



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA CRISTINA BASTOS DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DO FLAVONOIDE BRAQUIDINA
C EM CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DU145
CULTIVADAS EM MODELO 2D E 3D**

Londrina
2021



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



LARISSA CRISTINA BASTOS DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DO FLAVONOIDE BRAQUIDINA
C EM CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DU145
CULTIVADAS EM MODELO 2D E 3D**

LARISSA CRISTINA BASTOS DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DO FLAVONOIDE BRAQUIDINA C
EM CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DU145
CULTIVADAS EM MODELO 2D E 3D**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni
Co-orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Oliveira, Larissa Cristina Bastos de.

ATIVIDADE ANTICÂNCER DO FLAVONOIDE BRAQUIDINA C EM CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DU145 CULTIVADAS EM MODELO 2D E 3D / Larissa Cristina Bastos de Oliveira. - Londrina, 2021.
101 f. : il.

Orientador: Juliana Mara Serpeloni.

Coorientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de Próstata - Tese. 2. Flavonoide - Tese. 3. Cultura celular 3D - Tese. 4. Agente anticâncer - Tese. I. Serpeloni, Juliana Mara. II. Cólus, Ilce Mara de Syllos. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

LARISSA CRISTINA BASTOS DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DO FLAVONOIDE BRAQUIDINA C
EM CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA DU145
CULTIVADAS EM MODELO 2D E 3D**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto – FCFRP – USP

Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de novembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pois tenho consciência de que se não fosse por Suas mãos que me guardaram, me sustentaram, me fortaleceram e me encorajaram durante esses últimos dois inimagináveis anos, terminar esse mestrado não seria possível. Agradeço-lhe, ainda, por Sua graça que me alcança todos os dias e pela forma como tens guiado a minha vida. Obrigada por fazer com que todas as coisas cooperem para o meu bem.

À minha família, a base que fundamenta quem eu sou e a plataforma que me impulsiona a voar mais alto. Ao meu pai, Francisco Bastos de Oliveira Filho, por me ensinar desde cedo que não há nada mais valioso do que o conhecimento e por sempre ser um exemplo de honestidade e determinação. Obrigada por todo conhecimento e por me inspirar a buscar mais.

À minha mãe, Valdirene Mendes dos Santos de Oliveira, por ser a pessoa mais gentil desse mundo, por me ensinar a olhar para as pessoas ao meu redor com amor, paciência e respeito. Obrigada por me cobrir com suas orações e por estar comigo sempre. Palavras nunca serão o suficiente para lhe agradecer e dizer o quanto você me influencia.

À minha irmã, Isabela Cristina Bastos de Oliveira, por compreender a distância física quando foi necessário e por ser uma ótima parceira das noites de série quando estávamos juntas. Poder acompanhar o seu crescimento e amadurecimento e ver quem você está se tornando é uma alegria.

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni, por ser essa pessoa incrível, bem-humorada e comprometida com tudo o que se propõe a fazer. Obrigada por toda atenção, paciência e amizade durante esses últimos anos e por sempre estar disponível quando eu precisei. Sou extremamente grata por todo aprendizado, experiência, leveza e alegria que você trouxe para essa jornada. Foi uma um prazer imenso ter você como orientadora.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, por me acolher em seu laboratório anos atrás e acreditar em mim sem ao menos me conhecer. Obrigada por todas as oportunidades concedidas e por sempre estar disposta para me auxiliar e instruir.

À Profa. Dra. Roberta Losi Guembaroviski, por todo apoio e auxílio

durante esses anos de convívio no laboratório. Obrigada por ter acreditado em mim e me apoiado durante esses últimos anos.

Agradeço à Andreza Manzato Cavichioli, uma amiga que se tornou uma verdadeira irmã, por fazer parte de todos os momentos desses últimos dois anos - mesmo que apenas através da tela do celular. Obrigada por viajar várias horas para me visitar em Londrina e por fazer com que nossa amizade permanecesse inalterada. Obrigada também por acreditar naquilo que eu carrego, por me confrontar quando necessário e por se alegrar com cada uma das minhas conquistas.

À Gabriela Mendiceli Lopes por sua gentileza e sensibilidade ao dividir um lar comigo. Obrigada por tornar as nossas sextas-feiras de hambúrguer e NBA as melhores e mais divertidas – até mesmo quando o Lakers perdia.

À Aline Esposito por ser essa pessoa tão especial e que sempre está ao meu lado quando eu preciso. Sou muito grata por toda alegria e espontaneidade que você traz para a minha vida.

À Gabriela de Fátima Pereira Weiss pela amizade e confiança durante esses últimos anos. Obrigada por todas as nossas conversas e por sempre estar disposta a me ouvir.

A todos do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) da UEL, especialmente Monyse de Nóbrega, Érica Pereira Romão, Andressa Yuri Fujiike e Milene R. S. Rodrigues, por toda amizade e incentivo. Meninas, obrigada por sempre estarem dispostas a me ajudar e me ouvir e por fazerem dos nossos intervalos muito divertidos. Minha gratidão a vocês!

Ao Diego Luís Ribeiro, que dispôs de seu tempo em Londrina para me ajudar no que fosse necessário, me ensinar novas técnicas e me incentivar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao CNPq pelo auxílio financeiro durante esses anos (processos nº 426246/2018-7 e 401516/2016-4).

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, à Universidade Estadual de Londrina e a todos os docentes vinculados por toda dedicação e contribuição para a minha formação profissional.

A vocês, a minha mais profunda gratidão.

*“Faith is taking the first step
even when you don’t see the
whole staircase.”*

– Martin Luther King

OLIVEIRA, Larissa Cristina Bastos de. **Atividade anticâncer do flavonoide braquidina C em células tumorais de próstata DU145 cultivadas em modelo 2D e 3D**. 2021. 101 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, Londrina.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e, juntamente com os desafios apresentados pela quimioresistência, tem despertado o interesse por fitoquímicos que apresentem propriedades quimioterápicas. *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann é uma espécie vegetal nativa do cerrado brasileiro cujo potencial anticâncer deve-se principalmente ao seu efeito antiproliferativo, anti-inflamatório e citotóxico, demonstrados em estudos anteriores. A braquidina C (BrC), flavonoide isolado a partir das raízes dessa espécie vegetal, foi avaliada nesse estudo quanto aos seus efeitos sobre a viabilidade, proliferação e migração de células de próstata DU145 cultivadas em modelos 2D e 3D *in vitro*. O efeito da BrC na viabilidade celular foi avaliado pelos ensaios de redução de resazurina e liberação de lactato desidrogenase (LDH) em cultura de células 2D (0,24-30,72 μM) e 3D (5-60 μM). Após 24 h de tratamento, a BrC reduziu a viabilidade das células DU145 em ambos os modelos com valores de IC50 iguais a 47,31 (2D) e 229,8 μM (3D). Em EMTs de próstata esse efeito mostrou-se tempo-dependente com valores de IC50 iguais a 229,8, 210,5, 116,1 e 65,02 μM após, respectivamente, 24, 48, 72 e 96 h de tratamento. Após 72 h de tratamento, observou-se a redução da viabilidade celular com a BrC nas concentrações de 30,72 μM (2D) e 60 μM (3D) no ensaio do LDH. No modelo bidimensional, a BrC não alterou a proliferação das células DU145. Na avaliação dos esferoides, após 11 dias de tratamento, a BrC (5 - 60 μM) interferiu no crescimento, morfologia, integridade e volume dos EMTs. A redução da viabilidade celular induzida pela BrC parece não estar relacionada à indução de espécies reativas, como demonstrado por meio da utilização da sonda CM-H2DCFDA. A BrC reduziu a migração e a invasão das células DU145 no modelo 2D (6,00 μM) e a migração celular no modelo 3D (5-60 μM). Os mecanismos pelos quais a BrC reduziu a viabilidade celular foram avaliados por meio da expressão de genes (RT-qPCR) e proteínas (*western blotting*). Na avaliação da expressão gênica após 48 h de tratamento, BrC (50 μM) regulou positivamente os genes *CASP3* e *TNF- α* e negativamente o gene *BIRC5*, que codifica a proteína anti-apoptótica survivina. O gene *Nkx3.1*, um gene supressor tumoral relacionado com as vias de proliferação celular, foi regulado positivamente pela BrC (5 e 50 μM). Na avaliação da expressão proteica, BrC (60 μM) aumentou a expressão de *CASP7* e *BAX* enquanto reduziu a expressão de *TNF- α* . A BrC (5-60 μM) interferiu nos processos migratórios das células DU145 em EMTs após 48 h de tratamento, diminuindo a área de migração em relação ao grupo controle. A redução na capacidade migratória parece estar relacionada com a modulação negativa dos genes *MMP9*, *MMP11* e *ITGAM* e regulação positiva de *CDH1*. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a BrC afeta a viabilidade, proliferação e migração de células DU145 em modelos 2D e 3D, contribuindo para a busca de alternativas terapêuticas contra o câncer de próstata metastático.

Palavras-chave: anticâncer; fitoquímicos; esferoides; metástase; quimioprevenção.

OLIVEIRA, Larissa Cristina Bastos de. **Anticancer activity of the flavonoid brachyidin C in DU145 prostate tumor cells cultivated in 2D and 3D model.** 2021. 101 p. Dissertation presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, State University of Londrina, as a requirement for obtaining the title of Master, Londrina.

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death worldwide and, together with the challenges presented by chemoresistance, it has raised interest in phytochemicals that have chemotherapeutic properties. *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann is a plant species native from the Brazilian cerrado whose anticancer potential is mainly due to its antiproliferative, anti-inflammatory and cytotoxic effects, as demonstrated in previous studies. Brachyidin C (BrC), a flavonoid isolated from the roots of this plant, was evaluated in this study for its effects on the viability, proliferation, and migration of DU145 prostate cells cultivated in 2D and 3D *in vitro* models. The effect of BrC on cell viability was evaluated by resazurin reduction and lactate dehydrogenase (LDH) release assays in 2D (0.24-30.72 μM) and 3D (5-60 μM) cell cultures. After 24 h of treatment, BrC reduced the viability of DU145 cells in both models with calculated IC₅₀ of 47.31 (2D) and 229.8 μM (3D). In prostate MCTS, this effect was time-dependent with calculated IC₅₀ of 229.8, 210.5, 116.1 and 65.02 μM after, respectively, 24, 48, 72 and 96 h of treatment. After 72 h of treatment, a reduction in cell viability was observed with BrC 30.72 μM (2D) and 60 μM (3D) in the LDH assay. In the evaluation of the MCTS, after 11 days of treatment, BrC (5 - 60 μM) interfered with the growth, morphology, integrity, and volume of the MCTS. The reduction in cell viability induced by BrC seems not to be due to the induction of reactive species, as demonstrated through the use of the CM-H₂DCFDA probe. BrC reduced the migration and invasion of DU145 cells in the 2D model (6.00 μM) and cell migration in the 3D model (5-60 μM). The mechanisms by which BrC reduced cell viability were evaluated through the expression of genes (RT-qPCR) and proteins (western blotting). In the assessment of gene expression after 48 h of treatment, BrC (50 μM) upregulated the *CASP3* and *TNF- α* genes and downregulated the *BIRC5* gene, which encodes the anti-apoptotic protein survivin. The *Nkx3.1* gene, a tumor suppressor gene related to cell proliferation pathways, was upregulated by BrC (5 and 50 μM). In the evaluation of protein expression, BrC (60 μM) increased the expression of *CASP7* and *BAX* while it reduced the expression of *TNF- α* . BrC (5-60 μM) interfered with the migratory processes of DU145 cells in MCTS after 48 h of treatment, reducing the area of migration compared to the control group. The reduction in migratory capacity seems to be related to downregulation of *MMP9*, *MMP11* and *ITGAM* genes and upregulation of *CDH1*. The results obtained in this study demonstrate that BrC affects the viability, proliferation, and migration of DU145 cells in 2D and 3D models, contributing to the search for therapeutic alternatives against metastatic prostate cancer.

Key-words: anticancer; phytochemicals; spheroids; metastasis; chemoprevention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das regiões da próstata.....	20
Figura 2 – Células epiteliais prostáticas podem adquirir fenótipo mesenquimal por meio da regulação negativa de marcadores epiteliais como E-caderina, zônula ocludente-1 (ZO-1), ocludinas e citoqueratinas e da regulação positiva de marcadores mesenquimais como N-caderinas, vimentina e metaloproteinases (MMPs)	22
Figura 3 – Representação química básica de flavonoides e suas principais subfamílias	24
Figura 4 – Fotografia das partes aéreas da espécie vegetal <i>Fridericia platyphylla</i> (Cham.) L.G. Lohmann	25
Figura 5 – Estrutura química das braquidinas com destaque em vermelho para os radicais que as diferenciam	26
Figura 6 – Formação de esferoides multicelulares tumorais não-aderentes ao substrato.....	29
Figura 7 – Representação de um esferoide e seus gradientes de oxigênio (O ₂), nutrientes, pH e gás carbônico (CO ₂), assim como suas zonas proliferativa, quiescente e necrótica	30
Figura 8 – Delineamento experimental dos ensaios biológicos realizados com células tumorais de próstata (DU145) em modelo 3D.....	36
Figura 9 – Representação das etapas envolvidas no processo de extração, tratamento com DNase, anelamento de primers, reação da transcrição reversa e reação de PCR em tempo real.....	43

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO I

- Figure 1** – Chemical structure of brachydins A, B and C50
- Figure 2** – Representation of a DU145 spheroid with its oxygen (O₂), nutritional, pH, and carbon dioxide (CO₂) gradients, as well as its proliferative, quiescent, and necrotic zones.51
- Figure 3** – (a) Chemical structure of the flavone Brachyidin C (CID: 102339052). (b) Cell viability of DU145 multicellular tumoral spheroids (MCTS) after 24, 48, 72, and 96 h of treatment with Brachyidin C (5 to 60 μM), solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), and positive control (docetaxel, DT 100 μM). The cell viability was measured by the resazurin assay. (c) calculated IC₅₀ values of Brachyidin C in MCTS after different times of treatment. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as a mean ± SD. *Significantly different from SV ($p \leq 0.05$), ANOVA followed by Tukey's post-test59
- Figure 4** – LDH release of DU145 cultured in (a) 2D model after 24 h and (b) multicellular tumoral spheroids after 72 h of treatment with Brachyidin C, solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), docetaxel (DT 100 μM), and positive control (PC, 100% cytotoxicity). The LDH levels in the culture medium were measured with a lactate dehydrogenase (LDH) assay kit. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as mean ± SD. *Significantly different from solvent control ($p \leq 0.05$), ANOVA followed by Tukey's post-test.....59
- Figure 5** – (a) Surviving fraction (%) of DU145 prostate cells after treatments with solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), docetaxel (DT, 2 mM) and brachyidin C (0.24, 1.50, 6.00, and 15.34 μM) in the clonogenic assay. Cell proliferation growth curves of DU145 cells treated with SV and BrC for 96 h as assessed by (b) the number of cells and (c) quantification of total proteins. Data represent the mean ± standard deviation obtained in biological triplicates (N=3). * $p \leq 0.05$ vs. SV group (DMSO 0.5%) after ANOVA followed by Tukey's test.60
- Figure 6** – (a) Volume (μm³) of DU145 multicellular tumoral spheroids (MCTS) treated for 11 days with Brachyidin C (5 to 60 μM), solvent vehicle

