessas células foi utilizado o meio Dulbecco MEM – DMEM.

Figura 11. Linhagem de cultura celular Hep G2

Fonte: ATCC (2016)

4.2 Cultura Celular

Todas as linhagens trabalhadas foram cultivadas no laboratório de Ensaio Celulares (LabECel, parte do grupo NEQUIMED) e todos os ensaios realizados e equipamentos utilizados são pertencentes ao grupo de pesquisa NEQUIMED.

4.2.1 Preparação dos meios de cultura

Tanto o meio DMEM (suplementado com 3,5g glicose / 1,5g NaHCO_3), quanto o meio F12-K (suplementado com 1,5g NaHCO_3) foram preparados e complementados com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (v/v).

4.2.2 Manutenção Celular

Para a manutenção das culturas celulares, primeiramente é realizado o descongelamento celular das linhagens de interesse, seguido da manutenção das mesmas em frascos de cultura. A manutenção consiste em observar a morfologia celular das culturas em microscópio e realizar as trocas do meio de cultura celular, que ocorrem a cada 2 ou 3 dias. Quando a confluência celular atinge, em média, 80% do volume total do frasco, o processo de passagem é realizado, onde as células são distribuídas em novos frascos de cultura.

Durante a realização do descongelamento, as células congeladas na concentração de 1×10^6 células/mL e armazenadas a -80°C em tubos criogênicos de 1mL (com 90% de FBS e 10% de DMSO) são retiradas do freezer e rapidamente descongeladas em banho-maria à 37°C . Após o descongelamento total, o líquido do tubo criogênico é transferido a um tubo de centrífuga de 15mL, previamente contendo 9mL de meio de cultura, onde este é centrifugado por 5 minutos a 1400rpm. Em seguida, o sobrenadante é retirado sobrando um pouco de líquido e o *pellet* formado, os quais são, então, ressuspensos em meio de cultura, transferidos em um frasco de cultura celular e incubados para o crescimento em estufa úmida.

O procedimento de realização das passagens consiste em, primeiramente, retirar o meio de cultura do frasco celular (deixando sempre 1mL), seguido de uma lavagem com o auxílio de um tampão PBS, o qual é colocado e, logo em seguida,

retirado do frasco. Após a lavagem, a tripsina com EDTA é adicionada e incubada na estufa por 3 a 5 minutos, dependendo da linhagem. O frasco é retirado da estufa e observado em microscópio para conferir se as células estão totalmente desaderidas no frasco pelo efeito da tripsina. Após a confirmação é adicionado meio de cultura para inativação da tripsina e todo o conteúdo presente no frasco de cultura é transferido para um tubo de centrifuga e centrifugado durante 5 minutos a 1400rpm. O sobrenadante é retirado, com posterior adição de meio de cultura para ressuspender as células. Finalmente, o conteúdo presente é transferido ao frasco de cultura e incubado novamente em estufa à 37°C.

Para a realização dos ensaios celulares foram utilizadas placas de 96 poços com meio de cultura nas bordas (para evitar perda de conteúdo por evaporação) e nos 60 poços internos restantes as células foram pipetadas, com auxílio do sistema robótico, na concentração de 1×10^5 células/mL.

4.3 Extratos de plantas

Todos os extratos naturais utilizados foram recebidos, organizados, filtrados para esterilização e mantidos refrigerados a -20°C. O quadro 1. indica os extratos trabalhados, de acordo com suas siglas empregadas, o nome popular e o nome científico. Alguns extratos não apresentavam identificação de nome popular e/ou científico.

Quadro 1. Relação dos extratos de plantas trabalhados

SIGLA	NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO
A	Amora	<i>Morus sp</i>
AC	Aloe do Cabo	<i>Aloe ferox</i> Miller
AG	Agrião	<i>Nasturtium officinale</i>
AI	Alecrim Importado	<i>Rosmarinus officinalis</i>
AL	Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>
AM	Arnica	<i>Arnica Montana</i>
AN	Graviola	<i>Annona Muricata</i>
AS	Astragalus	<i>Astragalus membranaceus</i>
AT	Açafrão da terra	<i>Curcuma longa</i>

* Continuação na próxima página

AZ	Alfazema	<i>Lavandula angustifolia</i>
BJ	Benjoim	<i>Styrax benzoin</i>
C	Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>
CA	Centelha asiática	<i>Centella asiática</i>
CAS	Casca de anta	<i>Drimys winteri</i>
CC	Cacto	<i>Cactus sp</i>
CHI	Chia	<i>Salvia hispânica</i>
CI	Cravo da Índia	<i>Syzygium aromaticum</i>
CL	Clorela	<i>Chlorella sp</i>
CO	Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>
CP	Algodão de seda	<i>Calotropis procera</i>
CS	Cogumelo do Sol	<i>Agaricus blazei</i>
CU	Curry	<i>Murraya koenigii</i>
CV	Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>
EB	Erva de bugre	<i>Casearia sylvestris</i>
EG	Eucalipto comum	<i>Eucalyptus globulus</i>
EM	Estigmas de milho	<i>Zea mays</i>
EP	Purpúrea	<i>Echinacea purpúrea</i>
ES	Espinheira santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>
ESC	Erva de São Caetano	<i>Momordica charantia L.</i>
ET	Avelós	<i>Euphorbia tirucalli</i>
F	Fitolaca	<i>Phytolacca decandra</i>
FV	Fava do mar	<i>Fucus vesiculosus</i>
G	Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>
GA	Garcinia	<i>Garcinia cambogia</i>
GB	Ginko	<i>Ginkgo biloba</i>
GD	Garra de diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>
GG	Bacupari	<i>Garcinia gardneriana</i>
GI	Ginseng	<i>Panax sp</i>
H	Hibisco	<i>Hibiscus sp</i>
HP	Erva de São João	<i>Hypericum perforatum</i>
IR	Ipê roxo	<i>Tabebuia sp</i>
J	Jambolão	<i>Syzygium cumini</i>
JA	Janaúba	<i>Himatanthus obovatus</i>
JP	Jurema preta	<i>Mimosa tenuiflora</i>
JU	Júni-per	<i>Juniperus sp</i>
M	Murta	<i>Myrtus sp</i>
MF	Malva Folhas	<i>Malva sylvestris</i>
MI	Mirra	<i>Commiphora myrrha</i>

* Continuação na próxima página

MJ	Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i>
N	Nozes	<i>Juglans regia</i>
NO	Noni Fruto	<i>Morinda citrifolia</i>
PB	Pau Brasil	<i>Caesalpinia echinata</i>
PDM	Pimenta dedo de moça	<i>Capsicum baccatum</i>
R	Rosas	<i>Rosa sp</i>
SP	Spirulina	<i>Arthrospira platensis</i>
SU	Sucupira	<i>Pterodon emarginatus</i>
TT	Abrolhos	<i>Tribulus terrestris</i>
UG	Unha de gato	<i>Uncaria tomentosa</i>
US	Urucum semente	<i>Bixa orellana</i>

Fonte: O autor

4.3.1 Preparação e diluições dos extratos

Todos os extratos foram preparados no laboratório do Professor Fábio Macêdo Nunes, do Instituto de Ciência e Tecnologia (Salvador – BA). Os extratos apresentam um macerado geral das plantas citadas na tabela 3 e foram todos diluídos na mesma proporção de 4 mg de macerado para cada 1 mL de álcool de cereais, ou seja, uma concentração de 4mg/mL.

Todos os ensaios celulares foram realizados através do método colorimétrico por MTT por 72 horas. Para todas as leituras obtidas foi calculado o desvio e erro padrão e a porcentagem média de cada concentração / diluição testada a partir do valor de 100% do controle negativo (células sem tratamento). Um controle positivo, YM-155 à 50µM, também foi testado para indicar a viabilidade dos testes e funcionamento das linhagens celulares (dados do laboratório).

Para manter uma padronização, os resultados, tanto na triagem quanto nas curvas-resposta, foram realizados em placas de 96 poços e em duplicata (n=10), sendo descartados o menor e o maior valor da leitura de absorbância do MTT mantendo, assim, apenas os valores médios de cada ensaio.

4.4 Método colorimétrico por MTT

O MTT é um sal de tetrazólio amarelo e solúvel em meio aquoso que ao entrar em contato com as células viáveis é reduzido, com o auxílio de uma enzima

redutase, aos cristais de formazan, um sólido roxo e insolúvel em meio aquoso (LIU et al., 1997).

Inicialmente o MTT em pó é pesado e diluído em PBS (5mg/mL) com o auxílio de um sonicador para solubilização. Em seguida, a solução é esterilizada com um filtro de seringa 0,22µm e depositado em um tubo estéril que é, então, armazenado em geladeira ao abrigo da luz (coberto com papel alumínio).

Durante os ensaios, o MTT armazenado e solubilizado em PBS é diluído em meio de cultura à 20%, ou seja, para cada 100µL de solução, 20µL são de MTT e 80µL são de meio de cultura. Essa solução é adicionada às placas de 96 poços que são incubadas em estufa úmida de cultura por 3 horas. Após esse período, a solução de meio com MTT é retirada dos poços e uma solução solubilizante é adicionada por uma hora. Essa solução é adicionada porque os cristais de formazan são insolúveis em meio aquoso. A composição do agente solubilizante é feita a partir de 10g de SDS, 100mL de DMSO e 0,6mL de ácido acético glacial.