(SV, DMSO 0.25%), and positive control (docetaxel, DT100 μM). The points represent the average of the volume covered by the spheroids (N = 3). (b) Representative images of MCTS growth and integrity after treatment with SV, DT 100 μM , and BrC (10, 50, and 60 μM). Original 40x magnification. Bar represents 100 μm . (c) Cell viability on day 11 measured by the resazurin assay. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as a mean \pm SD. *Statistically different from the SV control on the day of analysis. ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$).....61

Figure 7 – Production of reactive species detected by the fluorescent probe CM-H₂DCFDA in DU145 cell culture in (a) 2D and (b) multicellular tumoral spheroids treated with solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), Brachydin C, or positive control (PC, 1mM, hydrogen peroxide for 30 min.) *Statistically different from the SV. ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$)62

Figure 8 – BrC impaired the migration of DU145 cells in 2D cultures. Percentage of (a) wound area after different times of treatment (0, 24, and 48 h). b) Representative figures in 4X objective. Percentage of (c) migrated and (d) invaded DU145 cells in transwell chambers after 24 h of treatment with BrC (3.84 and 6.00 μM) and solvent vehicle (SV; DMSO 0.25%) and representative figures 10X (e) migrated and (f) invaded cells. The bars represent the mean \pm standard deviation (sum of 4 fields in the membrane in 10X objective). All measurements were carried out in biological triplicates and the data are shown as mean \pm standard deviation. *Significantly different from SV control of the respective time of treatment, ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$)63

Figure 9 – (a) Area of cell migration (μm^2) from the multicellular tumoral spheroids in the extracellular matrix (ECM®) evaluated 0, 24, and 48 h after treatment with Brachydin C (BrC 5 to 60 μM) and solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%). The bars represent the mean \pm standard deviation of the area covered by the spheroid and cell migration. *Statistically different from the SV group. ANOVA and Dunnett's post-test, ($p \leq 0.05$). (b) Representative images of DU145 MCTS cell

migration area. Original 40x magnification. Bar represents 100 μm64

Figure 10 –Quantitative real time polymerase chain reaction of genes related to (a) cell death, (b) cell proliferation, and (c) cell adhesion and migration evaluated in DU145 multicellular tumoral spheroids after 48 h of treatment with solvent group (SV, DMSO 0.25%) and Brachydin C (5 and 50 μM). Bars represent mean \pm standard deviation. *Fold change of the target gene differed from the SV group. Student’s t-test, $p \leq 0.05$. The *RPS18*, *GAPDH*, and *HPRT1* were used as reference genes65

Figure 11 –Modulation in the expression of proteins involved in cell death by Brachydin C. Western blotting analysis in homogenates isolated from DU145 multicellular tumoral spheroids treated with Brachydin C (50 and 60 μM) or solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%) for 72 h. *Statistically different from the SV group. Student’s t-test, $p \leq 0.05$. β -Actin was used as a reference protein66

Figure 12 –Graphical abstract of the Brachydin C activities in 2D and 3D models of prostate cancer. Cell death was induced by BrC, whereas cell proliferation, migration, and invasion were decreased72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	<i>do inglês, BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BCL-2	<i>do inglês, BCL2 Apoptosis Regulator</i>
BIRC5	<i>do inglês, Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>
BrC	Braquidina C
CaP	Câncer de próstata
CASP3	Caspase-3
CASP9	Caspase-9
CD31	<i>do inglês, Cluster de diferenciação 31</i>
CDH1	<i>do inglês, Cadherin 1 protein</i>
CTCs	Células tumorais circulantes
CTDs	Células tumorais disseminadas
DCF	Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EGF	<i>do inglês, Epidermal growth factor</i>
EMTs	Esferoides multicelulares tumorais
ER	Espécies reativas
GAPDH	<i>do inglês, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPRT1	<i>do inglês, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IGF-1	<i>do inglês, Insulin-like growth factor-1</i>

IGF-1-R	<i>do inglês, Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
ITGAM	<i>do inglês, Integrin subunit alpha M</i>
LAMON	Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
LDH	Lactato desidrogenase
LDS	Dodecil sulfato de lítio
MCTS	<i>do inglês, Multicellular tumor spheroid</i>
MMP11	<i>do inglês, Matrix Metallopeptidase 11</i>
MMP2	<i>do inglês, Matrix Metallopeptidase 2</i>
MMP9	<i>do inglês, Matrix Metallopeptidase 9</i>
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NFκB	<i>do inglês, Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PSA	Antígeno prostático específico
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RIPA	<i>do inglês, Radioimmuno Precipitation Assay</i>
RSP18	<i>do inglês, Ribosomal Protein S18</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	<i>do inglês, Roswell Park Memorial Institute médium</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
SBF	Soro bovino fetal
TGF-α	<i>do inglês, Transforming Growth Factor Alpha protein</i>
TP53	<i>do inglês, Tumor Protein P53 gene</i>
UFMA	Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CÂNCER DE PRÓSTATA.....	19
2.2	QUIMIORESISTÊNCIA E DOENÇA METASTÁTICA	21
2.3	POTENCIAL ANTICÂNCER DOS FITOQUÍMICOS	23
2.4	CULTURA DE CÉLULAS EM MODELOS 3D NO ESTUDO DO CÂNCER	27
2.5	MECANISMO DE AÇÃO DE FITOQUÍMICOS AVALIADOS EM CULTURA DE CÉLULAS EM MODELOS 3D	31
3	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL DE MÉTODOS	35
4.1	LINHAGEM CELULAR E CULTIVO.....	35
4.2	BRAQUIDINA C	35
4.3	CULTIVO DE ESFEROIDES MULTICELULARES TUMORAIS (EMTS).....	35
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.5	ENSAIO DE REDUÇÃO DA RESAZURINA.....	37
4.6	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	38
4.7	PROLIFERAÇÃO CELULAR EM MODELOS 2D E 3D	38
4.7.1	Ensaio Clonogênico em Monocamada de Células DU145	38
4.7.2	Curvas de Proliferação Celular	39
4.7.3	Avaliação de Crescimento, Morfologia e Integridade dos Esferoides Multicelulares Tumorais.....	39
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULARES	40
4.9	MIGRAÇÃO CELULAR EM MODELOS 2D E 3D	40
4.9.1	Migração Vertical 2D (Transwell).....	40
4.9.2	Invasão Vertical 2D (Transwell)	41
4.9.3	Migração Horizontal (Cicatrização).....	41
4.9.4	Migração em Modelo 3D.....	42
4.10	AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	42
4.11	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING	44

4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	CAPÍTULO I	47
6	CONCLUSÃO GERAL	85
7	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O câncer destaca-se entre as principais doenças que acometem a população mundial, compreendendo uma das mais relevantes causas de morbidade e mortalidade populacional. Atualmente, diversas estratégias terapêuticas, invasivas e não-invasivas, são utilizadas para o seu tratamento como por exemplo, cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e quimioterapia. Dentre essas, a quimioterapia é uma das principais abordagens utilizadas, porém, devido à sua reduzida seletividade e quimioresistência, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer permanece necessário (RIZEQ *et al.*, 2020; ZUBAIR *et al.*, 2017).

Tradicional e historicamente, as espécies vegetais são utilizadas em preparações terapêuticas contra diversos tipos de doença e o aprimoramento de ensaios e técnicas analíticas tem viabilizado o isolamento de fitoquímicos e o desenvolvimento de agentes terapêuticos como antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e agentes anticâncer (CHOUDHARI *et al.*, 2020; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Os fitoquímicos são produtos do metabolismo secundário de plantas, divididos em 4 grupos, alcaloides, terpenoides, taninos e flavonoides, entre eles, destacam-se como mais abundantes os flavonoides. Esses fitoquímicos podem ser encontrados em frutas, cereais, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e flores, bem como em bebidas como chás e vinhos, sendo responsáveis, principalmente, pela coloração de flores e frutos (KANADASWAMI *et al.*, 2005). A aplicação dos flavonoides na terapia contra o câncer despertou interesse após ser observada uma correlação inversa entre o seu consumo e a ocorrência dessa doença. Além disso, outros estudos demonstraram propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiproliferativas, antimetastáticas e pró-apoptóticas, que podem explicar a ação anticâncer desses fitoquímicos (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020; ZUBAIR *et al.*, 2017).

Dessa forma, iniciativas que visam investigar as ações biológicas dos flavonoides contra o câncer têm se destacado nos últimos anos. Da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann, típica do cerrado brasileiro, foram isolados três flavonoides diméricos glicosilados inéditos: as braquidinas A, B e C que têm sido investigadas quanto às suas atividades biológicas em diferentes modelos experimentais. As três braquidinas foram estudadas quanto aos seus efeitos

antinociceptivo *in vivo* (ROCHA *et al.*, 2011), anti-*Trypanosoma cruzi* *in vivo* e *in vitro* (ROCHA *et al.*, 2014) e anti-*Leishmania* (ROCHA *et al.*, 2018) e os seus promissores resultados incentivaram a continuidade dos estudos com esses flavonoides.

Os primeiros passos para a avaliação das atividades biológicas de compostos com potencial anticâncer compreendem os ensaios *in vitro* que utilizam modelos de cultura celular. Na cultura bidimensional (2D), modelo tradicionalmente empregado, as células crescem em uma monocamada plana aderida a um substrato sólido, sem que se estabeleçam as interações célula-célula e célula-matriz típicas dos tumores. Por esse motivo, apenas uma pequena parcela de todos os compostos com potencial anticâncer avaliados nesse modelo de cultura são bem-sucedidos nos ensaios clínicos, indicando a necessidade de aprimoramento desse modelo para que a triagem desses agentes torne-se mais eficiente (CHAICHAROENAUDOMRUNG; KUNHORM; NOISA, 2019; LAHLOU, 2007).

Para suprir a lacuna entre estudos *in vitro* e ensaios clínicos, a utilização dos modelos tridimensionais (3D) destaca-se por permitir uma melhor mimetização do microambiente tumoral com suas interações célula-célula e célula-matriz preservadas, aproximando esses modelos experimentais dos modelos pré-clínicos que utilizam animais, bem como dos tumores de pacientes (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as ações biológicas do flavonoide braquidina C em células tumorais de próstata cultivadas em modelo bidimensional (2D) e tridimensional (3D), visando contribuir com novas estratégias de aplicação de fitoquímicos contra o câncer de próstata e colaborar para o desenvolvimento de terapias mais seletivas e com menos efeitos adversos para essa doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

Câncer é um termo utilizado para definir um conjunto de doenças caracterizado pela proliferação descontrolada de células em decorrência da interrupção ou disfunção das vias de sinalização que normalmente mantêm esse mecanismo sob rigoroso controle (MCCAULEY, ZIVANOVIC e SKROPETA, 2013). Juntas, essas doenças compreendem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, de forma que espera-se até o ano de 2030, cerca de 22 milhões de novos casos de câncer e, anualmente, 13 milhões de mortes relacionadas a esta doença (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2015).

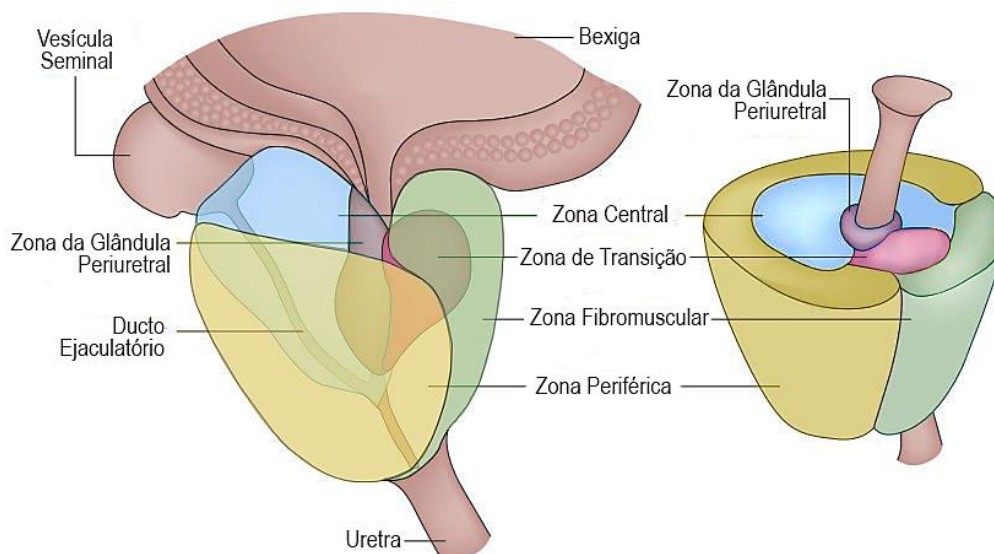
Após o diagnóstico, as principais formas de tratamento para essa patologia são processos cirúrgicos, terapias químicas, físicas e imunoterapias. Essas opções demonstram alguma eficiência para diferentes tipos de cânceres, porém, apresentam limitações relevantes como a não seletividade para as células tumorais e, por consequência, efeitos adversos à saúde dos pacientes (BONAM *et al.*, 2018; SCHATTEEN, 2018).

Entre os principais tipos de cânceres não cutâneos que acometem a população masculina, encontra-se o câncer de próstata (CaP), a segunda neoplasia maligna mais frequente em homens em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2018; WOODRUM *et al.*, 2017). A próstata é a maior glândula exócrina do trato urogenital masculino e compõe o sistema de síntese e liberação do fluido espermático juntamente com as vesículas seminais (SEISEN *et al.*, 2012). Está posicionada abaixo da bexiga e circunda uma porção da uretra denominada uretra prostática (TOIVANEN e SHEN, 2017). A próstata é dividida em quatro zonas (Figura 1) que apresentam características histológicas particulares: zona de transição, central e periférica, que são zonas glandulares e uma quarta zona não glandular, o estroma fibromuscular anterior (FINE; REUTER, 2012). A maior zona prostática é a zona periférica, local onde a maioria (70%) dos carcinomas de próstata se desenvolve (LEE, AKIN-OLUGBADE e KIRSCHENBAUM, 2011).

A detecção do CaP pode ser feita com base em concentrações plasmáticas elevadas do antígeno prostático específico (PSA), uma serina protease

liberada no líquido seminal responsável pela liquefação do sêmen (RAWLA, 2019). Esse antígeno é expresso no tecido da próstata normal, porém, em situações anormais, como no CaP, hiperplasia benigna e prostatite, encontra-se elevado na corrente sanguínea (PSA > 4 ng/mL) (PATIL e GAITONDE, 2016).