Após o período de uma hora em um agitador de placas, as placas são levadas ao leitor de microplacas Biotec Synergy HT, onde é feita a leitura da absorbância à 570nm.

Os testes iniciais de MTT foram feitos com os extratos apresentados anteriormente, os quais já estavam diluídos em álcool de cereais (4mg/mL) e foram previamente filtrados. Duas diluições, 100x e 1000x (v/v), foram selecionadas para a triagem dos extratos. Foram utilizados dois controles negativos para as linhagens de câncer: um controle somente com células viáveis e meio de cultura e outro somente com células viáveis e meio de cultura apresentando 1% de etanol em sua diluição (Anexo I), para medir a interferência do etanol no crescimento celular e na leitura do experimento. Através desses controles negativos, foi selecionado um tempo de incubação de 72 horas para os extratos, onde não foi observada interferência no crescimento celular. Controles positivos com compostos padrões já foram previamente testados no laboratório para as linhagens celulares em questão.

4.5 Triagem dos extratos (citotoxicidade)

A triagem dos extratos foi feita em placas de 96 poços e em duplicata, onde 60 desses poços apresentavam as células plaqueadas na concentração de 1×10^5

células/mL, as quais foram plaqueadas com o auxílio do sistema robotizado Nimbus. Para cada coluna de 6 poços foi testada uma concentração diferente do extrato.

Devido ao caráter concentrado dos extratos, duas diluições foram selecionadas para a triagem inicial dos extratos: 100x e 1000x, onde cada uma consistiu em deixar as concentrações finais dos extratos 100x ou 1000x mais diluídas.

Sendo assim, as diluições foram preparadas da seguinte forma:

- **100x:** 990µL de meio de cultura + 10µL do extrato de interesse;
- **1000x:** 891µL de meio de cultura + 100µL do extrato de interesse (alíquota retirada a partir da diluição anterior de 100x) + 9µL de etanol (concentração de 1% para equilibrar esse aumento de 10x na diluição).

Após a leitura das placas, através do método colorimétrico, os resultados indicaram, durante a análise dos dados e elaboração de gráficos, a viabilidade celular em porcentagem (% células viáveis) comparando a linhagem controle com as linhagens de interesse.

4.5.1 Curva-resposta

A partir da triagem, os extratos significativos (seletivos) foram testados em um maior número de diluições para calcular o IC₅₀ desses extratos. O IC₅₀ indica qual o valor de concentração ou diluição de um composto é necessário para atingir a viabilidade celular de 50%, ou seja, a concentração ou diluição do composto testado onde 50% das células testadas se encontram viáveis. Esse valor é importante como um dado de referência para a realização de ensaios secundários como morte e ciclo celular, migração, entre outros. Além disso, o IC₅₀ é importante por ser utilizado no cálculo do Índice de Seletividade (SI) de um composto ou extrato.

O índice de seletividade consiste na razão entre o IC₅₀ da linhagem controle (não cancerígena) e o IC₅₀ da linhagem de interesse (linhagens de câncer):

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ (linhagem controle)}}{IC_{50} \text{ (linhagem de câncer)}}$$

Para a elaboração das curvas-resposta foram selecionados sete valores de diluição: 100x, 250x, 500x, 1000x, 2500x, 5000x, 10000x. A curva ficaria mais exata com um valor inferior a 100x, porém a concentração de extrato ficaria muito elevada e o resultado poderia ter um viés indesejado, pois não teria como afirmar se a morte celular estaria sendo causada apenas pela ação do extrato, do álcool utilizado para diluição desses extratos ou do conjunto dos dois.

As diluições foram feitas de forma seriada, respeitando o volume final e realizando um balanço do volume de etanol de cada alíquota (Tabela 3).

Tabela 3. Cálculo das diluições para as curvas-resposta

Diluição	Extrato (µL)	Volume restante (µL)	Volume total (mL)
100x	40µL	3960µL meio de cultura	4
250x	8µL	1992µL (1980µL meio de cultura + 12µL etanol)	2
500x	4µL	1996µL (1980µL meio de cultura + 16µL etanol)	2
1000x	200µL *	1800µL (1782µL meio de cultura + 18µL etanol)	2
2500x	80µL *	1920µL (1900,8µL meio de cultura + 19,2µL etanol)	2
5000x	40µL *	1960µL (1940,4µL meio de cultura + 19,6µL etanol)	2
10000x	20µL *	1980µL (1960,2µL meio de cultura + 19,8µL etanol)	2

*Alíquota a partir da concentração de 100x

Fonte: O autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem dos extratos de plantas

Como a triagem dos extratos foi realizada em duas diluições (100x e 1000x) os resultados foram divididos em 2 partes, onde as figuras 12, 13 e 14 mostram a relação dos compostos analisados em 100x de diluição enquanto que as figuras 15, 16 e 17 mostram a relação dos compostos analisados em 1000x de diluição. Nos gráficos a seguir, as linhas tracejadas em vermelho (---) indicam o valor de viabilidade celular à 100% (superior) e 50% (inferior).

Os extratos foram pré-selecionados, de acordo com a seletividade, considerando a resposta da linhagem controle (Balb/C) em relação as demais linhagens de câncer (MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, DU 145, HepG2), onde as setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando a nota de corte estabelecida de $\geq 50\%$ ($\pm 5\%$) para Balb/C e ao mesmo tempo $\leq 50\%$ ($\pm 5\%$) para as linhagens de câncer.

Além do valor de corte, alguns extratos foram selecionados mesmo apresentando valores inferiores ao padrão. Esses casos especiais apresentaram uma resposta muito diferente do controle, que mesmo apresentando um valor inferior e/ou próximo à 50% em relação às linhagens de interesse, ainda assim as linhagens de interesse se encontram muito abaixo ou muito acima em relação ao controle. Esses extratos foram classificados como potencialmente seletivos e estão representados por setas azuis (↓).

Figura 12. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 1)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Figura 13. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 2)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Figura 14. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 100x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 3)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Figura 15. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 1)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↴) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↴) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Figura 16. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 2)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Figura 17. Viabilidade celular em porcentagem de extratos de plantas a 1000x de diluição em linhagens de câncer de mama, fígado e próstata (Parte 3)

As linhas tracejadas em vermelho (---) indicam a viabilidade celular superiormente (100%) e inferiormente (50%).

As setas vermelhas (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem, respeitando o intervalo de $>50\% \pm 10\%$ (Balb/C) e $<50\% \pm 10\%$ para as demais linhagens. As setas azuis (↓) indicam os extratos pré-selecionados na triagem por serem potencialmente seletivos mesmo apresentando uma nota de corte menor que a pré-estabelecida.

Balb/C – linhagem de fibroblasto de camundongo (controle). MDA-MB-231 e MCF7 – linhagens de câncer de mama. PC3 e DU145 – linhagens de câncer de próstata. HEPG2 – linhagem de câncer de fígado.

Fonte: O autor

Como podemos observar nos gráficos, 35 diferentes extratos foram previamente seletivos em um total de 59 extratos. As linhagens de próstata, DU 145 e PC-3, são as linhagens com uma maior resposta e sensibilidade em relação aos extratos testados, apresentando, por isso, um maior número de extratos selecionados. Em contrapartida, as linhagens de fígado (HepG2) e mama (MDA-MB-231 e MCF7) são as linhagens com um menor número de extratos selecionados, podendo ser mais resistentes em relação aos extratos testados. Com esses resultados já é possível afirmar que existe uma predileção desses extratos por um determinado tipo de câncer e linhagens correspondentes, no caso, o câncer de próstata e linhagens como DU 145 e PC-3.

Outra observação interessante é o fato de que há uma seletividade destes extratos para diferentes linhagens celulares, podendo atuar para uma única linhagem de um mesmo tipo de câncer (próstata ou mama) ou para mais de uma linhagem do mesmo tipo. Isso demonstra uma atividade seletiva ou potencialmente seletiva para as duas linhagens apresentadas: MCF7 x MDA-MB-231 e PC3 x DU 145.

A grande parte dos extratos foram mais eficientes na diluição de 100x, podendo (ou não) repetir a 1000x. Outros extratos, foram, aleatoriamente, mais eficientes apenas na diluição de 1000x, indicando algum mecanismo de resistência, a eliminação do composto a 100x ou algum artefato durante a triagem. Podemos imaginar que algum mecanismo celular de transporte ou penetração desse extrato possa estar interferindo a ação do mesmo numa diluição mais concentrada. Vale ressaltar que extratos com maior percentual de inibição a partir da diluição de 1000x são mais interessantes para a série, pois é esperado que estes sejam mais potentes. Por isso, alguns extratos foram considerados e incluídos para a próxima etapa mesmo sendo eficientes apenas a 1000x, como por exemplo: AS, AT, CI, CL, G, GB, HP, NO, PDM, R, SU, TT, entre outros.

Separando os extratos em seletivos e potencialmente seletivos e de acordo com cada linhagem, podemos compará-los entre si de forma mais clara. Esses dados se encontram no quadro 2.