Figura 1: Representação das regiões da próstata



Fonte: Modificada de Chughtai *et al.* (2016).

As taxas de incidência e mortalidade do CaP estão fortemente relacionadas à idade, sendo a maior ocorrência observada após a quinta década de vida, com média de 66 anos ao diagnóstico (PATIL, GAITONDE e 2016; RAWLA, 2019). O CaP se caracteriza como uma doença complexa e heterogênea, a qual além da idade, pode ter o seu desenvolvimento afetado por outros fatores, dentre os quais se destacam etnicidade e hereditariedade (NGUYEN-NIELSEN e BORRE, 2016).

Considerando que a idade é um dos fatores de risco para o CaP, com o aumento significativo da expectativa de vida espera-se que o número de homens acometidos por esse tipo de câncer aumente nos próximos anos. Além disso, devido às limitações das atuais terapias e seleção de células resistentes, torna-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficientes com efeitos adversos reduzidos (MIRAHMADI *et al.*, 2020).

2.2 QUIMIORESISTÊNCIA E DOENÇA METASTÁTICA

Apesar das repostas iniciais positivas em decorrência da quimioterapia, muitos pacientes apresentam um relapso com relação ao tratamento, exemplificado pela progressão tumoral e metastização, devido a quimioresistência (MAJI *et al.*, 2018). Cerca de 90% da mortalidade em decorrência do câncer é devido à associação com a doença metastática (ZEESHAN e MUTAHIR, 2017). Dessa forma, as alterações genéticas envolvidas na metastização tumoral têm sido extensivamente investigadas nos últimos anos (LINDER *et al.*, 2018; LV *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2017).

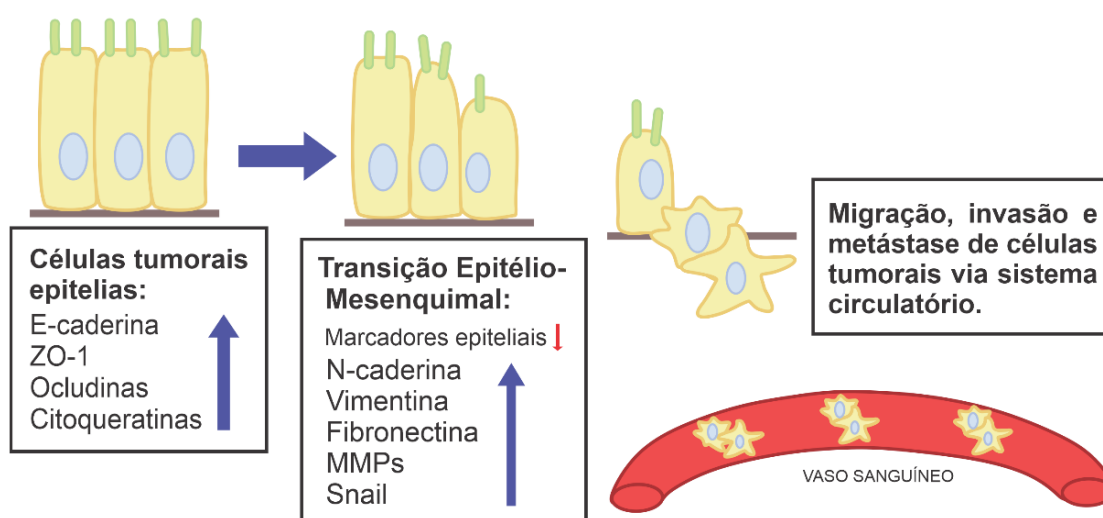
A metástase é um processo complexo que compreende uma cascata de alterações nas células tumorais e em suas interações com o microambiente, o que lhes confere um potencial invasor. Este potencial consiste na invasão das células do tumor primário nos tecidos circundantes por meio da transição epitélio-mesenquimal, incluindo o sistema circulatório e/ou linfático e promovendo a sobrevivência das células tumorais circulantes (CTCs). Por fim, ocorre o extravasamento das células do sistema circulatório para os tecidos distantes e a proliferação de colônias microscópicas em lesões metastáticas clinicamente detectáveis (LAMBERT, PATTABIRAMAN e WEINBERG, 2017).

A transição epitélio-mesenquimal é um processo biológico que ocorre normalmente durante a embriogênese humana e é fundamental para o desenvolvimento inicial do organismo. No entanto, esse mecanismo é uma das principais características das células tumorais capazes de migrar e colonizar outros tecidos, desempenhando um papel crítico na metastização de diferentes tipos de câncer. Esse mecanismo confere às células tumorais uma maior motilidade e capacidade de invasão e de degradação da matriz extracelular circundante (LIU, Q. *et al.*, 2017; RYCAJ *et al.*, 2017).

De forma geral, as principais alterações celulares e moleculares que ocorrem durante a transição epitélio-mesenquimal consistem na: i) perda das junções entre as células; ii) alteração na polaridade e consequente reorganização do citoesqueleto; iii) alteração na morfologia celular devido à regulação negativa de genes que codificam proteínas relacionadas ao fenótipo epitelial, como E-caderinas, claudinas, ocludinas, CD31, somada à regulação positiva dos genes que conferem um fenótipo mesenquimal às células, como genes das proteínas N-caderinas e de

outras moléculas de adesão celular (Figura 2) e no iv) aumento das protrusões celulares e da capacidade de degradar proteínas da matriz extracelular devido ao aumento da expressão de proteases como as metaloproteinases MMP2 e MMP9, que contribuem, respectivamente, para o aumento da motilidade e capacidade de invasão, (LAMOUILLE, XU e DERYNCK, 2014; NISTICÒ, BISSELL e RADISKY, 2012; ZEESHAN e MUTAHIR, 2017).

Figura 2: Células epiteliais prostáticas podem adquirir fenótipo mesenquimal por meio da regulação negativa de marcadores epiteliais como E-caderina, zônula ocludente-1 (ZO-1), ocludinas e citoqueratinas e da regulação positiva de marcadores mesenquimais como N-caderinas, vimentina e metaloproteinases (MMPs).



Fonte: Modificado de Odero-Marah et al. (2018).

No câncer de próstata, a progressão tumoral está associada ao complexo mecanismo metastático onde os linfonodos próximos ao tumor primário, seguido por ossos, fígado e pulmão, são os principais órgãos atingidos e colonizados (RYCAJ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018).

O processo metastático e a quimioresistência, por muito tempo, foram estudados de forma isolada apesar do fato de normalmente ocorrerem juntos durante a progressão tumoral (SHAH *et al.*, 2020) e nesse contexto, a TEM tem sido relacionada com esses dois relevantes mecanismos (MENG e WU, 2012). A interação entre esses processos tem sido demonstrada através de duas observações nas quais i) células que foram selecionadas pelo tratamento quimioterápico possuem um maior potencial metastático quando comparadas com células não resistentes e ii) células

que compõe um tumor secundário (metastizado) possuem uma maior resistência à quimioterapia quando comparadas com células do tumor primário (LIANG, MCDONNELL e CLYNES, 2005).

Diversos mecanismos podem estar associados com a resistência às drogas pelas células tumorais os quais incluem, inibição das vias de morte celular, redução na distribuição de drogas, alterações no microambiente tumoral, modulação na expressão de genes supressores tumorais e oncogenes, falha no sistema de reparo do DNA, indução da transição epitélio-mesenquimal e ocorrência das células tronco tumorais (JING *et al.*, 2020).

No câncer de próstata, a TEM desempenha importante papel nos mecanismos de quimioresistência e metástase os quais, apesar dos avanços no desenvolvimento de agentes anticâncer nas últimas décadas, permanecem como grandes desafios para as estratégias terapêuticas (FABBRI *et al.*, 2021; XIE, LIN e HAO, 2021).

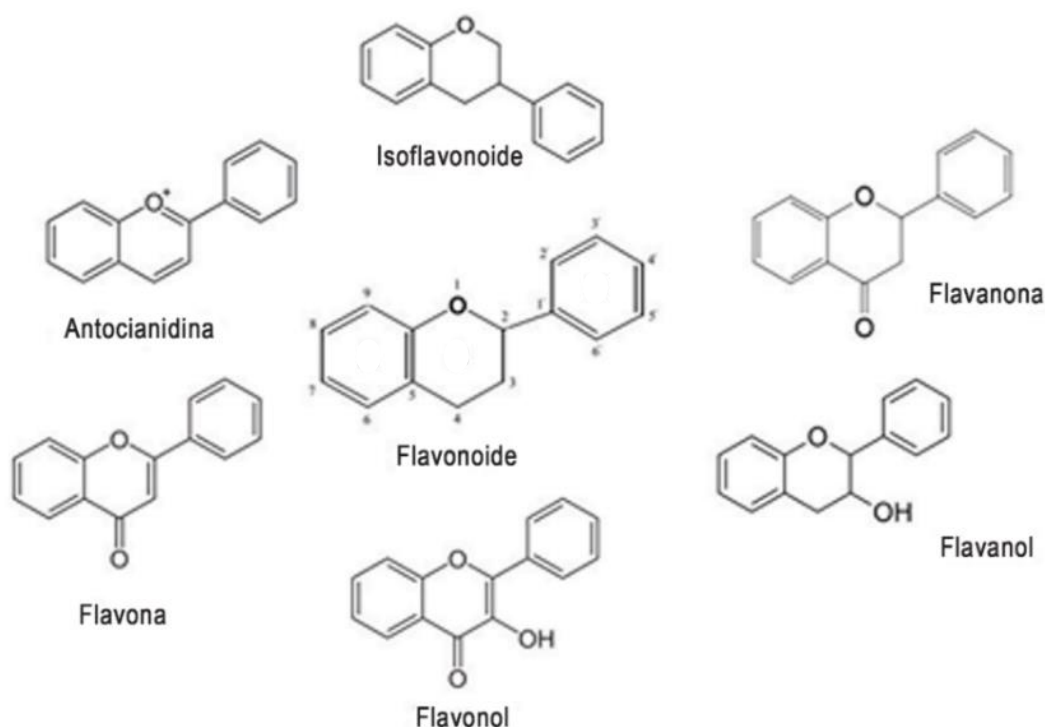
2.3 POTENCIAL ANTICÂNCER DOS FITOQUÍMICOS

Atualmente, os medicamentos de origem natural ou seus derivados correspondem a mais de 60% dos compostos anticâncer utilizados na prática clínica. Os alcaloides da vinca, os taxanos (paclitaxel e docetaxel) e as antraciclina (doxorubicina, daunorrubicina, idiopática, epirotubina) são exemplos relevantes de compostos com ação anticâncer desenvolvidos a partir de produtos naturais (EFFERTH *et al.*, 2017; KOOTI *et al.*, 2017; NEWMAN e CRAGG, 2020). Os produtos naturais de origem vegetal são, há muito tempo, fonte de preparações medicinais para diversos fins. Os avanços da química orgânica e das análises químicas possibilitaram a investigação dos componentes ativos dessas plantas medicinais, contribuindo para o avanço na utilização dos fitoquímicos como fármacos por meio do isolamento e purificação de inúmeros princípios ativos (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

Os fitoquímicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, que não exercem papel direto no seu crescimento e são constituídos por alcaloides, terpenoides, taninos e flavonoides (ABOTALEB *et al.*, 2019; KOOTI *et al.*, 2017). Os flavonoides estão presentes em todas as espécies vegetais e compreendem um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos encontrados em frutas, flores, cacau, chás, vinhos e outras fontes vegetais onde são geralmente responsáveis por sua cor

e sabor (KUMAR e PANDEY, 2013; PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016). Eles são divididos em uma variedade de subclasses (Figura 3) como as flavonas, flavonois, flavanonas, flavanonois, flavanois (ou catequinas), antocianinas e chalconas, que possuem em comum em sua estrutura química dois anéis de benzeno conectados por uma ponte de três carbonos (AMAWI *et al.*, 2017; HAVSTEEN, 2002).

Figura 3: Representação química básica de flavonoides e suas principais subfamílias.



Fonte: Modificado de Kopustinskiene *et al.* (2020).

O potencial anticâncer dos flavonoides deve-se, principalmente, às suas ações antiproliferativa, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica (CARRIZZO *et al.*, 2020; KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, observaram o potencial quimioterápico dos flavonoides em diferentes tipos de câncer, como por exemplo, em modelos experimentais de câncer de pulmão (HAN *et al.*, 2020), mama (KASIRI *et al.*, 2020), leucemia (BRISDELLI *et al.*, 2020), pâncreas, cervical, ovário e próstata (VEERAMUTHU *et al.*, 2017).

Estudos epidemiológicos também demonstraram uma correlação inversa entre o consumo de flavonoides por meio de uma dieta rica em frutas e vegetais e o CaP (GEYBELS *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2003; REALE *et al.*, 2018;

RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*, 2019). Os resultados obtidos a partir dessas observações corroboram os estudos que investigaram *in vitro* e *in vivo* as atividades quimioterápicas dos flavonoides em modelos de CaP como inibidores de angiogênese (VEERAMUTHU *et al.*, 2017), reguladores de receptores de andrógeno (CHEN *et al.*, 2008), agentes citotóxicos (MELLADO *et al.*, 2019) e antiproliferativos (ZARMOUH *et al.*, 2020).

Dessa forma, os fitoquímicos e seus derivados presentes nas espécies vegetais surgem no atual cenário como opções promissoras para melhorar a eficiência das terapias anticâncer (CHOUDHARI *et al.*, 2020). A espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann, sinônimo de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (Figura 4), encontrada principalmente no cerrado brasileiro, é identificada por suas flores vistosas e popularmente é conhecida como “tinteiro”, “cipó-una” ou “cervejinha do campo”. Tradicionalmente, as raízes dessa planta são utilizadas em preparações de chás para tratamento de cálculos renais e artrite (LOHMANN, 2006). Em trabalho recente publicado por nosso grupo de pesquisa, foi possível observar o efeito citotóxico e antiproliferativo desse extrato em células gástricas tumorais *in vitro* (SERPELONI *et al.*, 2020).

Figura 4: Fotografia das partes aéreas da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann.

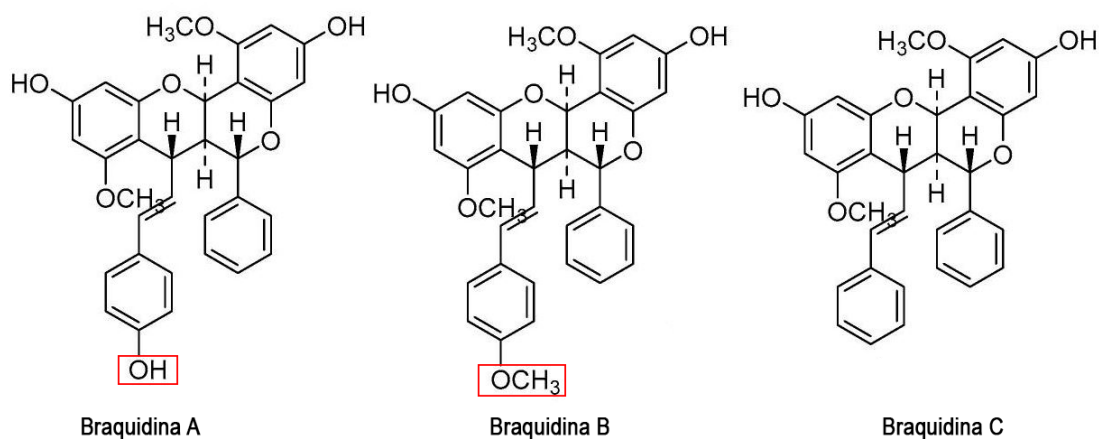


Fonte: Salles (2007).

A partir da fração diclorometano do extrato da raiz de *F. platyphylla*, foram isolados de forma inédita três flavonoides diméricos, as braquidinas A, B e C

(Figura 5). As três braquidinas diferem em suas estruturas quanto ao seu radical: a braquidina A possui um grupo hidroxila, braquidina B um grupo metoxil, enquanto a braquidina C não possui radical no anel aromático. Após o isolamento por Rocha *et al.* (2014), esses compostos foram utilizados (em combinação ou isolados) a fim de determinar suas atividades biológicas em diferentes modelos experimentais.

Figura 5: Estrutura química das braquidinas com destaque em vermelho para os radicais que as diferenciam



Fonte: Modificada de Rodrigues *et al.* (2017).

As braquidinas A, B e C combinadas demonstraram efeito antinociceptivo *in vivo* (RODRIGUES *et al.*, 2017); quando usadas isoladamente as braquidinas B e C exerceram ação anti-*trypanosoma cruzi in vivo* e *in vitro*, com maior potencial inibidor para o parasita intracelular (ROCHA *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* realizados por Rocha *et al.* (2018) também demonstraram os efeitos das braquidinas B e C isoladas contra *Leishmania* sp. Andrade e colaboradores (2020) observaram a atividade antimicrobiana da braquidina B contra *Staphylococcus aureus* por meio da inibição do gene que codifica a bomba de efluxo de drogas NorA. Recentemente, em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi observada ainda a ação citotóxica das braquidinas A, B e C, quando utilizadas isoladamente em células humanas prostáticas tumorais, PC-3 (NUNES *et al.*, 2020).

Dessa forma, os resultados obtidos com o extrato bruto da *Fridericia platyphylla*, bem como a atividade citotóxica e antiproliferativa dos fitoquímicos isolados incentivam a continuidade dos estudos com esses compostos em outros modelos experimentais, de forma a intensificar a busca por novas terapias anticâncer.

2.4 CULTURA DE CÉLULAS EM MODELOS 3D NO ESTUDO DO CÂNCER

A descoberta de novas drogas anticâncer a partir dos fitoquímicos constitui-se em um longo processo que possui como primeiro passo a avaliação da atividade biológica desses compostos em modelos *in vitro*. Nesse contexto, os métodos que utilizam cultura celular vêm sendo amplamente aplicados (AMELIAN *et al.*, 2017; BEHESHTI *et al.*, 2021; LAHLOU, 2007).

A cultura celular é um importante modelo para a descoberta pré-clínica de medicamentos e desde o início do século XX esteve baseada em metodologias bidimensionais (2D) de cultivo devido à sua fácil reprodução e baixo custo, desempenhando um relevante papel na pesquisa (AGGARWAL *et al.*, 2009; EDMONDSON *et al.*, 2014). Nesse modelo as células crescem em uma monocamada plana aderida a um substrato sólido sem que haja as típicas interações célula-célula e célula-matriz como ocorre normalmente nos tumores (CHAICHAROENAUDOMRUNG, KUNHORM e NOISA, 2019). Além disso, as células cultivadas em sistema 2D apresentam uma morfologia alterada por sofrerem rearranjos do citoesqueleto, adquirindo polaridade artificial, que pode resultar em expressão gênica anormal (NATH; DEVI, 2016).

Apesar das limitações apresentadas, a cultura 2D permanece sendo muito utilizada como um modelo experimental na triagem pré-clínica em consequência de sua alta performance e reprodutibilidade. Isso deve-se, principalmente, aos ensaios e equipamentos disponíveis para avaliação de viabilidade, citotoxicidade, expressão gênica/proteica em resposta a um composto, que foram desenvolvidos e estabelecidos com base nesse modelo de cultura e que, portanto, necessitam de adaptações para serem aplicados em modelos de cultura celular 3D (BRANCATO *et al.*, 2020).

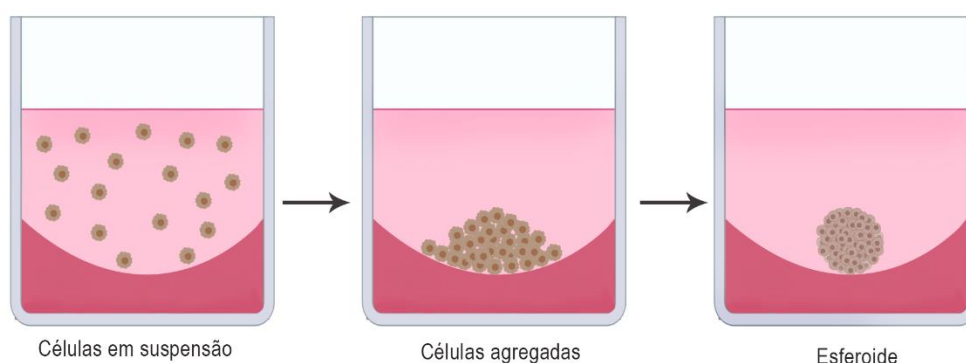
As reduzidas taxas de sucesso no desenvolvimento de novas terapias a partir das culturas 2D, onde menos da metade de todos os compostos são bem-sucedidos nos ensaios clínicos, salienta a necessidade do desenvolvimento e utilização de novos métodos e tecnologias que melhorem a eficácia da descoberta de agentes anticâncer na fase pré-clínica (HUTCHINSON e KIRK, 2011). A fim de aprimorar a triagem de novas drogas anticâncer, estabelecer novos modelos experimentais, bem como reduzir o número de animais utilizados na pesquisa, surgem os modelos experimentais de cultura em três dimensões (3D) (RAVI *et al.*, 2015). Esse

modelo tem por objetivo aproximar os modelos celulares usados na descoberta inicial de potenciais drogas anticâncer dos modelos animais pré-clínicos e tumores de pacientes (JENSEN e TENG, 2020; ZANONI *et al.*, 2019).

A introdução dos modelos celulares 3D na pesquisa do câncer ocorreu no início dos anos 1970 em estudos realizados por radiobiologistas (SUTHERLAND *et al.*, 1970) e desde então esse modelo tem sido aprimorado e aplicado a diferentes linhagens celulares tumorais com intuito de intensificar o seu uso na triagem de potenciais agentes anticâncer (FRIEDRICH, EBNER e KUNZ-SCHUGHART, 2007; ZANONI *et al.*, 2019). Diferentes modelos 3D foram desenvolvidos no decorrer dos anos e estes diferem, principalmente, quanto a fonte das células tumorais que os compõem (ISHIGURO *et al.*, 2017). Eles podem ser classificados em: i) esferoides multicelulares tumorais ou EMTs gerados em condições não aderentes a partir de uma suspensão celular de linhagem única; ii) esferas tumorais e esferas tumorais derivadas de tecido, formadas após dissociação parcial de um tecido tumoral; (WEISWALD, BELLET e DANGLES-MARIE, 2015) e iii) organoides, gerados a partir de células-tronco embrionárias (CTEs), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ou células-tronco adultas (CTAs) (CORRÒ, NOVELLASDEMUNT e LI, 2020).

Os EMTs ou esferoides (Figura 6) utilizados no presente estudo, são formados a partir de uma suspensão celular derivada de uma linhagem por auto agregação ou agregação induzida (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Em um dos principais métodos, as forças adesivas entre as células são maiores do que a adesão célula-substrato e as células tumorais são impedidas de se aderir ao material subjacente, promovendo a adesão célula-célula e levando a uma estrutura esférica, formando um EMT (WEISWALD, BELLET e DANGLES-MARIE, 2015; ZANONI *et al.*, 2019).

Figura 6: Formação de esferoides multicelulares tumorais não-aderentes ao substrato



Fonte: o próprio autor (2021). Criado com BioRender.com.

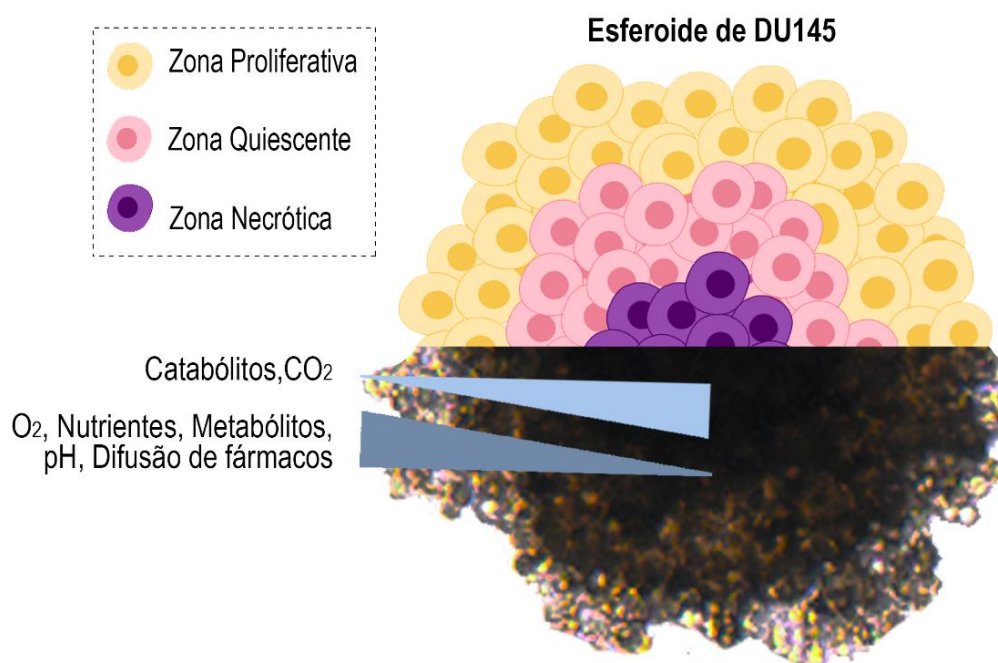
Assim, após a formação dos EMTs não-aderentes ao substrato, estes podem ser transferidos para uma nova placa contendo componentes que mimetizam uma matriz extracelular. A importância das interações presentes no modelo 3D deve-se ao fato de que o microambiente desempenha um papel fundamental na fisiologia, estrutura e função do tumor. Os componentes da matriz extracelular e as células estromais, ao interagirem com as células tumorais, modulam diferentes processos biológicos, como migração, proliferação e resistência terapêutica (LU, WEAVER e WERB, 2012; MBEUNKUI e JOHANN, 2009).

Além disso, as interações célula-célula e célula-matriz nos esferoides mimetizam o microambiente dos tumores. Essas interações fazem com que as células cultivadas em 3D adquiram características morfológicas que refletem com maior precisão os perfis de expressão gênica, atividade das vias de sinalização e transdução de sinais, metabolismo de medicamentos, zonas diferenciais de proliferação, viabilidade, hipóxia, pH, diferenciação, migração e sensibilidade a fármacos de tumores *in vivo* (CHAICHAROENAUDOMRUNG, KUNHORM e NOISA, 2019; NATH e DEVI, 2016; SANT e JOHNSTON, 2017).

A morfologia dos esferoides confere a eles elementos encontrados em tumores, o que inclui regiões de hipóxia crônica, gradientes de metabólitos, catabólitos, necrose e pH (FRIEDRICH *et al.*, 2009; LEEK *et al.*, 2016). O esquema representado na Figura 7 ilustra a presença de gradientes físico-químicos em um esferoide (parcialmente de células DU145) e a complexidade de sua composição. As células em proliferação são encontradas principalmente na camada externa, visto que estas são expostas a quantidades suficientes de nutrientes provenientes do meio de

cultura. As células da região central compreendem a zona necrótica, onde são confrontadas com reduzidas concentrações de oxigênio, fatores de crescimento e nutrientes. Entre as camadas de células em proliferação e o núcleo necrótico, é possível observar uma camada intermediária de células quiescentes (CHAICHAROENAUDOMRUNG, KUNHORM e NOISA, 2019; NATH e DEVI, 2016; TEVIS, COLSON e GRINSTAFF, 2017).

Figura 7: Representação de um esferoide e seus gradientes de oxigênio (O_2), nutrientes, pH e gás carbônico (CO_2), assim como suas zonas proliferativa, quiescente e necrótica.



Fonte: o próprio autor (2021). Criado com BioRender.com

A relevância de culturas de células tumorais em modelos 3D na avaliação da eficácia de medicamentos e no comportamento metastático dos tumores é cada vez mais reconhecida pela comunidade científica (WARE *et al.*, 2016). Para tumores sólidos, como o CaP, isso resulta no desenvolvimento e implementação de modelos tridimensionais (3D) *in vitro* que mimetizem com mais precisão a arquitetura e a biologia do tumor humano (SANT e JOHNSTON, 2017). Dessa forma, a utilização do modelo de cultura 3D no câncer de próstata tem sido explorada atualmente para investigar as interações das células tumorais com o microambiente ao seu redor, podendo auxiliar desde o esclarecimento dos mecanismos de progressão tumoral até

o desenvolvimento de terapias mais eficientes (AGHAJANI *et al.*, 2020; OJALILL *et al.*, 2020).

As primeiras linhagens celulares isoladas e utilizadas nos estudos com CaP, LNCaP, PC-3 e DU145, permanecem sendo empregadas nos estudos atuais em modelos 3D (EGUCHI *et al.*, 2018; FONTANA *et al.*, 2019; NAMEKAWA *et al.*, 2019).

As células DU145 foram inicialmente obtidas a partir de um adenocarcinoma de próstata humano metastático em cérebro (STONE *et al.*, 1978). As principais características dessa linhagem celular incluem a independência de testosterona e di-hidrotestosterona, não expressão do receptor androgênico e ausência da produção de PSA (CARRUBA *et al.*, 1994; CUNNINGHAM e YOU, 2015). Além disso, essa linhagem celular apresenta uma expressão aumentada de fatores de crescimento como TGF- α e IGF-1, que atuam de forma autócrina, ativando seus receptores, EGF/TGF- α -R e IGF-1-R. O gene *TP53* mutado confere características de um tumor mais agressivo para essa linhagem celular, pois a mutação está associada principalmente à resistência à morte celular (CARRUBA *et al.*, 1994; PIETRZKOWSKI *et al.*, 1993; WARD *et al.*, 2018).