Quadro 2. Comparação entre as linhagens celulares e os tipos de câncer em relação aos extratos testados durante a triagem, de acordo com a diluição (100x e 1000x) e sua viabilidade (seletivos e potencialmente seletivos)

LINHAGENS CELULARES		SELETIVOS	POTENCIALMENTE SELETIVOS
MDA-MB-231	100x	AM, GG, JU, MF, SP, UG	AN, C, EM
	1000x	CO, HP, JU, TT	
MCF7	100x	CO, CP, JU, SP, UG	AN, ESC
	1000x	JU	IR
PC-3	100x	AM, CAS, CP, EB, EP, FV, MF, SP	AN, C, EM
	1000x	AN, CL, CP, G, GB	AT, NO
DU 145	100x	A, AG, CAS, CHI, CP, EB, GI, IR, JU, MF, SP	EM, ESC
	1000x	CI, CO, CP, EM, FV, GA, PDM, R, SU, UG	J, NO, SP, TT
HEP G2	100x	CP, JU	AN, C, EM, ESC
	1000x	AS	AT

Fonte: o autor

Podemos observar que para a linhagem de mama MDA-MB-231 um total de 13 extratos foram selecionados, destes 10 são seletivos e 3 são potencialmente seletivos. Já para a outra linhagem de mama, MCF7, um total de 9 extratos foram selecionados, destes 6 são seletivos e 3 são potencialmente seletivos.

Em relação às linhagens de próstata, um total de 18 extratos foram selecionados para PC-3, destes 13 são seletivos e 5 são potencialmente seletivos. Já para a outra linhagem, DU 145, um total de 27 extratos foram selecionados, destes 21 são seletivos e 6 são potencialmente seletivos.

Por fim, para a única linhagem de câncer de fígado, HepG2, um total de 8 extratos foram selecionados, destes 3 são seletivos e 5 são potencialmente seletivos.

A próxima etapa do projeto, tendo como base os resultados obtidos na triagem e a linha tracejada do gráfico, foi a definição de quais extratos são realmente potentes e podem apresentar uma maior seletividade quando comparados à resposta na linhagem controle. Foram considerados extratos que apresentaram um alto valor de viabilidade para Balb/C ($>50\% \pm 10\%$) e baixo para as outras linhagens de câncer ($<50\% \pm 10\%$).

Embora compostos como erva de São Caetano (ESC) e graviola (AN) apresentem um limite muito próximo de 50% ($\pm 10\%$) para Balb/C, os mesmos foram considerados para a próxima etapa, por apresentarem potencial seletividade nas linhagens de interesse como MCF-7, PC-3 e HepG-2 para a graviola e MCF-7 e DU 145 para erva de São Caetano. Outros extratos, como Arnica, Noni e Rosas, embora tenham algum efeito destacado nos gráficos apresentaram um resultado muito próximo em relação à Balb/C e as linhagens de interesse, ou seja, mostram pouca seletividade e por isso não foram considerados na próxima etapa. Sendo assim, embora 35 extratos tenham sido pré-seletivos, apenas 31 extratos foram selecionados para a elaboração de curvas-resposta.

Para deixar mais claro, o quadro 3., abaixo, mostra todos os extratos que foram escolhidos para a próxima etapa, ou seja, o estudo da curva concentração-resposta para cada linhagem.

Quadro 3. Candidatos à curva concentração-resposta com bons resultados e seletividade em relação a Balb/C, baseados nos dados da triagem

MDA-MB-231	Camomila, Estigmas de milho, Bacupari, Erva de São João, Júpiper, Malva (folhas), Espirulina, Abrolhos e Unha de gato
MCF7	Graviola, Algodão de Seda, Erva de São Caetano, Ipê Roxo, Júpiper, Unha de gato
DU 145	Amora, Agrião, Casca de Anta, Chia, Cravo da Índia, Coentro, Algodão de Seda, Erva de Bugre, Estigmas de Milho, Erva de São Caetano, Garcínia. Ginseng, Ipê Roxo, Jambolão, Júpiper e Espirulina
PC-3	Arnica, Graviola, Açafrão da Terra, Camomila, Casca de Anta, Clorela, Algodão de Seda, Erva de Bugre, Estigmas de Milho, Purpúrea, Fava do Mar, Gengibre, Ginko, Malva (folhas), Espirulina
HepG2	Graviola, Açafrão da Terra, Astragalus, Camomila, Algodão de Seda, Estigmas de Milho, Erva de São Caetano, Júpiper

Fonte: o autor

5.2 Curvas-resposta e seletividade

Para a construção das curvas-resposta as diluições foram transformadas em concentrações em g/mL. Em seguida, esses valores foram transformados em log. O quadro 4 mostra todas as transformações realizadas.

Quadro 4. Cálculo das concentrações para a curva-resposta

CONCENTRAÇÃO INICIAL = 4mg/mL = 4×10^{-3} g/mL		
Diluição	Concentração	Log
100x =	$4,0 \times 10^{-5}$ g/mL	- 4,3979
250x =	$1,6 \times 10^{-5}$ g/mL	- 4,7959
500x =	$8,0 \times 10^{-6}$ g/mL	- 5,0969
1000x =	$4,0 \times 10^{-6}$ g/mL	- 5,3979
2500x =	$1,6 \times 10^{-6}$ g/mL	- 5,7959
5000x =	$8,0 \times 10^{-7}$ g/mL	- 6,0969
10000x =	$4,0 \times 10^{-7}$ g/mL	- 6,3979

Fonte: o autor

Segue abaixo todas as curvas para cada linhagem (Figuras: 18–22) em comparação com a Balb/C seguida de uma tabela, onde é possível calcular a seletividade, a partir do IC₅₀ da linhagem controle e relação ao IC₅₀ da linhagem testada (tabelas 4-8).

Figura 18. Curvas concentração-resposta referentes aos extratos selecionados para a linhagem celular MDA-MB-231 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (MDA-MB-231)

Curva resposta (Júniper) - Balb/C x MDA-MB-231

Curva resposta (Malva folhas) - Balb/C x MDA-MB-231

Curva resposta (Espirulina) - Balb/C x MDA-MB-231

Curva resposta (Abrolhos) - Balb/C x MDA-MB-231

Fonte: o autor

Tabela 4. Comparação entre os IC₅₀ dos extratos testados em BalbC e MDA-MB-231 juntamente com os índices de seletividade

	EXTRATO	IC ₅₀ BalbC (µg/mL)	IC ₅₀ MDA-MB-231 (µg/mL)	SI
C	Camomila	>40	19,2 ± 0,88 µg/mL	>2,1
EM	Estigmas de Milho	>40	14,3 ± 0,77 µg/mL	>2,8
GG	Bacupari	>40	9,6 ± 1,12 µg/mL	>4,2
HP	Erva de São João	6,96 ± 0,43 µg/mL	6,35 ± 0,97 µg/mL	1,1
JU	Júniper	6,33 ± 1,2 µg/mL	3,13 ± 0,64 µg/mL	2,0
MF	Malva Folhas	>40	39,1 ± 1,40 µg/mL	>1
SP	Espirulina	16,7 ± 0,92 µg/mL	19,1 ± 1,01 µg/mL	0,88
TT	Abrolhos	18,5 ± 1,74 µg/mL	18,7 ± 1,07 µg/mL	0,99
UG	Unha de gato	>40	13,6 ± 0,87 µg/mL	>2,9

Vermelho: maior índice de seletividade

Roxo: potencial interesse

Fonte: o autor

Figura 19. Curvas concentração-resposta referentes aos extratos seleccionados para a linhagem celular MCF7 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (MCF7)

Fonte: o autor

Tabela 5. Comparação entre os IC₅₀ dos extratos testados em BalbC e MCF7 juntamente com os índices de seletividade

EXTRATO	IC ₅₀ BalbC (µg/mL)	IC ₅₀ MCF7 (µg/mL)	SI
AN Graviola	>40	34,0 ± 2,52	>1,2
CP Algodão de Seda	>40	ND	ND
ESC Erva de São Caetano	59,2 ± 6,24	18,7 ± 0,86	3,2
IR Ipê Roxo	>40	38,3 ± 0,97	>1,0
JU Júpiper	6,33 ± 1,2	13,4 ± 1,05	0,5
UG Unha de gato	>40	32,8 ± 1,24	>1,2

Não foi possível calcular o IC₅₀ para coentro e espirulina em MCF7, pois ambos apresentaram baixa potencialidade e por isso foram descartados.

Vermelho: maior índice de seletividade

Roxo: potencial interesse

Fonte: o autor

Figura 20. Curvas concentração-resposta referentes aos extratos seleccionados para a linhagem celular PC-3 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (PC-3)

Fonte: o autor

Tabela 6. Comparação entre os IC₅₀ dos extratos testados em BalbC e PC-3 juntamente com os índices de seletividade

EXTRATO		IC ₅₀ BalbC (µg/mL)	IC ₅₀ PC-3 (µg/mL)	SI
AM	Arnica	55,6 ± 5,0	7,49 ± 0,36	7,4
AN	Graviola	>40	65,1 ± 5,95	>0,6
AT	Açafrão da Terra	6,12 ± 0,34	3,5 ± 0,14	1,7
C	Camomila	>40	8,65 ± 0,33	>4,6
CAS	Casca de Anta	>40	11,1 ± 0,68	>3,6
CL	Clorela	8,05 ± 1,25	1,12 ± 0,33	7,2
CP	Algodão de Seda	>40	4,79 ± 6,9	>8,3
EB	Erva de Bugre	24,7 ± 1,4	3,03 ± 1,3	8,2
EM	Estigmas de Milho	>40	3,95 ± 0,54	>10
EP	Purpúrea	27,4 ± 1,37	11,3 ± 0,23	2,4
FV	Fava do Mar	>40	17,8 ± 0,79	>2,3
G	Gengibre	5,56 ± 0,27	2,1 ± 0,15	2,6
GB	Ginko	9,09 ± 0,35	0,43 ± 0,43	21
MF	Malva Folhas	>40	13,04 ± 0,73	>3,1
SP	Espirulina	16,7 ± 0,92	3,99 ± 0,35	4,2