Assim, as características dessa linhagem celular são extensivamente exploradas, por exemplo, em estudos que visam a elucidação dos mecanismos de progressão tumoral, bem como a triagem e avaliação de novos agentes anticâncer com capacidade de induzir a morte e inibir a migração celular (LI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; WONG *et al.*, 2017).

2.5 MECANISMOS DE AÇÃO DE FITOQUÍMICOS AVALIADOS EM CULTURA DE CÉLULAS EM MODELOS 3D

O potencial anticâncer dos fitoquímicos é observado devido a seus mecanismos de ação, que podem incluir a indução de morte celular, redução da angiogênese, inibição da migração e da invasão celular e redução da proliferação celular (FONTANA *et al.*, 2020; SALEHI *et al.*, 2019). Na caracterização das atividades biológicas de fitoquímicos, como os flavonoides, os esferoides se destacam, visto que avaliações comparativas em diferentes tipos de células tumorais em sistemas de cultura de células 2D e 3D demonstraram que as células tumorais eram menos sensíveis aos agentes anticâncer quando avaliadas em um sistema 3D

(LOVITT, SHELPER e AVERY, 2014).

Uma variedade de ensaios *in vitro* bem estabelecidos, como os ensaios bioquímicos, microscopia e citometria de fluxo têm sido comumente adaptados e aplicados para análises fenotípicas e morfológicas de EMTs (CORVI e MADIA, 2017; NATH e DEVI, 2016). Além disso, ensaios que possibilitam a avaliação do crescimento, integridade e morfologia dos EMTs demonstram relevância na busca por novos agentes terapêuticos (LAZZARI *et al.*, 2019; MURALI *et al.*, 2019; PSYCHARAKIS *et al.*, 2018).

A avaliação da viabilidade celular e citotoxicidade pode ser feita por meio de ensaios baseados em diferentes funções celulares, como atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, aderência celular, produção de ATP, produção de coenzimas e atividade de captação de nucleotídeos (ADAN, KIRAZ e BARAN, 2016). Ensaios específicos para modelos 3D foram desenvolvidos tais como Cultrex® 3D e CellTiter-Glo luminescent assay, no entanto, a análise da viabilidade celular em EMTs depende, até o momento, principalmente dos métodos convencionais utilizados em modelos 2D (HAN *et al.*, 2021). Um dos ensaios mais aplicados é o que avalia a conversão da resazurina em resofurina (um produto rosa e fluorescente), realizada principalmente pelas enzimas mitocondriais de células metabolicamente ativas e viáveis (FORBES *et al.*, 2014; PRÄBST *et al.*, 2017; RAMPERSAD, 2012).

A citotoxicidade de um novo composto utilizando modelos 3D também pode ser avaliada por meio da liberação da enzima citosólica lactato-desidrogenase (LDH). A LDH catalisa a conversão de piruvato em lactato na presença de NADH no citoplasma celular e, assim, a sua liberação e detecção no ambiente extracelular (meio de cultura) fornece um indicativo de morte celular devido a danos na membrana da célula (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006; HATOK *et al.*, 2009; PRÄBST *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos envolvidos na indução de morte celular, está o desbalanço no estado redox celular. Em níveis basais, as espécies reativas (ERs) são importantes sinalizadores intracelulares, porém, com o aumento da produção de ERs ou deficiência do sistema antioxidante, essas moléculas podem causar danos às estruturas celulares, incluindo o DNA (OPARKA *et al.*, 2016), o que pode resultar em morte celular. A detecção das ERs pode ser feita com sondas específicas, como a CM-H₂DCFDA (FORMAN *et al.*, 2015), capaz de detectar ERs intracelulares totais sem distinção entre ERs de oxigênio e nitrogênio. A sonda CM-H₂DCFDA é capaz de

se difundir livremente pela membrana plasmática, e no citosol é hidrolisada formando um ânion carboxilato, cuja oxidação resulta na formação de um produto fluorescente, a diclorofluoresceína (DCF), que pode ser monitorada e quantificada por meio de técnicas baseadas em fluorescência (KALYANARAMAN *et al.*, 2012; OPARKA *et al.*, 2016).

Como mencionando anteriormente, a inibição da migração e da invasão celular também é um importante mecanismo de ação dos agentes anticâncer. A migração celular é uma forma de motilidade celular presente em processos biológicos normais, como a morfogênese embrionária, reparo de lesões teciduais e respostas imunes e de forma anormal destaca-se por sua função no processo metastático no câncer (WU *et al.*, 2017). Diferentes ensaios *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos a fim de se avaliar a ação de fitoquímicos sobre esse processo, incluindo os ensaios de migração vertical *transwell* e de cicatrização horizontal ou *wound healing*, aplicados em culturas 2D e ensaio de migração celular 3D, onde as células do esferoide migram sobre uma matriz celular artificial (ROMMERSWINKEL *et al.*, 2014; VINCI *et al.*, 2013).

Considerando que o potencial terapêutico dos fitoquímicos no câncer deve-se a seus diversos mecanismos de ação, como por exemplo, inibição da proliferação celular, indução de morte celular, inibição de migração e invasão celular e atividade antioxidante (KOTECHA, TAKAMI e ESPINOZA, 2016; LIU, 2013), esses mecanismos serão investigados no presente estudo para avaliar o potencial terapêutico da braquidina C em culturas 2D e 3D de células tumorais de próstata.

3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivos gerais

Devido à necessidade de desenvolvimento de novas terapias anticâncer e da utilização de novos modelos experimentais na triagem de agentes antitumorais, bem como os promissores resultados obtidos com os extratos de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann e com as braquidinas isoladas em linhagens celulares tumorais, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial anticâncer da braquidina C em células de próstata (DU145) cultivadas em monocamada celular e em esferoides multicelulares tumorais (EMTs).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o efeito do tratamento com diferentes concentrações de braquidina C em células DU145 na (o):

- viabilidade celular, utilizando dois ensaios: resazurina e liberação de lactato desidrogenase nos modelos 2D e 3D;
- proliferação celular em modelo 2D por meio da contagem de células e quantificação de proteínas;
- crescimento, morfologia e integridade dos EMTs por meio de análises fotomicroscópicas e medições dos esferoides;
- estado redox celular, utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA nos modelos 2D e 3D;
- migração celular em modelo 2D, por meio dos ensaios de migração e invasão *transwell* e cicatrização e em modelo 3D, por meio do ensaio de migração em matriz extracelular (ECM® gel);
- modulação da expressão de genes relacionados à morte, proliferação, adesão e migração celular por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa em EMTs;
- expressão de proteínas envolvidas nas vias de morte celular por meio do ensaio de western blotting em EMTs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Braquidina C

As braquidina C (BrC) foi isolada das raízes de *Fridericia platyphylla* pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) de acordo com método previamente descrito por Rocha *et al.* (2014). Esses isolados foram diluídos em 50% de dimetilsulfóxido (DMSO em partes iguais de tampão fosfato salino (PBS) para obtenção de uma solução-estoque mantida em microtubo estéril, armazenada a - 20°C, protegida de luz e de contato com outros reagentes. A partir da solução-estoque foram preparadas 9 concentrações que variaram de 24 a 3072 µM e 7 concentrações que variaram de 1000 a 12000 µM de Braquidina C. Para o uso na cultura celular 2D, os tratamentos foram diluídos 100 vezes, obtendo-se concentrações finais de 0,24 a 30,72 µM de BrC em cultura enquanto para uso na cultura 3D, os tratamentos foram diluídos 200 vezes, obtendo-se concentrações finais de 5 a 60 µM de BrC em cultura. As concentrações que foram utilizadas foram baseadas em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa em modelo 2D (NUNES *et al.*, 2020). Em ambos os modelos, a concentração final de DMSO na cultura foi de 0,25%.

4.2 Linhagem celular e cultivo

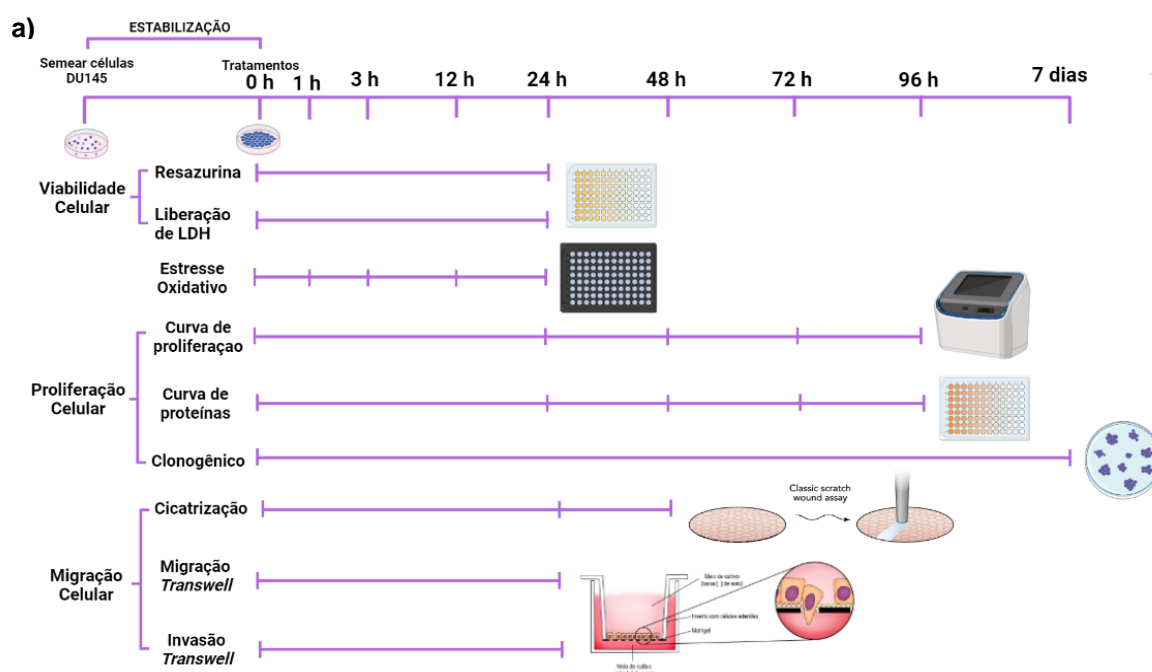
As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram a tumoral de próstata humana isolada de um sítio metastático cerebral, DU145 (ATCC® HTB-81TM) e a FGH (fibroblasto gengival humano) (American Type Culture Collection - Cat. Nº HTB-81TM and PCS-201-018; Manassas, VA, USA). As linhagens celulares foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 164) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - ambos reagentes obtidos da Gibco, Grand Island, NY, USA), penicilina (0,06 g/L) (CAS: 69-57-8), estreptomina (0,10 g/L) (CAS: 3810-74-0) e bicarbonato de sódio. As células foram mantidas em recipientes de cultura de 25 cm², a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

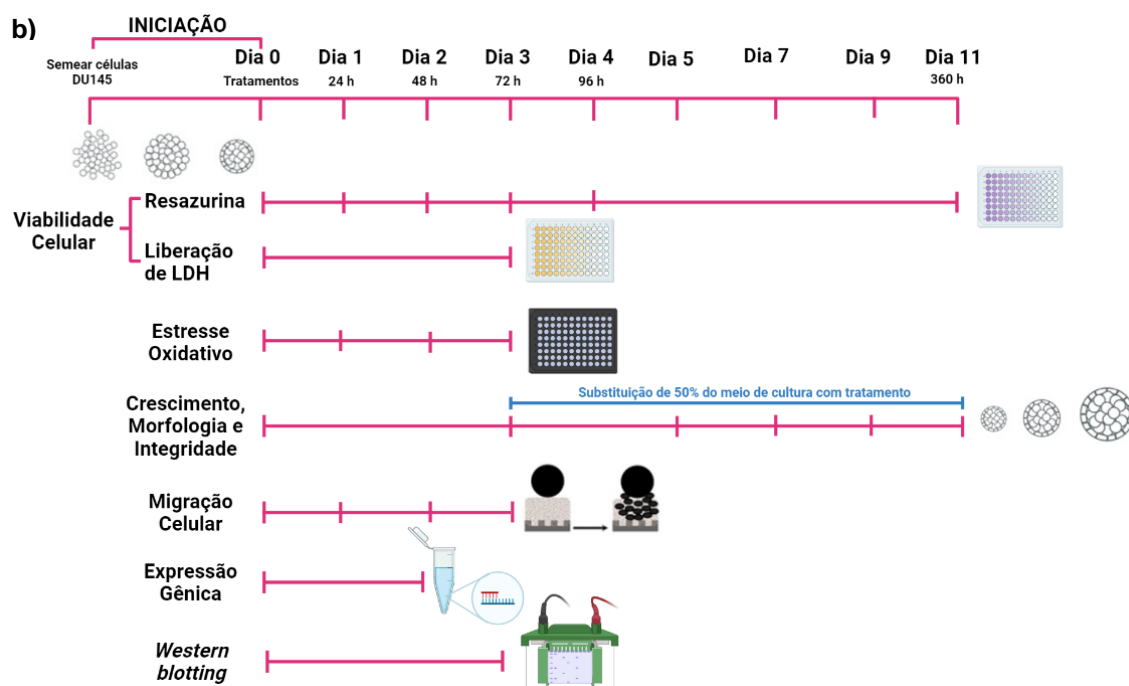
4.3 Delineamento Experimental

Os ensaios propostos para a avaliação da BrC nos modelos 2D e 3D e os tempos de amostragem foram realizados seguindo o delineamento exposto na Figura 8. Para os ensaios em modelo de cultura celular bidimensional as

concentrações de BrC (0,24; 0,75; 0,96; 1,50; 3,84; 6,00; 15,36, 24,00 e 30,72 μM), controle negativo (PBS) e controle de solvente (DMSO 0,25%) foram adicionadas 24 h após a semeadura das células; tempo necessário para a formação da monocamada celular. As células para a formação dos esferoides foram semeadas no dia 0, e após 4 dias de crescimento, os esferoides foram tratados com as concentrações de BrC previamente definidas (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μM), bem como seus controles negativo (PBS), solvente (DMSO 0,25%) e positivo (docetaxel 50 μM e 100 μM). As concentrações de controle positivo foram escolhidas baseadas em estudos anteriores do nosso laboratório. Em todos os ensaios foram incluídos um grupo controle negativo (PBS); no entanto, como este não diferiu estatisticamente do controle do solvente, todos os dados foram comparados com o último.

Figura 8: Delineamento experimental dos ensaios biológicos realizados com células tumorais de próstata (DU145) em modelo a) 2D e b) 3D.