Vermelho: maior índice de seletividade**Roxo:** potencial interesse

Fonte: o autor

Figura 21. Curvas concentração-resposta referentes aos extratos seleccionados para a linhagem celular DU 145 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (DU 145)

Fonte: o autor

Tabela 7. Comparação entre os IC₅₀ dos extratos testados em BalbC e DU 145 juntamente com os índices de seletividade

EXTRATO		IC ₅₀ BalbC (µg/mL)	IC ₅₀ DU 145 (µg/mL)	SI
A	Amora	64,1 ± 6,3	21,71 ± 1,0	2,9
AG	Agrião	>40	37,6 ± 15,7	>1,1
CAS	Casca de Anta	>40	18,4 ± 0,8	>2,2
CHI	Chia	>40	17,1 ± 1,15	>2,3
CI	Cravo da Índia	6,65 ± 0,63	1,74 ± 0,52	3,8
CO	Coentro	>40	>40	>1
CP	Algodão de Seda	>40	28,3 ± 2,54	>1,4
EB	Erva de Bugre	24,7 ± 1,4	14,1 ± 0,93	1,8
EM	Estigmas de Milho	1,47 ± 0,41	20,0 ± 0,43	7,4
ESC	Erva de São Caetano	59,2 ± 6,24	12,5 ± 0,75	4,7
GA	Garcínia	6,2 ± 0,19	1,77 ± 0,25	3,5
GI	Ginseng	>40	9,98 ± 0,68	>4,0
IR	Ipê Roxo	>40	34,6 ± 1,25	>1,2
J	Jambolão	>40	2,85 ± 0,39	>14
JU	Júniper	6,33 ± 1,2	3,08 ± 0,43	2,1
SP	Espirulina	16,7 ± 0,92	22,1 ± 1,09	0,75

Fonte: o autor

Figura 22. Curvas concentração-resposta referentes aos extratos seleccionados para a linhagem celular HepG2 – Comparação entre o controle (BalbC) *versus* a linhagem de interesse (HepG2)

Fonte: o autor

Tabela 8. Comparação entre os IC₅₀ dos extratos testados em BalbC e HepG2 juntamente com os índices de seletividade

EXTRATO		IC ₅₀ BalbC (µg/mL)	IC ₅₀ HepG2 (µg/mL)	SI
AN	Graviola	>40	31,1 ± 0,92	>1,3
AS	Astragalus	36,1 ± 2,1	>40	0,75
AT	Açafrão da Terra	6,12 ± 0,34	5,57 ± 0,18	1,1
C	Camomila	>40	21,8 ± 1,15	>1,8
CP	Algodão de Seda	>40	29,4 ± 1,33	>1,4
EM	Estigmas de Milho	>40	8,54 ± 0,49	>4,7
ESC	Erva de São Caetano	59,2 ± 6,24	13,9 ± 0,34	4,3
JU	Júniper	6,33 ± 1,2	6,6 ± 0,44	0,96

Fonte: o autor

Analisando todas as curvas podemos afirmar que para cada linhagem um número diferente de extratos foi seletivo. No total, 31 extratos foram analisados.

Como podemos analisar na tabela 9., para MCF7, seis extratos foram seletivos em relação à Balb/C, desses os que apresentaram maior seletividade (em ordem decrescente) foram: algodão de seda, graviola, unha de gato, ipê roxo e erva de São Caetano. Para HepG2, sete extratos foram seletivos em relação à Balb/C, desses os que apresentaram maior seletividade (em ordem decrescente) foram: camomila, algodão de seda, graviola, estigmas de milho e erva de São Caetano. Para MDA-MB-231, nove extratos foram seletivos em relação à Balb/C, desses os que apresentaram maior seletividade (em ordem decrescente) foram: bacupari, unha de gato, estigmas de milho, camomila e malva (folhas). Para PC-3, quinze extratos foram seletivos em relação à Balb/C, desses os que apresentaram maior seletividade (em ordem decrescente) foram: ginko, estigmas de milho, algodão de seda, erva de bugre, arnica, clorela, camomila, espirulina, casca de anta, malva (folhas) e fava do mar. Por fim, para DU 145, dezesseis extratos foram seletivos em relação à Balb/C, desses os que apresentaram maior seletividade (em ordem decrescente) foram: jambolão, erva de São Caetano, ginseng, cravo da Índia, garcínia, chia, casca de anta, estigmas de milho, amora, algodão de seda e ipê roxo.

Dessa forma, há extratos em que são seletivos para uma única linhagem e há extratos que são seletivos para duas linhagens de um mesmo tipo de câncer, como é o caso das linhagens de mama e próstata. Ainda assim, esses extratos respondem de forma diferente em relação às linhagens quando comparados por tipos. Isso se dá ao fato de que as linhagens são metastáticas e possuem características morfológicas e moleculares diferentes, respondendo de forma diferente em relação ao tratamento. Já a linhagem de câncer de fígado, por não ser metastática, pode estar apresentando uma maior resistência em relação a esses extratos devido não somente ao fato de ser uma linhagem agressiva e de rápida proliferação, mas também por suas características morfológicas e moleculares, como o seu tipo de metabolismo que é acelerado.

Tabela 9. Comparação entre a atividade de todos os extratos testados em relação as linhagens de interesse

Fonte: o autor

Com esses resultados foi demonstrado que de todos os extratos testados, os mais eficazes, de forma comum, para a maioria das linhagens são: algodão de seda, camomila, casca de anta, erva de São Caetano, estigmas de milho, graviola, ipê roxo, malva (folhas) e unha de gato. Extratos como estigmas de milho, camomila, casca de anta e malva (folhas) são inovadores por apresentarem poucos resultados na literatura relacionando extratos dessas plantas com linhagens de câncer. Outros extratos como algodão de seda, erva de São Caetano, graviola, ipê roxo e unha de gato apresentam dados interessantes na literatura quando comparados aos nossos resultados encontrados.

O algodão de seda (*Calotropis procera*) é uma planta originária da África, Índia e Pérsia. No Brasil é comum na região Nordeste, onde é conhecida como “ciúme”, “ciumeira” ou “flor de seda” (JOLY, 1979). Apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética, anticoagulante, cicatrizante, antioxidante, antiproliferativas e anti-inflamatórias importantes. Seus fitoquímicos se compõe basicamente de alcaloides, taninos, triterpenos e glicosídeos cardíacos (cardenolídeos), dentre eles a calotropina (DEWAN; SANGRAULA; KUMAR, 2000; KUMAR; BASU, 1994; OLIVEIRA, 2000). Seus fitoquímicos atuam na ativação de genes supressores tumorais e reguladores da apoptose e ciclo celular, como NF- κ B, ciclina D1 e Bcl-2. Estudos demonstram que foram observadas respostas em linhagens celulares de câncer do tipo melanoma, glioblastoma, fígado, próstata, pulmão e cólon (DE ALENCAR 2017; IBRAHIM et al., 2014; JOSHI et al., 2015; KWON et al., 2018; SAMY et al., 2012). Nossos dados corroboram com os da literatura, uma vez que o extrato de algodão de seda estudado demonstrou resultados significativos tanto para linhagens de câncer de próstata quanto de fígado.

A camomila (*Matricaria chamomilla*) é uma das ervas mais utilizadas na medicina alternativa no Brasil. Também conhecida como “camomila vulgar”, seu óleo tem diversas propriedades desde cosméticas até aromaterápicas. Seu uso é indicado em doenças como rinite alérgica, inflamações, espasmos musculares, cólicas menstruais, úlceras, insônias, lesões, distúrbios intestinais, reumatismo e hemorroidas (DI STASI et al., 2002; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). Seus fitoquímicos são compostos de flavonoides, fenóis e terpenoides, os quais apresentam atividade antiproliferativa, antioxidante e antibacteriana. Não se sabe ao certo o mecanismo molecular, mas os fitoquímicos presentes na camomila atuam em processos de regulação da invasão e migração celular (NIKSERESHT et al., 2017; PARK et al., 2017; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). A quantidade de informações presentes na literatura relacionando os efeitos de extratos de camomila com células cancerígenas é limitado e escasso. Foram registrados estudos que demonstram atividade em algumas linhagens celulares de câncer, como mama, estômago, cérvix e cólon (NIKSERESHT et al., 2017; PARK et al., 2017). Diferentemente desses resultados encontrados, o presente estudo demonstra

uma atividade seletiva por parte do extrato de camomila em resposta às linhagens celulares de câncer de próstata e fígado.

A casca de anta (*Drymis winteri*) é uma árvore endêmica do Chile, também presente na Argentina e no Brasil. Em sua composição apresenta fitoquímicos como óleos essenciais, terpenos, lactonas, flavonoides e sesquiterpenos (como o dendocarbin A). Extratos de casca de anta apresentam propriedades anti-inflamatória, antialérgica, analgésica, antiviral, antibacteriana e antifúngica (JANSEN; DE GROOT, 2004; MENDES et al., 1998; 2000). Um estudo feito em salmões demonstrou um potencial imunostimulador, onde o extrato de casca de anta estimulou o sistema imunológico de salmões afetados por parasitas a produzirem mais células imunes e atacarem seus invasores (PAZ ROBLES et al., 2014; PEREIRA-TORRES et al., 2016).

Em relação aos efeitos antiproliferativos não foi encontrado nenhum artigo na literatura que relacionasse diretamente o extrato de casca de anta a alguma linhagem celular de câncer. Desta forma, seria inovador esses resultados aqui apresentados, demonstrando um efeito em células de câncer de próstata.

A erva de São Caetano, também conhecida como “melão amargo”, é uma planta muito cultivada em países em desenvolvimento (Ásia, América Central e Sul). Foi cultivada como vegetal e usada tradicionalmente como medicamento, prevenindo doenças como diabetes, obesidade, infecções helmínticas, reumatismo, pedras nos rins, hemorroidas e gota. Além disso, controla os níveis de glicemia (RAINA; KUMAR; AGARWAL, 2016; WANG et al., 2017). Em relação ao seu valor nutricional e fitoquímicos presentes, a erva de São Caetano é conhecida por ser uma fonte rica de minerais (potássio, cálcio, zinco, magnésio, fósforo e ferro), vitaminas (C, A, E, B1, B2, B3 e B9 como folato), proteínas, carboidratos, ácidos fenólicos, óleos essenciais, vitaminas, minerais, alcaloides, flavonoides, quinino, aminoácidos, saponinas, ácidos graxos, triterpenoides. Fenóis como ácido gálico, catequina, tanino, ácido clorogênico, ácido gentísico e epicatequina, alcalóides, carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, zeaxantina, criptoxantina e licopeno), bem como esteróis,

também são ricos em frutas e folhas de *M. charantia* (RAINA; KUMAR; AGARWAL, 2016; WANG et al., 2017).

Estudos demonstram atividade antineoplásica, antioxidante e anti-inflamatória, atuando em processos como a indução da apoptose, parada do ciclo celular e expressão de fatores séricos associados à imunidade. Os mecanismos moleculares ainda são desconhecidos. Ali e colaboradores (2018) estudaram mais a fundo a bioquímica dos extratos de *M. charantia* e observaram em seus resultados que o tratamento diminuiu significativamente a expressão de proteínas como Cox-2 (Cicloxigenase-2), VEGF (fator de crescimento endotelial), HDAC (histona desacetilase) e metaloproteinases do tipo 2 e 9 (MMPs). Além disso, aumentou a concentração de caspases do tipo 3 e 8. Dessa forma, concluíram que o efeito antineoplásico do extrato da planta pode ser através da inibição da angiogênese, inibição da proliferação / metástase e ativação da apoptose. Outro estudo (FAROOQI et al., 2018), demonstra que extrato do melão amargo pode interferir na via PI3K/AKT/mTOR e MAPK também, porém o mecanismo completo ainda apresenta algumas lacunas a serem investigadas.

Quanto aos tipos de câncer observados, extratos de melão amargo tiveram respostas em diversas linhagens celulares de câncer como: leucemia, linfoma, mama, pele, próstata, cólon, bexiga e pâncreas (MINARI; OKELOLA; UGOCHUKWU, 2017; RAINA; KUMAR; AGARWAL, 2016; WANG et al., 2017). Além de apresentar um efeito em câncer de mama, corroborando com nossos estudos, o extrato estudado apresentou também, em nossos resultados, um efeito significativo no tratamento para o câncer de fígado.

O milho é nativo da América do Sul e extensivamente cultivado em vários outros países do Oriente. Ao longo do tempo foi cultivado em diversas ilhas e províncias como artigo básico da alimentação de diversos povos (KUMAR; JHARIYA, 2013). Como parte do milho (*Zea mays*), os estigmas de milho são popularmente conhecidos como “cabelos do milho”. O milho é extremamente rico em vitaminas (B1, B2, B3, B5 e B6) sendo bom para o cabelo, a pele, a digestão, o coração e o cérebro. Além disso contém betacarotenos, vitaminas C, E, K e selênio sendo bom para a glândula tireoide e o sistema imunológico. Fitoquímicos de metabólitos secundários como

saponina, alantoína, esterol, estigmasterol, alcalóides, hordenina e polifenóis são encontrados nas folhas, sementes e estigmas de milho. Esses fitoquímicos apresentam propriedades antioxidantes, diuréticas e analgésicas. Além disso, seu uso é indicado em doenças como reumatismo, infecções no trato urinário, pedra nos rins, retenção de líquidos, regulação da pressão arterial, estimulante hepático na produção de bile, úlceras e problemas estomacais (KUMAR; JHARIYA, 2013).

Wu et al. (2014) testaram o efeito de estigmas de milho em carcinoma hepatocelular em camundongos (H22) e descobriram um efeito inibitório em células tumorais dose dependente e que se tornou sinérgico e tóxico em conjunto com ciclofosfamida. Yang et al. (2014) também observaram uma diminuição de tumores de células da linhagem H22 em camundongos e uma melhora no sistema imune e prolongamento do tempo de vida. Lee et al. (2014) avaliaram um flavonoide de estigmas de milho (“maysin”) em células humanas de câncer de próstata (PC-3). Os resultados mostram que esse extrato reduziu de forma dose dependente a viabilidade celular de células PC-3 com redução de 87% a 200 µg/ml de extrato. O tratamento também induziu significativamente a morte celular por apoptose, fragmentação de DNA, despolarização de MMP e redução nos níveis de expressão de Bcl-2 e pró-caspase-3. Além disso, atenuou significativamente a fosforilação de AKT e ERK. Um tratamento combinado com “maysin” e outros agentes antineoplásicos conhecidos, incluindo fluoracil, etoposido, cisplatina e camptotecina, aumentou sinergicamente a morte celular.

Diferentemente dos resultados apresentados que mostraram resultados apenas em hepatocarcinoma de camundongos e câncer de próstata, nossos resultados mostram resultados antiproliferativos em linhagens humanas de câncer de mama, fígado e próstata

A graviola (*A. muricata*) é encontrada em muitas partes das regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo algumas partes das Américas, Ásia e África. A maioria das partes da planta é usada em medicamentos tradicionais no tratamento de várias doenças incluindo: inflamações, reumatismo, diabetes, hipertensão. A fruta é usada no combate a artrite e febre. Tanto as sementes como as frutas também são usadas para tratar infecções parasitárias. As folhas

são usadas como medicação tradicional para combater hipoglicemia, inflamação e como medicação contra espasmos. A folha da planta foi apelidada de “assassina do câncer” e, como o nome sugere, também é usada na medicina tradicional no tratamento do câncer (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2006; ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; LEBOEUF et al., 1980; YAJID et al., 2018; ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

Uma análise da composição fitoquímica de *A. muricata* por Gavamukulya (2014) indicou que extratos da planta contêm uma alta concentração de compostos metabólicos de classe secundária, como alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas e outras lactonas, taninos, glicosídeos cardíacos, fenóis e fitoesteróis (YAJID et al., 2018). Estes compostos são chamados de acetogeninas anonáceas (AGEs), que apresentam atividade antimicrobiana, antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante (CHANG et al., 2003; DEEP et al., 2016; KIM et al., 1998; LIAW et al., 2002; QAZI et al., 2018; RIESER et al., 1996; SUN et al., 2014; TORRES et al., 2012; YAP et al., 2017). Os fitoquímicos presentes na graviola induzem a citotoxicidade celular inibindo o complexo mitocondrial I (SIES, 1993), inibindo a proliferação neoplásica, através da ativação da apoptose e inibição da divisão celular, e inibindo a expressão de proteínas angiogênicas (CHANG et al., 2003; DEEP et al., 2016; KIM et al., 1998; LIAW et al., 2002; QAZI et al., 2018; RIESER et al., 1996; SUN et al., 2014; TORRES et al., 2012; YAP et al., 2017).

Seus efeitos em linhagens celulares de câncer são bastante citados na literatura e, corroborando com nossos estudos, de forma geral apresentam atividade em diversos tipos de câncer como: mama, endométrio, ovário, próstata, cólon, pulmão, pâncreas, esôfago, bexiga, linfoma, fígado (CHANG et al., 2003; DEEP et al., 2016; KIM et al., 1998; LIAW et al., 2002; LIU et al., 2016; QAZI et al., 2018; RIESER et al., 1996; SUN et al., 2014; TORRES et al., 2012; YANG; LIU; LEE, 2016; YAP et al., 2017).

O ipê-roxo (*Tabebuia sp.*) faz parte de um grupo de árvores presentes em toda a América do Sul. Apresenta propriedades diversas e múltiplos usos na medicina alternativa e popular. Entre os efeitos populares os mais comprovados cientificamente são: atividade antioxidante, antibiótica (bactericida, antiviral e antifúngica), cicatrizante, diurética, antirreumática, anti-

inflamatória, antiproliferativa e antineoplásica. Dentre todos os fitoquímicos presentes, os mais abundantes são do tipo naftoquinonas, antraquinonas e furano-naftoquinonas, com maior destaque para o lapachol e a β -lapachona (LEE et al., 2015; TSANG et al., 2017).