Fonte: o próprio autor (2020)

4.4 Cultivo de Esferoides Multicelulares Tumorais (EMTs)

Os EMTs foram cultivados de acordo com o método proposto por Friedrich *et al.* (2009) e padronizados no LAMON para células DU145. Previamente, placas de 96 poços foram revestidas com 50 μL de agarose 1,5%. Para isso, 0,45 g de agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram dissolvidas em 33 mL de meio RPMI 1640 incompleto (sem SBF). A solução foi autoclavada por 20 min a 121°C, mantida a 60°C em banho maria e adicionada em cada poço com o auxílio do multipipetador Multipette® M4 (Eppendorf; Hamburg, Alemanha). Após solidificação da agarose, $3,0 \times 10^3$ células em 200 μL de meio RPMI 1640 completo foram semeadas para formação dos esferoides. As placas foram centrifugadas em centrífuga de placas por 5 min para auxiliar na formação dos esferoides e mantidas imóveis por 4 dias (96 h) em estufa Thermo Scientific com 5% de CO_2 a 37°C e 96% de umidade relativa para a formação dos EMTs.

4.5 Ensaio de Redução da Resazurina

A avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de redução da resazurina (AlamarBlue®; Sigma-Aldrich, St. Louis, LO, EUA) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Walzl *et al.* (2014) no tempo de 24 h após tratamento para o modelo 2D e nos tempos de 24, 48, 72 e 264 h para o modelo 3D conforme

descrito em 4.3.

Após os tempos de tratamentos, 40 µL de uma solução de resazurina (0,015 mg/mL, diluída em PBS) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas por 4 h (modelo 2D) ou 24 h (modelo 3D) (EILENBERGER *et al.*, 2018) em estufa a 37°C e a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas (BioTek™ Eon™ Microplate Spectrophotometers - Winooski, EUA) no comprimento de onda de 570 nm para resofurina e 600 nm para resazurina. As absorbâncias obtidas foram multiplicadas pelo fator de oxidação em cada comprimento de onda e a partir da diferença entre os valores resultantes de 570 nm e 600 nm a viabilidade celular foi calculada. Os dados foram normalizados tendo o controle do solvente como 100% de viabilidade celular.

4.6 Ensaio de Liberação de Lactato-desidrogenase (LDH)

O ensaio do LDH foi realizado utilizando-se o kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após 24 h de tratamento com BrC (0,24, 0,75, 0,96, 1,50, 3,84, 6,00, 15,36, 24,00 e 30,72 µM) e solvente (SV, DMSO 0,25%) para o modelo 2D e 72 h de tratamento com BrC (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM), SV e CP (docetaxel 50 µM e 100 µM) em modelos 3D, 50 µL do sobrenadante foram retirados dos poços EMTs e transferidos para outra placa segundo protocolo indicado no kit comercial.

A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (BioTek™ Eon™ Microplate Spectrophotometers - Winooski, EUA) nos comprimentos de onda de 490 nm e 680 nm. Para determinar a citotoxicidade por meio da liberação da enzima LDH foram subtraídos os valores de absorbância obtidos na leitura de 680 nm dos valores de absorbância obtidos na leitura de 490 nm e os dados foram normalizados tendo o controle positivo (fornecido pelo kit, 100% de lise celular) como 100%.

4.7 Proliferação Celular em modelo 2D e 3D

4.7.1 Ensaio clonogênico em monocamada de células DU145

O ensaio clonogênico foi realizado segundo Franken e colaboradores (2006). Foram semeadas 250 células por poço em placa de 6 poços. Após 24 h de estabilização em estufa a 37°C, as células foram tratadas com BrC (0,24, 1,50, 6,00 e 15,36 µM). As placas foram mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de

umidade relativa por 7 dias e depois foram fixadas e coradas.

As placas foram lavadas com 1 mL de PBS e após, adicionou-se 1 mL de solução fixadora (20 mL de etanol e 40 mL de acetona) por 10 min, seguida de coloração com Giemsa 5% por 5 min (PATTIES *et al.*, 2016). Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada por submersão e deixadas à temperatura ambiente (20°C) para secagem e posterior contagem das colônias. Os resultados foram apresentados como fração de sobrevivência (%) tendo o SV como 100%.

4.7.2 Curvas de proliferação celular

Para a construção das curvas de proliferação foram semeadas $1,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 24 poços contendo 1,5 mL de meio de cultura completo. Após estabilização, as células foram tratadas com as BrC (0,24, 1,50, 6,00 e 15,36 μM) e controle de solvente por 24, 48, 72 e 96 h. As células foram tripsinizadas e uma alíquota de 20 μL foi retirada para contagem das células equipamento Countess® Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). utilizando azul de Trypan.

Depois de retirada a alíquota, a placa foi incubada novamente por 2 h as células aderissem novamente ao poço. Em seguida, a placa foi lavada com PBS e incubada por 15 min com solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%. O TCA foi removido e foram adicionados 200 μL de azul de bromofenol (1%) em ácido acético por 30 min. A placa foi lavada por submersão em água destilada e o corante extraído com 400 μL de Tris (10 μM) e 200 μL foram transferidos para placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (DA COSTA LOPES *et al.* 2000; CILIÃO *et al.*, 2015; SERPELONI *et al.*, 2015). Os resultados foram apresentados em número de células $\times 10^4$ para a curva por número de células e em absorbância para proliferação por dosagem de proteínas totais.

4.7.3 Avaliação de crescimento, morfologia e integridade dos esferoides multicelulares tumorais

As análises de estrutura, cinética de crescimento, integridade e de área de cada esferoide de células DU145 foram realizadas segundo Friedrich *et al.* (2009) e Vinci *et al.* (2012) após tratamento com BrC (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μM), SV e CP (docetaxel 50 μM e 100 μM). A avaliação foi realizada por meio de fotomicroscopias obtidas no dia 0 (esferoides iniciados), após 72 h e a cada 48 h até

o dia 11. As fotomicrografias dos EMTs foram capturadas em microscópio invertido Olympus CKX41 com objetiva de 4x, com o auxílio do software Qimaging Pro 7.1 (Teledyne, Canadá). Após a captura das imagens foram retirados 100 µL do conteúdo de todos os poços, e em seguida foram adicionados 100 µL dos tratamentos diluídos em meio RPMI para reposição de 50% dos tratamentos.

Cada imagem obtida foi avaliada para detecção de EMTs irregulares (sem forma circular), com desagregação ou aglomeração celular irregular para análise de integridade e morfologia dos esferoides. Para análise de volume e crescimento, realizou-se a medida da circunferência do esferoide com auxílio do software Zen 2.3 (Zeiss, Alemanha) com a ferramenta “Measure”. O volume do esferoide foi apresentado em µm³.

4.8 Quantificação de Espécies Reativas Intracelulares

Para quantificação das espécies reativas intracelulares utilizou-se a sonda fluorescente *5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester*, (CM-H₂DCFDA, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). No modelo 2D, 1x10⁴ células DU145 foram semeadas em placas pretas estéreis de 96 poços (Perkin Elmer, EUA) e tratadas por 1, 3, 6, 12 e 24 h com BrC (0,24, 0,75, 0,96, 1,50, 3,84, 6,00, 15,36, 24,00 e 30,72 µM) e solvente (SV, DMSO 0.25%). Os esferoides foram tratados por 24, 48 ou 72 h com BrC (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM) e SV e transferidos um a um, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para placas pretas estéreis de 96 poços (Perkin Elmer, EUA) previamente preenchidas com 50 µL de PBS. Em ambos os modelos, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 1 mM) foi utilizado como controle positivo por 30 min. Após, foram adicionados em cada poço 100 µL da sonda CM-H₂DCFDA 5 µM (2D) e 10 µM (3D) solubilizada previamente em etanol 99%.

As placas foram incubadas por 30 min em estufa de CO₂ a 37°C, segundo as indicações do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter Victor 3) com excitação entre 492–495 nm e emissão entre 517–527 nm e os resultados foram apresentados em intensidade de fluorescência.

4.9 Migração Celular em Modelos 2D e 3D

4.9.1 Migração vertical 2D (Transwell)

Para avaliar a migração celular foi utilizado o sistema *Transwell* com

insertos seguindo protocolo de Tian *et al.* (2007), que consiste em inserir uma membrana de polietileno com poros de 8 μm numa placa de 24 poços. Na parte superior da placa $5,0 \times 10^4$ células DU145 foram semeadas em meio de cultivo incompleto, contendo também os tratamentos com as braquidinas, o controle negativo e o solvente. A parte de baixo da placa foi preenchida somente com meio de cultivo completo. As células permaneceram assim por 24 h e, após esse tempo, as células localizadas na parte superior da membrana foram removidas com o auxílio de um cotonete e lavadas com PBS. As células que conseguiram migrar através da membrana foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta 0,1% e fotografadas em microscópio (Olympus BX-43, Tóquio-Japan) com objetiva de 40x (aumento de 400x). Após as fotografias, a coloração foi removida utilizando-se ácido acético 10% e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de células que migraram, tendo o controle de solvente como 100%.

4.9.2 Invasão vertical 2D (Transwell)

Também utilizando o sistema *Transwell*, o ensaio de invasão com câmara de Boyden foi utilizado como descrito para o ensaio de migração utilizando insertos contendo membrana com poros de 8 μm de diâmetro e recobertos com matrigel (BD BioCoat™). Os resultados foram apresentados em porcentagem de células que invadiram, tendo o controle de solvente como 100%.

4.9.3 Migração horizontal 2D (Cicatrização)

O ensaio de cicatrização foi realizado segundo os protocolo de Liang *et al.* (2007) e Martinotti *et al.* (2019). Foram semeadas 6×10^5 células por poço em placas de 12 poços. As células foram incubadas por 24 h para obtenção de uma monocamada confluenta. Em seguida, foi retirado o meio de cultura e com uma ponteira de 200 μL realizou-se a ranhura no fundo do poço e a placa foi lavada com PBS delicadamente para remover as células separadas. As células foram tratadas com controle solvente e BrC (1,5; 3,84 e 6,0 μM). As imagens foram captadas nos tempos de 0, 24 e 48 h após adição dos tratamentos e analisadas usando o software TScratch, versão 1.0 (The Mathworks, Natick, MA, EUA, 2010). Os resultados foram apresentados como tamanho da ranhura (%), considerando-o 100% em 0 h.

4.9.4 Migração em modelo 3D

A avaliação da migração das células dos esferoides para a matriz extracelular foi realizada em ECM® (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri USA), conforme descrito por Vinci *et al.* (2013).

50µL da solução comercial de ECM® (200 µg/mL) diluída em meio RPMI 1640 incompleto foram adicionados em cada poço em placas de 96 poços. As placas permaneceram em temperatura ambiente por 3 h para fixação da matriz e, em seguida, o volume remanescente não aderido foi cuidadosamente retirado. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e 100 µL de solução de bloqueio de albumina de soro bovino (BSA) a 1% diluída em PBS (m:v) foram adicionados e as placas mantidas em repouso por 1 h. Após esse período, foi realizada a transferência dos esferoides e tratamentos com BrC (5,10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM) e solvente (DMSO 0.25%).

As fotomicroscopias dos esferoides foram realizadas nos tempos de 0, 24 e 48 h em microscópio invertido Olympus CKX41 com objetiva de 4x, com auxílio do software Qimaging Pro 7.1. A análise da migração foi realizada por meio da medida da área ocupada pelas células que migraram do esferoide utilizando o software AxioVision 3.1 (Zeiss, Alemanha) com a ferramenta "Measure". As áreas foram apresentadas em µm².

4.10 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

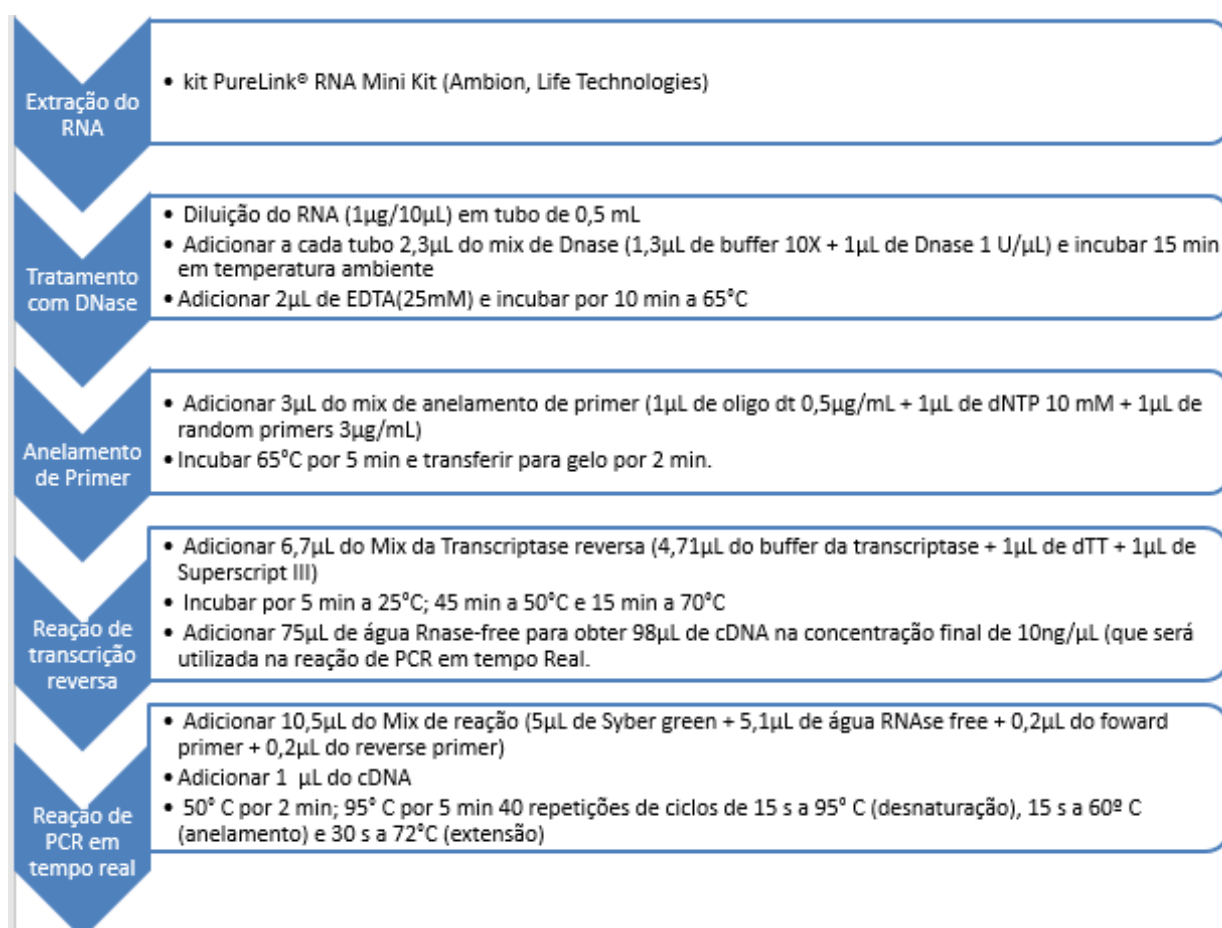
Para análise da expressão gênica foram escolhidas 2 concentrações de BrC (5 e 50 µM). Essas concentrações apresentaram efeito antimigratório BrC (5 e 50 µM) e citotóxico BrC (50 µM). Os esferoides foram transferidos com 100 µL de meio para tubos de 15 mL. Para a obtenção da quantidade de células necessárias, uma amostra foi composta por 96 esferoides, que foram centrifugados por 5 min a 2500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o protocolo para extração de RNA foi realizado utilizando-se o kit *PureLink® RNA Mini Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

A quantificação do RNA foi realizada por leitura espectrofotométrica no equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e a pureza das amostras foi verificada pelas razões A260/A280, que mostra possíveis contaminações por proteínas; e pela razão A260/A230 que mostra contaminação por sais e compostos orgânicos. Amostras de RNA com grau

de pureza aceitável apresentam razões A260/A230 entre 1,8 e 2,2 e A260/A280 igual ou superior a 1,8. Todas as nossas amostras apresentaram grau de pureza considerado aceitável.