Os fitoquímicos do tipo furano-naftoquinonas se encontram nas madeiras ou cascas de várias árvores de espécies de ipês e atuam inibindo a invasão metastática, direcionados aos processos de transição epitélio-mesênquima, inibindo células tronco cancerígenas e transdutores de sinal ativadores de transcrição do tipo STAT 3, responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular. Fármacos de fontes naturais e sintéticas do tipo furano-naftoquinonas foram para os ensaios clínicos de fase I e II mostrando ser promissores no tratamento do câncer (TSANG et al., 2017). Outros componentes presentes, o lapachol e a β -lapachona (β -lap) inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) regulando positivamente a expressão de moléculas anti-inflamatórias como interleucina (IL-10), heme-oxigenase-1 (HO-1) e inibidor tecidual de metaloproteinase-2 (TIMP-2). Além disso, Induz efeito anti-inflamatório sistêmico inibindo as vias MAPKs, PI3K / AKT e NF- κ B / AP-1. Estudos adicionais revelaram que a β -lap também induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEE et al., 2015).

Em relação a atividade antineoplásica foram registrados estudos que demonstram atividade de extratos de ipês em algumas linhagens celulares de câncer de pele, onde a proteína Sp1 foi regulada negativamente, além da indução da apoptose e paragem do ciclo celular (BANG et al., 2016); câncer de cólon (CT26) através da indução da apoptose (ativação de caspases, clivagem da polimerase e regulação negativa da Bcl-2) e paragem do ciclo celular, além de diminuir a migração e invasão celular, diminuindo também a expressão de metaloproteinases (KEE et al., 2017); leucemia, onde furano-naftoquinanas metoxiladas demonstram um papel antileucêmico (INAGAKI et al., 2013); e câncer de mama (MCF7), onde foi observado um efeito antiproliferativo (relação dosagem / tempo) na terapia com moduladores seletivos de receptor estrogênico combinados com o extrato aquoso de espécies de *Tabebuia* (paragem do ciclo celular e indução da apoptose) em células de câncer de

mama (MUKHERJEE; TELANG; WONG, 2009). No presente estudo obtivemos efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de mama (corroborando resultados da literatura) e de câncer de próstata (como um resultado inovador).

A malva (*Malva sylvestris*) é uma planta natural na Europa, norte da África e Ásia. Posteriormente, foram introduzidas na América como espécies invasoras. É conhecida na medicina alternativa por apresentar atividade expectorante, antialérgica, anti-inflamatória e cicatrizante. Em sua composição apresenta fitoquímicos como flavonoides (como malvinas), terpenoides, polifenóis, glicerídeos, mucilagens, cumarinas, ácidos graxos/esteroides e pigmentos, além de aminoácidos/proteínas, vitaminas e enzimas (BRASIL, 2015b).

Estudos de citotoxicidade em linhagens de câncer mostraram pouco ou nenhum efeito em relação aos efeitos de extratos de malva. Em linhagens celulares como LNCaP (câncer de próstata), C32 (melanoma amelanótico), ACHN (adenocarcinoma renal) e MCF-7 (câncer de mama) um extrato aquoso das folhas não interferiu na atividade antiproliferativa dessas células (CONFORTI et al., 2008). Já o extrato metanólico das folhas de malva exibiu efeito citotóxico para linhagens celulares como B16 (melanoma murino) e A375 (melanoma humano) (DANIELA et al., 2007). Outros estudos demonstram uma atividade antiproliferativa pela indução da apoptose e demonstram resultados quimiopreventivos em poucas linhagens (BENSO et al., 2015; RAZAVI et al., 2011). No presente estudo obtivemos efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de mama e próstata, ambos corroborando com os resultados da literatura.

A unha de gato (*Uncaria tomentosa*) é uma planta nativa da Amazônia, sendo distribuída atualmente por regiões tropicais da Ásia, África e América do Sul (ZHANG et al., 2015). É conhecida por suas propriedades: anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética, antimicrobiana e antiproliferativa (BORS et al., 2011; HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2015). Além disso, apresenta importantes efeitos cardiovasculares e na terapia contra o mal de Parkinson (ZHANG et al., 2015).

Em sua composição apresenta fitoquímicos como triterpenos, alcaloides, glicosídeos, ésteres carboxílicos alquílicos, ácido quinóico e polifenóis (BORS et al., 2011; HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2015).

Inibição de diversas linhagens celulares de câncer como HL-60 (leucemia) (BACHER et al., 2006; CHENG et al., 2007), MCF7 e MT-3 (ambas de câncer de mama) (PILARSKI et al., 2010; RIVA et al., 2001; SUN et al., 2012), Walker-256 e HepG2 (ambas de câncer de fígado) (DREIFUSS et al., 2013; KOŚMIDER et al., 2017), T24 E RT4 (ambas de câncer de bexiga) (DIETRICH et al., 2014; KAISER et al., 2013), MHH-ES-1 (sarcoma) (GARCÍA GIMÉNEZ et al., 2010), SK-N-BE (neuroblastoma) e GAMG (glioma) (GARCIA PRADO et al., 2007).

No presente estudo obtivemos efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de mama, novamente corroborando com os resultados da literatura.

Os mecanismos envolvem indução da apoptose via modulação de NF- κ B, alterações no potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo C no citosol e ativação de caspases 3 e 7. Além disso, foi observado paragem do ciclo celular via ativação de proteínas de reparo do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio (BORS et al., 2011; HEITZMAN et al., 2005; KEPLINGER et al., 1999; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2015).

A pesquisa envolvendo a descoberta de novos fármacos engloba diversos compostos que interagem com diferentes tipos de receptores presentes nos sistemas biológicos onde essas substâncias podem atuar tanto de forma agonista quanto antagonista, ativando e inibindo seus processos de acordo com seus mecanismos de ação. Dessa forma grande parte das pesquisas estão voltadas não só para a triagem de substâncias, mas também para o estudo bioquímico dos inúmeros mecanismos e rotas bioquímicas, envolvendo seus sinalizadores como proteínas, enzimas, transportadores, receptores, hormônios, entre outros. Os extratos por serem compostos heterogêneos com diversos tipos de substâncias presentes podem atuar em diversos desses mecanismos e seus princípios ativos isolados podem ser mais interessantes (YUNES; CALIXTO, 2001).

No presente trabalho não foi feita uma caracterização isolada das substâncias de cada extrato podendo ser esse um passo importante no estudo dos mecanismos biológicos. O que sabemos é que os extratos, em sua maioria, apresentam efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes atuando, dentre tantas outras, em duas principais vias de sinalização: NF- κ B e óxido nítrico (NO) (YUNES; CALIXTO, 2001).

O NF- κ B atua em processos inflamatórios (TNF, IL-1), na proliferação e sobrevivência celular (TNF, ciclinas, IL-1, IL-6, cIAP, XIAP), nos processos de angiogênese (VEGF, TNF), promoção tumoral e formação de metástases (COX2, MMPs, VCAM-1) (HOESEL; SCHMID, 2013).

O NO atua na indução da migração e invasão (MMPs, integrinas), indução da angiogênese (VEGF, HIF 1 α), proliferação celular (MAPK) e sobrevivência celular (PI3K/AKT), aumento do estresse oxidativo (ROS, danos no DNA) e inibição de fatores apoptóticos ($\downarrow$ p53) (VANNINI; KASHFI; NATH, 2015).

Porém, esses fatores não atuam de forma isolada e sim de forma conjunta com outras vias de sinalização podendo ser não somente potentes anti-inflamatórios e antioxidantes, mas também antiproliferativos atuando na regulação do ciclo e morte celular e nos processos de migração celular e angiogênese. Sendo assim, compostos com atividades antiproliferativas podem contribuir para a inibição dos processos relacionados ao câncer. Além disso, através de quinases e fatores de transcrição essas substâncias podem atuar em outras vias como na formação de espécies reativas de oxigênio e processos imunomoduladores, como a expressão de macrófagos (HOESEL; SCHMID, 2013; VANNINI; KASHFI; NATH, 2015; YUNES; CALIXTO, 2001).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com a realização desse trabalho podemos concluir que os extratos naturais de plantas tiveram efeito significativo e seletivo em linhagens celulares de câncer (mama, fígado e próstata) e seus fitoquímicos podem ser utilizados no estudo de novos fitoterápicos antineoplásicos e antiproliferativos.

Após a triagem, vimos que uma grande quantidade de extratos pode ter algum efeito na seletividade de linhagens de câncer, inclusive um mesmo extrato para um ou mais linhagens e tipos de câncer.

Com a elaboração de curvas-resposta foi possível quantificar a seletividade dos compostos pré-selecionados para cada linhagem em estudo, onde cada linhagem teve uma quantidade diferente de extratos seletivos.

Em relação às linhagens de mama, para MDA-MB-231 (nove extratos seletivos) os melhores resultados foram: bacupari, unha de gato, estigmas de milho, camomila e malva (folhas) e para MCF7 (seis extratos seletivos) os melhores resultados foram: algodão de seda, graviola, unha de gato, ipê roxo e erva de São Caetano. Em relação às linhagens de próstata, para PC-3 (quinze extratos seletivos) os melhores resultados foram: ginko, estigmas de milho, algodão de seda, erva de bugre, arnica, clorela, camomila, espirulina, casca de anta, malva (folhas) e fava do mar e para DU 145 (dezesesseis extratos seletivos) os melhores resultados foram: jambolão, erva de São Caetano, ginseng, cravo da Índia, garcínia, chia, casca de anta, estigmas de milho, amora, algodão de seda e ipê roxo. Em relação a única linhagem de fígado – HepG2 (sete extratos seletivos) – os melhores resultados foram: camomila, algodão de seda, graviola, estigmas de milho e erva de São Caetano.

Com esses resultados foi demonstrado que de todos os extratos, os mais seletivos, de forma comum, para a maioria das linhagens são: algodão de seda, camomila, casca de anta, erva de São Caetano, estigmas de milho, graviola, ipê roxo, malva (folhas) e unha de gato. Alguns destes extratos como algodão de seda e graviola já são bem conhecidos na literatura, porém extratos como estigmas de milho, camomila, casca de anta e malva (folhas) são inovadores por apresentarem poucos resultados na literatura relacionando

extratos e/ou fitoquímicos presentes e seu efeito antineoplásico, antiproliferativo e citotóxico.

É possível concluir também que células de próstata (PC-3 e DU145) apresentaram uma melhor resposta aos extratos testados quando comparadas às células de mama (MCF7 e MDA-MB-231) e fígado (HepG2), indicando uma maior sensibilidade das linhagens de próstata e uma maior resistência das linhagens restantes em relação aos extratos testados.

Ensaio biológicos secundários específicos necessitam ser realizados para traçar o perfil biológico desses extratos (YUNES; CALIXTO, 2001). Há grandes indícios de que esses compostos atuam em diversas vias responsáveis pela viabilidade celular, como ciclo celular e morte celular, além de vias secundárias responsáveis pela manutenção da vida celular, da síntese proteica e fosforilação de proteínas (YUNES; CALIXTO, 2001). Dessa forma, ensaios envolvendo ciclo celular, apoptose/autofagia e citometria de fluxo podem ser feitos no laboratório, que apresenta os kits e equipamentos necessários, como forma de dar sequência ao trabalho.

Entendendo o mecanismo bioquímico por detrás de seus efeitos e em quais vias de sinalização esses compostos atuam, é possível planejar novos fitoterápicos potentes e aprimorar o estudo de alvos e mecanismos moleculares envolvendo fitoquímicos e câncer.

Em relação a algumas perspectivas, a partir dos resultados e conclusões obtidos, podemos complementar o estudo desses extratos com outras culturas celulares, como células lábeis e outras linhagens celulares não neoplásicas, como fibroblasto humano e epitélio. Em relação aos ensaios celulares, novos ensaios complementares podem ser feitos no futuro, como forma de elucidar melhor alguns mecanismos moleculares:

- Migração celular (*wound healing* e câmara de Boyden);
- Ensaio de zimografia e western blot para verificar presença de metaloproteinases;
- Ensaio de invasão celular;
- Formação de colônias e ensaio clonogênico para verificar a citotoxicidade desses extratos (efeito citotóxico e citostático);

- Ensaios com culturas 2D e 3D para comparar o efeito da cultura em monocamada com a cultura em esferoides;
- Ensaios de formação de ROS (espécies reativas de oxigênio);
- Ensaios de mutagenicidade;
- Ensaios com terapia combinada entre os extratos e quimioterápicos padrões como forma de amplificar o efeito citotóxico e seletivo dos mesmos.

Além dos ensaios complementares, uma outra medida que poderia ser adotada, seria aumentar a diluição do extrato, como forma de atenuar os erros apresentados nas curvas concentração-resposta e auxiliando num melhor cálculo do IC₅₀.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, S. O.; CAXTON-MARTINS, E. A. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* Linn.(*Annonaceae*) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Biomedical Research**, v.9, n.3, p.173-180, 2006.
- ADEWOLE, S.; OJEWOLE, J. Protective effects of *Annona muricata* Linn.(*Annonaceae*) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin treated diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.6, n.1, p.30-41, 2009.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.61, n.4, p.250-81, 2011.
- ALBERTS, B. et al. Biologia molecular da célula. In: _____. **Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.1205-1209.
- AL-DIMASSI, S.; ABOU-ANTOUN, T.; EL-SIBAI, M. Cancer cell resistance mechanisms: a mini review. **Clinical and Translational Oncology**, v.16, n.6, p.511-6, 2014.
- ALI, M. M. et al. The Prophylactic and therapeutic effects of *Momordica charantia* methanol extract through controlling different hallmarks of the hepatocarcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.98, p.491-498, 2018.
- ATCC: the essentials of life Science research – globally delivered. 2016. Disponível em:<<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 05 jan. 2018.
- BACHER, N. et al. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, v.132, n.5, p.615-622, 2006.
- BANG, W. et al. β -lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. **Oncology Reports**, v.35, n.2, p.1109-1016, 2016.
- BENSO, B. et al. Malva sylvestris Inhibits Inflammatory Response in Oral Human Cells. An In Vitro Infection Model. **PLoS One**, v.10, n.10, p.1-15, 2015.
- BORS, M. et al. Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n.9, p.2202–2211, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Câncer de mama**: é preciso falar disso. Rio de Janeiro: INCA, 2014a. Disponível em:<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/CartiIha_Outubro_Rosa2014_web.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tipos de câncer**: câncer de mama. Rio de Janeiro: INCA, 2014b. Disponível em:<[www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposde cancer/site/home/mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposde%20cancer/site/home/mama)>. Acesso em: 10 jan. 2018.

_____. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em:<http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2018.

_____. **Câncer de próstata**. Rio de Janeiro: INCA, 2017a. Disponível em:<www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>. Acesso em: 10 jan. 2018.

_____. **Câncer de fígado**. Rio de Janeiro: INCA, 2017b. Disponível em:<www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>. Acesso em: 10 jan. 2018.

_____. **Hormonioterapia**. Rio de Janeiro: INCA, 2017c. Disponível em:<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=103>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde e Anvisa. **Monografia da espécie *Malva sylvestris* L. (malva)**. Brasília, 2015b. Disponível em:<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Malva.pdf>>. Acesso: 5 abr. 2018.

BRITT, K.; ASHWORTH, A.; SMALLEY, M. Pregnancy and the risk of breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v.14, n.4, p.907-33, 2007.

CALIXTO, G.M. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v.21, n.3, p.342, 2016.

CASANOVA, L.M.; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.2, p. 575-595, 2017.

CAVALCANTE, R.S. et al. A Combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v.6, n.1, p.64-70, 2009.

CHANG, F.R. et al. New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Planta Medica**, v.69, n.3, p.241-246, 2003.

CHEN, B. et al. Relating hepatocellular carcinoma tumor samples and cell lines using gene expression data in translational research. **BMC Medical Genomics**, v.8, Suppl.2, p.S1-S105, 2015.

CHENG, A.C. et al. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.11, p.2208-2218, 2007.

CHUANG, S.C.; LA VECCHIA, C.; BOFFETTA, P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. **Cancer Letters**, v.286, n.1, p.9-14, 2009.

CONFORTI, F. et al. *In vivo* antiinflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, n.1, p.144-151, 2008.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.6, p.3670-95, 2013.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of Biological Methods**, v.2, n.1, 2015. Doi: 10.14440/jbm.2015.63.

DANIELA, A. et al. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. **Caryologia**, v.60, n.1/2, p.90-95, 2007.

DE ALENCAR, N.M. et al. Side-effects of irinotecan (CPT-11), the clinically used drug for colon cancer therapy, are eliminated in experimental animals treated with latex proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**, v.31, n.2, p.312-320, 2017.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.53, n.3, p.153-159, 2004.

DEEP, G. et al. Graviola inhibits hypoxia-induced NADPH oxidase activity in prostate cancer cells reducing their proliferation and clonogenicity. **Scientific Reports**, v.6, n.23135, p.1-14, 2016.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1/2, p.307-311, 2000.

DI STASI, L.C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.76, 2002.

DIETRICH, F. et al. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v.67, p.222-229, 2014.

DREIFUSS, A.A. et al. *Uncaria tomentosa* exerts extensive anti-neoplastic effects against the Walker-256 tumour by modulating oxidative stress and not by alkaloid activity. **PLoSOne**, v.8, n.2, p.1-14, 2013.

FAROOQI, A.A. et al. Bitter gourd (*Momordica charantia*) as a rich source of bioactive components to combat cancer naturally: Are we on the right track to fully unlock its potential as inhibitor of deregulated signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, 2018. Doi: 10.1016/j.fct.2018.05.024.

GARCÍA GIMÉNEZ, D. et al. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark on human Ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. **Planta Medica**, v.76, n.2, p.133-136, 2010.

GARCIA-HERNANDEZ, M.E.L. et al. Prostate stem cell antigen vaccination induces a long-term protective immune response against prostate cancer in the absence of autoimmunity. **Cancer Research**, v.68, n.3, p.861-869, 2008.

GARCIA PRADO, E. et al. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytochemistry**, v.14, n.4, p.280-284, 2007.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, p.S355-S363, 2014.

GOTTESMAN, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual Review of Medicine**, v.53, p.615-627, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-74, 2011.

HEITZMAN, M.E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v.66, n.1, p.5-29, 2005.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The Complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v.12, p.86-100, 2013.

HOLLIDAY, D.L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v.13, n.4, p.215, 2011.

IBRAHIM, S.R. et al. Proceraside A, a new cardiac glycoside from the root barks of *Calotropis procera* with in vitro anticancer effects. **Natural Product Research**, v.28, n.17, p.1322-1327, 2014.

INAGAKI, R. et al. Synthesis and cytotoxicity on human leukemia cells of furonaphthoquinones isolated from *Tabebuia* plants. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.61, n.6, p.670-673, 2013.

JANSEN, B.J.; DE GROOT, A. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Product Research**, v.21, n.4, p.449-477, 2004.

JOLY, A.B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. 5.ed. São Paulo: Nacional, 1979.