Após quantificação, foi realizado o tratamento de 1 µg de RNA com DNase I, amplification grade (1U/µL) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi desenvolvido utilizando-se a enzima *SuperScript III First Strand Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) também de acordo com as instruções do fabricante. Um resumo do processo de extração, tratamento com DNase e confecção do cDNA pode ser visualizado na Figura 9.

Figura 9: Representação das etapas envolvidas no processo de extração, tratamento com DNase, anelamento de primers, reação da transcrição reversa e reação de PCR em tempo real.



Fonte: próprio autor

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador Techne Quantica® – Real-Time Nucleic Acid Detection Quantifiable PCR Thermal

Cycler System utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e seguindo recomendações do fabricante. O volume final de reação foi 11,5 µL, utilizando-se 5 pmol (0.2µL) de cada oligonucleotídeo iniciador, 10 ng de cDNA molde (1µL), 5 µL de SYBR® Green e o volume completado com água. A mistura de reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 95°C por 5 min; 40 repetições de ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação), 15 s a 60° C (anelamento) e 30 s a 72°C (extensão). Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os níveis de expressão relativa foram calculados segundo o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Schmittgen and Livak (2008). Foram testados os genes de referência *HPRT1*, *GAPDH* e *RSP18* que, de acordo com o algoritmo NormFinder (ANDERSEN, JENSEN e ØRNTOFT, 2004), forneceram bons valores de estabilidade e foram utilizados em combinação como genes normalizadores.

Os primers utilizados foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA), que fornece primers pré-desenhados para análises de RT-qPCR (*KiCqStart® SYBR® Green Primers*). Foram analisados genes associados à adesão (*CDH1* e *ITGAM*), migração (*MMP9* e *MMP11*), morte celular (*CASP3*, *CASP9*, *BCL-2*, *BAX*, *BIRC5* e *TNF-α*) e proliferação celular (*NKX3.1*).

4.11 Avaliação da Expressão Proteica por Western Blotting

Para análise da expressão proteica, o meio de cultura, juntamente com todo o conteúdo do poço foi retirado e transferido para um tubo de 15 mL (96 esferoides de cada tratamento foram transferidos). Após a transferência, o conteúdo foi centrifugado por 5 min a 2500 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi desfeito com auxílio de uma pipeta e o conteúdo resultante transferido para um microtubo de 2 mL. Foi adicionado 1 mL de PBS 1X gelado (4°C) e as amostras centrifugadas novamente por 5 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de solução de lise RIPA (*Radioimmuno Precipitation Assay*) contendo tampão de Extração e *Halt™* Coquetel de Inibidor de Protease, ambos da Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) foram adicionados e as amostras foram mantidas em gelo durante 1 h para lise. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 14000 x g e os sobrenadantes armazenados à - 20°C.

As proteínas extraídas foram quantificadas usando o kit Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)

e as concentrações foram determinadas por análises colorimétricas obtidas após a leitura da placa em espectrofotômetro a $\lambda = 595$ nm.

Após a extração e quantificação das proteínas, as amostras (10 μ g) contendo tampão de Amostra Bolt 4X LDS e agente redutor de amostra 10X Bolt™ foram desnaturadas a 70 °C por 10 min em banho seco e em seguida foram submetidas à eletroforese em NuPAGE™ 4 a 12%, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini Protein Gel, 12 poços usando Mini Gel Tank. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (iBlot™ 2 Transfer Stacks PVDF tamanho normal) ou nitrocelulose (iBlot™ Transfer Stack, nitrocelulose, tamanho regular) usando o dispositivo de transferência de gel iBlot 2. O dispositivo e todos os materiais utilizados foram obtidos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos primários (1:500): NF- κ B p65 (Cat. Nº A2547), Caspase-8 (Cat. Nº A0215), Caspase-7 (Cat. Nº A1524), Caspase-3 (Cat. Nº A2156), Bax (Cat. Nº A0207), TNF- α (Cat. Nº A0277), β -Actina (Abcam; Cat. Nº ab8227) e anticorpo secundário *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)* (1:5000; Abclonal; Cat. Nº AS014).

Para visualizar a imunorreação utilizou-se o substrato quimioluminescente SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA) por 10 min, e os sinais de quimioluminescência foram registrados digitalmente usando o fotodocumentador L-Pix Chemi juntamente com Software L-Pix Image (Loccus Biotechnology). Os valores densitométricos foram avaliados pelo software ImageJ (NIH.gov).

4.12 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism versão 7.0 (San Diego, Califórnia, EUA, 2018) para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos e controle do solvente em todos os ensaios realizados. Todos os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

Diferenças na expressão gênica foram avaliadas por meio do teste *t* de Student. Nessa análise estatística foram comparados o grupo controle do solvente com cada um dos grupos experimentais usando o valor médio de C_t obtido das

amostras em triplicatas. Na expressão proteica, as diferenças foram avaliadas por meio da comparação entre a expressão proteica de células tratadas e a expressão proteica células não tratadas por meio do teste *t* de Student. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todos os experimentos.

5 CAPÍTULO I

Anticancer activities of Brachydin C in human prostate tumor cells (DU145) grown in 2D and 3D models: stimulation of cell death and downregulation of metalloproteinases in spheroids

Larissa Cristina Bastos de Oliveira^a; Diego Luis Ribeiro^b; Jessyane Rodrigues do Nascimento^c; Claudia Quintino da Rocha^d; Ilce Mara de Syllos Cólus^a; Juliana Mara Serpeloni^{a*}

^aDepartment of General Biology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina (UEL), Londrina, 86057-970, Brazil.

^bDepartment of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, 14040-903, Brazil.

^cChemistry Institute, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, 14800-900, Brazil.

^dDepartment of Chemistry, Center for Exact Sciences and Technology, Federal University of Maranhão, São Luís, 65080-805, Brazil

***Corresponding author:**

Prof. Dr. Juliana Mara Serpeloni

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral. Universidade Estadual de Londrina – UEL. Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445 Km 380 Cx. Postal 10.011 - Campus Universitário. CEP: 86057-970. Londrina, PR, Brazil. Phone: +55 43 33715149

LCBO:0000-0001-6798-0662 - larissa.oliveira@uel.br

DLR: 0000-0003-1715-966X - diegoluisribeiro@usp.br

JRN: 0000-0003-1503-4855 - jessyane.nascimento@unesp.br

CQR: 0000-0002-3578-1869 - rocha.claudia@ufma.br

IMSC: 0000-0001-9098-1698 - colus@uel.br

JMS: 0000-0001-9846-5807 - julianaserpeloni@uel.br

Abstract

Brachydin C (BrC) is a dimeric flavonoid that has demonstrated cytotoxic and antiproliferative effects in prostate cancer (PC3) cells cultured in 2D. We compared the anticancer effects of BrC in DU145 cells cultured in 2D and multicellular tumor spheroids (MCTS). BrC calculated IC₅₀ values after 24 h of treatment were 47.31 (2D) and 229.8 μ M (3D) in the resazurin assay and the effects were time dependent in 3D (210.5, 116.1, and 65.02 μ M after 48, 72, and 96 h, respectively). BrC (5 to 60 μ M) interfered with the growth of MCTS and reduced cell viability after 11 days of treatment, a result that is not attributable to oxidative stress evaluated using the CM-H₂DCFDA probe. BrC (6.0 μ M) impaired horizontal (wound healing) and vertical cell migration and invasion (transwell assay) in 2D and BrC (5.0 to 60 μ M) in 3D (ECM Gel®). In RT-qPCR analysis of MCTS, BrC modulated *BIRC5*, *TNF- α* , *CASP3*, *NKX3.1*, *MMP9*, *MMP11*, *CDH1*, and *ITGAM*. BrC downregulated *CASP7*, *BAX*, and *TNF- α* in western blotting analysis. BrC stimulated cell death and decreased epithelial-mesenchymal transition. In addition, DU145 MCTS displayed higher resistance to BrC- induced cell death than 2D cultures, a difference to be considered in future approaches in prostatic cancer studies.

Keywords: *Fridericia platyphylla*; *chemotherapeutic*; metalloproteinases; phytochemical; survivin.

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second most frequent malignant neoplasm in men worldwide, and it is the most frequently diagnosed cancer in 112 countries (SUNG *et al.*, 2021). Several invasive and non-invasive therapies are used in the treatment of PCa, including surgery, radiotherapy, hormone therapy, and chemotherapy (TEO; RATHKOPF; KANTOFF, 2019). Although chemotherapy is one of the main approaches used, due to its lower selectivity for tumor cells and chemoresistance, the development of new cancer therapies is still required (MAJI *et al.*, 2018; RIZEQ *et al.*, 2020; ZUBAIR *et al.*, 2017).

Advances in organic chemistry and chemical analysis have allowed the isolation and purification of many active ingredients from plant species, which have contributed to the use of phytochemicals as therapeutic agents (CHOUDHARI *et al.*, 2020). Natural products have played a significant role in drug discovery, such as antibiotics, anti-inflammatories, analgesics, and anticancer agents (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; SEN; SAMANTA, 2014). For this reason, phytochemicals present in plant species are emerging as promising options for improving the effectiveness of cancer therapies (CHOUDHARI *et al.*, 2020).

The anticancer potential of flavonoids is mainly due to their antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic effects (CARRIZZO *et al.*, 2020; KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Several studies, *in vitro* and *in vivo*, have observed the chemotherapeutic potential of flavonoids in different types of cancer, such as in experimental models of lung (HAN *et al.*, 2020), breast (KASIRI *et al.*, 2020), leukemia (BRISDELLI *et al.*, 2020), pancreatic, cervical, ovarian, and prostate cancer (VEERAMUTHU *et al.*, 2017). Brachydins are unprecedented dimeric flavonoids isolated from the dichloromethane fraction of *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract (synonym of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau), an extract that has already shown cytotoxic and antiproliferative effects *in vitro* (SERPELONI *et al.*, 2020).

The chemical structure of brachydins is composed of four rings (A, B, C, and D) whose structures differ with regard to the substituent group of the C ring: brachydin A (BrA) has a hydroxyl group, brachydin B (BrB) a methoxy group, and brachydin C (BrC) has no substituent on the C ring (DA ROCHA *et al.*, 2014). With regard to their biological actions, the brachydins showed: i) an antinociceptive effect *in*

vivo (RODRIGUES *et al.*, 2017); ii) anti-*Trypanosoma cruzi* activity *in vivo* and *in vitro* (DA ROCHA *et al.*, 2014); anti-*Leishmania* sp. activity *in vitro* (ROCHA *et al.* 2018); and iv) antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (DE SOUSA ANDRADE *et al.*, 2020). Finally, in a study performed by our research group, Nunes *et al.* (NUNES *et al.*, 2020) observed the cytotoxic activity of brachydins on PC-3 human prostate tumor cells grown in 2D monolayer.

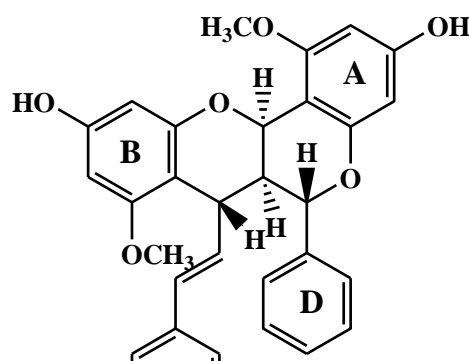


Figure 1. Chemical structure of brachydins A, B and C.

The results obtained with brachydins encourage further studies with these compounds in other experimental models. For solid tumors such as prostate cancer, the development and implementation of 3D *in vitro* models provides a further mimic of the architecture and biology of the tumor (SANT; JOHNSTON, 2017), in order to study tumor cell interactions with the microenvironment, which could help to clarify the mechanisms of tumor progression and also contribute to the development of more effective therapies (AGHAJANI *et al.*, 2020; OJALILL *et al.*, 2020). In this context, we investigated the anticancer effects of the flavonoid BrC on DU145 prostate cells grown in bidimensional and multicellular tumoral spheroids (MCTS) (Figure 2), evaluating cell viability/proliferation, oxidative stress, migration/invasion, and the expression of genes and proteins involved in these pathways.

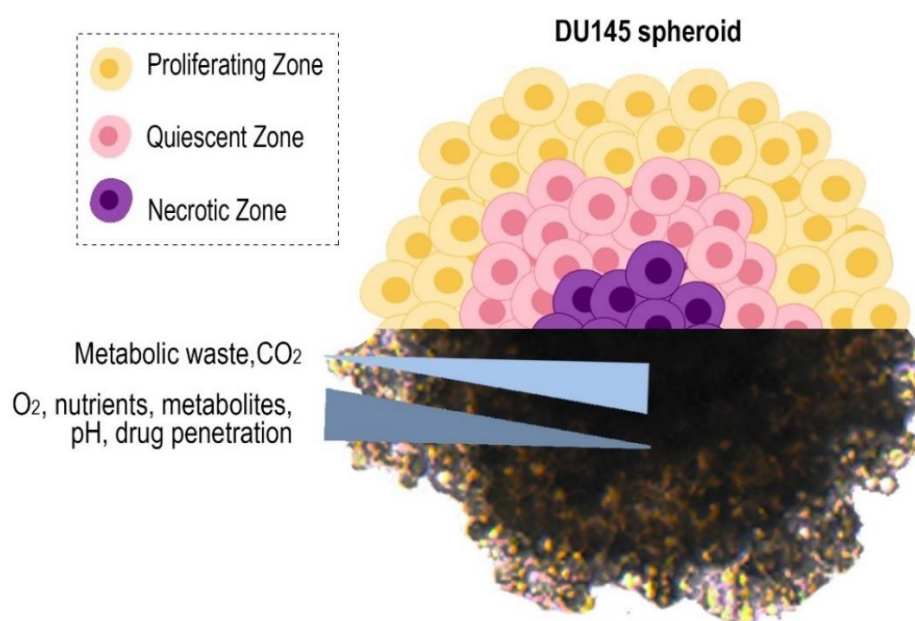


Figure 2. Representation of a DU145 spheroid with its oxygen (O_2), nutritional, pH, and carbon dioxide (CO_2) gradients, as well as its proliferative, quiescent, and necrotic zones.