JOSHI, A.L. et al. *Calotropis procera* extract induces apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase in human skin melanoma (SK-MEL-2) cells. **Natural Product Research**, v.29, n.23, p.2261-2264, 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. In: _____. **A Célula cancerosa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.16, p.288-297.

JUZA, R.M.; PAULI, E.M. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. **Clinical Anatomy**, v.27, n.5, p.764-9, 2014.

KAISER, S. et al. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by cell incubation and cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **Planta Medica**, v.79, n.15, p.1413-1420, 2013.

KEE, J.Y. et al. β -lapachone inhibits lung metastasis of colorectal cancer by inducing apoptosis of CT26 cells. **Integrative Cancer Therapies**, v.16, n.4, p.585-596, 2017.

KEPLINGER, K. et al. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.23-34, 1999.

KHODABANDEHLOO, H.; ZAHEDNASAB, H.; ASHRAFI HAFEZ, A. Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v.9, n.2, e3966, 2016. Doi: 10.17795/ijcp-3966.

KIM, G.S. et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.565-571, 1998.

KOŚMIDER, A. et al. *Uncaria tomentosa* leaves decoction modulates differently ROS production in cancer and normal cells, and effects cisplatin cytotoxicity. **Molecules**, v.22, n.4, p.620, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22040620>.

KUMAR, D.; JHARIYA, A.N. Nutritional, medicinal and economical importance of corn: a mini review. **Research Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.7, p.7-8, 2013.

KUMAR, V.L.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, n.2, p.123-125, 1994.

KWON, C.W. et al. Molecular cloning and anti-invasive activity of cathepsin L propeptide-like protein from *Calotropis procera* R. Br. against cancer cells. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicine Chemistry**, v.33, n.1, p.657-664, 2018.

LEBOEUF, M. et al. The Phytochemistry of the *Annonaceae*. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p.2783-2813, 1980.

LEE, E.J. et al. β -lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v.12, n.133, p.1-15, 2015.

LEE, J. et al. Corn silk maysin induces apoptotic cell death in PC-3 prostate cancer cells via mitochondria-dependent pathway. **Life Sciences**, v.119, n.1/2, p.47-55, 2014.

LIAW, C.C. et al. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.65, n.4, p.470-475, 2002.

LIU, N. et al. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.2, n.189, p.210–217, 2016.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v.69, n.2, p.581-593, 1997.

MARKOZANNES, G. et al. Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: an umbrella review of the evidence. **European Journal of Cancer**, v.69, p.61-69, 2016.

MENDES, G.L. et al. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (*Winteraceae*). **Life Sciences**, v.63, n.5, p.369-381, 1998.

_____. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.292, n.1, p.164-172, 2000.

- MENEZES, P.F.C. et al. Photodynamic activity of different dyes. **Laser Physics**, v.17, n.4, p.468-471, 2007.
- MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SCHMITT, F.C. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostic**, v.8, n.4, p.417-434, 2008.
- MINARI, J.B.; OKELOLA, C.A.; UGOCHUKWU, N.C. Analysis of kras gene from induced pancreatic cancer rats administered with *Momordica charantia* and *Ocimum basilicum* leaf extracts. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.8, n.2, p.282-288, 2018.
- MOLNÁR, J. et al. Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.10, n.17, p.1757-1768, 2010.
- MUKHERJEE, B.; TELANG, N.; WONG, G.Y. Growth inhibition of estrogen receptor positive human breast cancer cells by Taheebo from the inner bark of *Tabebuia avellanae* tree. **International Journal of Molecular Medicine**, v.24, n.2, p.253-260, 2009.
- NIKSERESHT, M. et al. The Hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* suppresses migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-468 and MCF-7 cell lines. **Pharmacognosy Research**, v.9, n.1, p.87-95, 2017.
- OLIVEIRA, A.V. **Contribuições para o estudo químico da espécie C. Procera R. Br. (Asclepiadaceae)**. 2000. 54f. Monografia (Química Industrial) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2000.
- PADMA, V.V. An Overview of targeted cancer therapy. **Biomedicine (Taipei)**, v.5, n.4, p.19-24, 2015.
- PARK, E.H. et al. Improved antioxidative and cytotoxic activities of chamomile (*Matricaria chamomilla*) florets fermented by *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.18, n.2, p.152-160, 2017.
- PATTABIRAMAN, D.R.; WEINBERG, R.A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.13, n.7, p.497-512, 2014.
- PAZ ROBLES, C. et al. Dendocarin A: a sesquiterpene lactone from *Drimys winteri*. **Acta Crystallographica. Section C, Structural Chemistry**, v.70, p.1007-1010, 2014.
- PEREIRA-TORRES, D. et al. In vitro modulation of *Drimys winteri* bark extract and the active compound polygodial on *Salmo salar* immune genes after exposure to *Saprolegnia parasitica*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.59, p.103-108, 2016.

PERZ, J.F. et al. The Contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of Hepatology**, v.45, n.4, p.529-538, 2006.

PILARSKI, R. et al. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v.17, n.14, p.1133-1339, 2010.

PRAKASH, O. et al. Anticancer potential of plants and natural products: a review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v.1, n.6, p.104-115, 2013.

PUHR, M. et al. Inflammation, microbiota, and prostate cancer. **European Urology Focus**, v.2, n.4, p.374-382, 2016.

QAZI, A.K. et al. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. **Carcinogenesis**, v.39, n.4, p.522-533, 2018.

RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v.40/41, p.116-129, 2016.

RAZAVI, S.M. et al. Bioactivity of *Malva sylvestris* L., a medicinal plant from Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Science**, v.14, n.6, p.574-579, 2011.

RIESER, M.J. et al. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.100-108, 1996.

RIVA, L. et al. The Antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, v.21, n.4, p.2457-2461, 2001.

RUIZ, R. et al. Epidemiology and pathophysiology of pregnancy-associated breast cancer: a review. **Breast**, v.35, p.136-141, 2017.

SAMY, R.P. et al. Identification of a novel *Calotropis procera* protein that can suppress tumor growth in breast cancer through the suppression of NF- κ B pathway. **PLoS One**. v.7, n.12, p.1-14, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048514>.

SERVIER. 2018. Disponível em: <<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>>. Acesso: 5 jan. 2018.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, C.M.; MATTE, U.; GIUGLIANI, R. Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças. **Revista HCPA**, n.3, p.379-386, 2001.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: a herbal medicine of the past with a bright future (review). **Molecular Medicine Reports**, v.3, n.6, p.895-901, 2010.

STEWART, B.W. et al. **World cancer report 2014**. Switzerland: International Agency for Research on Cancer; WHO Press, 2014.

SUN, G. et al. A New triterpene from the plant of *Uncaria macrophylla*. **Molecules**. v.17, n.1, p.504–510, 2012.

SUN, S. Three new anti-proliferative annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.24, n.12, p.2773-2776, 2014.

TORRES, M.P., et al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer Letters**, v.323, n.1, p.29-40, 2012.

TSANG, N.Y. et al. The Use of naphthoquinones and furano-naphthoquinones as anti-invasive agents. **Current Medicinal Chemistry**, v.24, 2017. Doi: 10.2174/0929867324666171006131927.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **About cancer & cancer types**. Maryland. Disponível em: <www.cancer.gov/types#b>. Acesso em: 5 jan. 2018.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v.147, n.2, p.275-292, 2011.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The Dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v.6, p.334-343, 2015.

WANG, G.F. et al. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. **Antiviral Research**, v.83, n.2, p.186–190, 2009.

WANG, S. et al. *Momordica charantia*: a popular health-promoting vegetable with multifunctionality. **Food & Function**, v.8, n.5, p.1749-1762, 2017.

WOGAN, G.N.; KENSLER, T.W.; GROOPMAN, J.D. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v.29, n.2, p.249-257, 2012.

WU, Q. et al. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. **Cancer Letters**, v.347, n.2, p.159-66, 2014.

WU, X.C. et al. Protective effect of polysaccharides extracts from corn silk against cyclophosphamide induced host damages in mice bearing H22 tumors.

Zhong Yao Cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese Medicinal Materials, v.37, n.10, p.1833-1836, 2014.

XIA, J.F. et al. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line. **Drug Discovery & Therapeutics**, v.7, n.1, p.1-8, 2013.

YAJID, A.I. et al. Potential benefits of *Annona muricata* in combating cancer: a review. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v.25, n.1, p.5-15, 2018.

YANG, J. et al. Anti-hepatoma activity and mechanism of corn silk polysaccharides in H22 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p.276-280, 2014.

YANG, H.; LIU, N.; LEE, S. Ethanol extract of *Annona muricata* L induces liver cancer cell apoptosis through ROS pathway. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v.9, n.3, p.919-925, 2016.

YAP, C.V. et al. Annonacin exerts antitumor activity through induction of apoptosis and extracellular signal-regulated kinase inhibition. **Pharmacognosy Research**, v.9, n.4, p.378-383, 2017.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZHANG, Q. et al. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.173, p.48-80, 2015.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* leaves induce G(1) cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.156, p.277-289, 2014.

ANEXO I

Curva resposta do Etanol em Balb/C 3T3 clone A31

Curva resposta do etanol na linhagem celular controle BalbC definindo um intervalo de diluição seguro, em porcentagem, o qual é possível trabalhar as linhagens. No caso, foi definido o intervalo de 1% de etanol como forma segura onde o crescimento das células controle não foi alterado.