2. Materials and Methods

2.1 *Brachydin C*

BrC (MW: 506.5 g/mol) (Figure 2a) was isolated from the roots of *Fridericia platyphylla* by the Natural Products Chemistry Laboratory from the Federal University of Maranhão according to the method previously described by Rocha *et al.* (DA ROCHA *et al.*, 2014) and Nascimento *et al.* (NASCIMENTO *et al.*, 2021) that also included information about collection, extraction, structure elucidation, and identification of BrC. The BrC was kindly sent to the Mutagenesis and Oncogenetics Laboratory of Londrina State University (UEL; Londrina, PR, Brazil) and was promptly dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Labsynth, Diadema, SP, Brazil) and phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) to obtain a stock-solution that did not exceed 0.25% in the final culture.

2.2. *Cell line and culture conditions*

The human androgen-independent prostate carcinoma cell line (DU145) isolated from a brain metastatic patient and the human gingival fibroblast (HGF) were purchased from ATCC® (American Type Culture Collection - Cat. N° HTB-81TM and PCS-201-018; Manassas, VA, USA). The DU145 cell line authentication was executed by the Barretos Cancer Hospital, as described by Silva-Oliveira *et al.*

(SILVA-OLIVEIRA *et al.*, 2016) performed by Short Tandem Repeat (STR) DNA typing, according to the International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines using an 8 STR loci panel (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, and CSF1P0) plus gender determination (AMEL). Both cell lines were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic solution (10,000 units/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B, all from Gibco, Grand Island, NY, USA), and 0.024% sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were kept in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ (Thermo Scientific 3110 Series II CO₂ Water Jacketed - Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA) and when the culture reached confluence (70 – 90%), the cells were washed twice with PBS, detached with TrypLE™ Express Enzyme 1X (Gibco, Grand Island, NY, USA) and the assays were performed according to each protocol.

2.3. MCTS Formation and Experimental Design

The 3D MCTS were cultured according to Friedrich *et al.* (FRIEDRICH *et al.*, 2009). DU145 cells (3.0×10^3 /well) were seeded in a 96-well plate (Greiner Bio-One - Monroe, NC, USA) previously coated with 50 µL of agarose 1.5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted in incomplete medium. Next, the plates were kept in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ for 4 days to allow the MCTS formation. All experiments were launched with a spheroidal area of 300 to 500 µm² on day 4 after microscopic measurement. Treatments were performed with negative control (NC, PBS), solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), and different BrC concentrations according to the test, as established by previous work from our research group in a 2D model (NUNES *et al.*, 2020). As the cell viability from the SV group showed no statistical differences compared to the NC group, all experiments were compared against the SV group. Three independent cultures (n = 3) were performed for each experiment with at least three technical replicates.

2.4 Cell Viability assays in 2D and 3D cultures

2.4.1 Resazurin (AlamarBlue®) reduction assay

The resazurin (AlamarBlue®; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reduction assay was carried out according to Riss *et al.*, (2004). In the 2D model (HGF

and DU145 cells), treatments were performed with solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), positive control (PC; docetaxel 100 μM), and different BrC concentrations (0.24, 0.75, 0.96, 1.50, 3.84, 6.00, 15.36, 24.00, and 30.72 μM) for 24 h. In the 3D model, treatments with controls, different BrC concentrations (5, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 μM), and different times of treatment (24, 48, 72, 96, or 264 h) were performed. Then, 40 μL of 0.5 mM resazurin solution (diluted in PBS) was added to each well (20% of final volume). After 4 h (2D) and 24 h (3D) of incubation (EILENBERGER *et al.*, 2018) the plates were analyzed in a microplate spectrophotometer (Biotek Eon, Winooski, VT, USA). Absorbance obtained were multiplied by the oxidation factor at each wavelength. Cell viability (%) was calculated from the difference between the resulting values of 570 nm (resorufin) and 600 nm (resazurin), and data normalization was performed with SV as 100% cell viability. The IC_{50} values were calculated by linear regression of the percentage toxicity versus the drug concentration using GraphPad Prism® 7.00 software (La Jolla, CA, USA).

2.4.2 Lactate Dehydrogenase Assay

The treatments were performed as described in item 2.4.1. After the 24 h (2D) and 72 h-treatment (3D) samples were analyzed using the commercial LDH kit (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations and methods previously standardized in our laboratory (SPECIAN *et al.*, 2016). For each sample, LDH activity was calculated from the difference between the resulting values of absorbance $\lambda = 680$ nm and $\lambda = 490$ nm, and data normalization was performed with solvent control as 100% LDH release.

2.5 Cell proliferation assays

2.5.1 Clonogenic assay in 2D cultures

The clonogenic assay was carried out according to Franken *et al.*, (2006). DU145 cells were seeded in a 6-well plate (Greiner Bio-One; Monroe, NC, USA), totaling 250 cells per well. After the 24 h-stabilization, BrC (0.24, 1.50, 6.00, and 15.36 μM) and SV (0.25% DMSO) were added to the cultures. The plates were kept immobile in an oven for 7 days. Subsequently, the plates were washed with 1 mL of PBS, and 1 mL of fixative solution (20 mL of ethanol 99% and 40 mL of acetone; v/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added for 10 min, followed by staining with Giemsa 5% (5 min). Next, the plates were washed with distilled water by submersion

and left at room temperature (20°C) for drying and colony counting. The colonies were counted, and results were normalized in relation to the SV control.

2.5.2 Cell proliferation curves in 2D cultures

Cell growth curves based on cell counting and total protein content were prepared according to the method described by Costa Lopes *et al.* (DA COSTA LOPES *et al.*, 2000) and modified by our research group (SERPELONI *et al.*, 2020; SERPELONI *et al.*, 2015). Briefly, DU145 cells (2.5×10^4 /well) were seeded in 24-well plates (Greiner Bio-One), stabilized for 24 h, and treated with SV and BrC (0.24, 1.50, 6.00, and 15.36 μM) for 24 to 96 h. The cells were harvested after 24, 48, 72, and 96 h of treatment and 20 μL of the cell suspension was used for analysis on a Countess™ II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The plates were reincubated and after 2 h, the culture medium was removed, and the proteins precipitated for 15 min in 5% trichloroacetic acid, washed, and colored with 1% bromophenol blue (dissolved in 1% acetic acid) added to the wells. After 30 min incubation, the plates were washed with distilled water, and it was added to the wells 400 μL of Tris-Base was added to the wells for color extraction, all reagents from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The absorbance of extracted bromophenol blue was recorded at $\lambda = 550 \text{ nm}$ in a spectrophotometer (Biotek Eon, Winooski, VT, USA) and used to calculate the total protein content.

2.5.3 MCTS Growth Kinetics, Integrity and Morphology

The integrity and growth kinetics analysis of each DU145 MCTS was carried out according to Friedrich *et al.* (FRIEDRICH *et al.*, 2009a) and Vinci *et al.* (VINCI *et al.*, 2012). Treatments were performed with SV, PC (docetaxel 100 μM), and BrC concentrations (5 to 60 μM). The images were obtained at 0 h, 72 h, and every 48 h over a period of 11 days (264 h). The photomicrographs of the MCTS were captured with an inverted Olympus CKX41 microscope using a x4 objective and Qimaging Pro 7.1 software (Teledyne, Canada). After capturing the image at each specified time, 50% of the supernatant (100 μL) was replaced with drug-supplemented standard medium. MCTS analysis was performed through image processing using Zen 2.3 software (Zeiss, Germany) and the volume was presented in μm^3 .

2.6 Quantification of Intracellular Reactive Species in 2D and 3D models

The quantification of intracellular reactive species was measured with the fluorescent probe CM-H₂DCFDA (5-[and-6]-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) (Molecular Probes; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In 2D, DU145 cells were seeded into 96-well culture black bottom plates (Uniscience do Brasil, Osasco, SP, Brazil) and treated for 1, 3, 6, 12, and 24 h with SV and BrC (0.24 to 30.72 μ M). In 3D, MCTS were treated with SV and BrC (5 to 60 μ M) for 24, 48, or 72 h and were transferred to the black bottom plates. As a positive control, the plates in both models were incubated for 30 min with 1 mM H₂O₂. The plates were then incubated for 30 min with 5 μ M (2D) and 10 μ M (3D) CM-H₂DCFDA in the dark at 37 °C. The fluorescence intensity (FI) was recorded using a Victor™X3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, São Paulo, SP, Brazil) at excitation λ = 485 nm and emission λ = 528 nm and the results were expressed in arbitrary units (A.U.).

2.7 Cell migration in 2D and 3D models

2.7.1 2D Vertical cell migration and invasion assays (Transwell)

The transwell system with inserts was used, which consists of inserting a polyethylene membrane with 8 μ m pores in a 24-well plate. DU145 (5.0×10^4) cells were seeded on the insert membrane in an incomplete RPMI medium containing the treatments with SV and BrC (3.84 and 6.00 μ M). The underside of the plate was filled only with complete RPMI medium. The cells were incubated for 24 h, after which the cells located at the top of the membrane were removed with the aid of a cotton swab and washed with PBS. The cells that migrated through the membrane were fixed with methanol, stained with 0.1% violet crystal (Merck; Darmstadt, Germany), and analyzed using an inverted Olympus CKX41 microscope with a 40x objective. Four fields were analyzed by technical replicate (membrane/well), and the results were presented as the average number of cells from 4 fields in the membrane.

The cell invasion assay was performed using the Corning® BioCoat™ insert matrigel invasion kit in 24-well plates as described by the migration assay and the results were presented considering the control as 100% invasion.

2.7.2 Horizontal migration assay (wound-healing)

The wound-healing assay was performed according to the protocol of Martinotti and Ranzato (MARTINOTTI; RANZATO, 2020). DU145 (5.0×10^5) cells were

seeded per well in 12-well plates and incubated for 24 h. A 200 μ L tip was used to perform a gap by scratching a confluent monolayer at the bottom of the well, the plate was washed with PBS, and the treatments with solvent and BrC (1.50, 3.84 and 6.00 μ M) were added. The images were obtained 24 h and 48 h after the addition of treatments and analyzed using TScratch software version 1.0 (The Mathworks, Natick, MA, USA, 2010). The results were presented as wound size (%), considering the wound size in 0 h as 100%.

2.7.3 3D cell migration

MCTS migration assessment was performed as described by Vinci *et al.*, (2013). The commercial ECM Gel® solution (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri USA), was diluted in incomplete RPMI 1640 medium and 50 μ L (200 μ g/mL) was pipetted into each well of the 96-well plates. The plates remained at room temperature for 3 h to fix ECM Gel®. The unadhered volume was carefully removed, the wells were washed twice with PBS, and 100 μ L of a 1% (m:v) bovine serum albumin (BSA) blocking solution diluted in PBS was added for 1 h, protected from light, at room temperature. Next, fully formed MCTS were transferred, and the SV and treatments (BrC 5 to 60 μ M) were added. The images of the MCTS were captured at 0, 24, and 48 h by an inverted Olympus CKX41 microscope with the aid of Qimaging Pro 7.1 software (Teledyne, Canada) using a 4x objective. Migration assessment was performed through image processing using the AxioVision 3.1 software (Zeiss, Germany). Areas were presented in μ m².

2.8 Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

To assess gene expression, BrC (5 and 50 μ M) were chosen due to their anti-migratory and cytotoxic effects, respectively. DU145 MCTS were treated with SV and BrC for 48 h. The supernatant was removed, and the total RNA from each sample (96 spheroids) was extracted using the PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). The RNA quantification was performed spectrophotometrically on NanoDrop 200c equipment (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) as well as the A260/A230 and A260/A280 ratios. After quantification, 1 μ g of RNA was treated with DNase I, amplification grade (1U/ μ L), and the cDNA was generated using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR reactions were performed on the Techne Quantica® thermocycler using the Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final reaction volume was 11.5 µL, with 5 pmol (0.2 µL) of each oligonucleotide primer, 10 ng of template cDNA (1 µL), and 5 µL of SYBR® Green. The reaction mixture was subjected to the following amplification program: 95°C (5 min), 40 cycles of 15 s at 95°C, 15 s at 60 °C, and 30 s at 72°C. All reactions were performed in technical triplicate.

The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method according to Schmittgen and Livak (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Primers of genes associated with cell death and proliferation (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP9*, *TNF- α* , *BIRC-5*, and *NKX3.1*), and cell adhesion, invasion, and migration (*CDH1*, *ITGAM*, *MMP9*, and *MMP11*) were purchased from Sigma-Aldrich (KiCqStart® SYBR® Green Primers) and normalized with the reference genes (*GAPDH*, *HPRT1*, and *RPS18*) which had good stability according to NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

2.9 Western blot analysis

To evaluate the expression of proteins involved in cell death pathways, DU145 MCTS were treated with SV and BrC (50 and 60 µM) for 72 h. All reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US) to use iBlot 2 Western Blot Transfer. The whole-cell lysates from each sample (96 spheroids) were obtained with RIPA (Radioimmuno Precipitation Assay) Lysis, and extraction buffer containing halt protease inhibitor cocktail. Protein concentrations were determined using a Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit with standard colorimetric measurement by a spectrophotometer plate reader at $\lambda = 595$ nm. Next, samples (10 µg) containing Bolt 4X LDS sample buffer and 10X Bolt™ sample reducing agent were denatured at 70°C for 10 min in a dry bath. Subsequently, proteins were electrophoresed in NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 12-well using a Mini Gel Tank and proteins were transferred to PVDF and nitrocellulose membranes using the iBlot 2 Gel Transfer Device.

Immunodetection was performed by overnight incubation with primary antibodies (1:500): NF-kB p65 (Cat. N° A2547), CASP-8 (Cat. N° A0215), CASP-7 (Cat. N° A1524), CASP-3 (Cat. N° A2156), BAX (Cat. N° A0207), TNF- α (Cat. N° A0277), and β -Actin (Abcam; Cat. N° ab8227) followed by 2 h of incubation with

secondary antibody Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (1:5000; Abclonal; Cat. N° AS014). SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US) was used to visualize immunoreactions for 10 min, and the chemiluminescence signals were recorded digitally using the L-Pix Chemi photodocumentator (Loccus Biotechnology; Cotia, SP, Brazil) coupled with L-Pix Image software (Loccus Biotechnology). The densitometric values were assessed by ImageJ software (NIH.gov) and the final quantification shows protein levels as a ratio of each target protein band to the housekeeping protein (β -Actin).

2.10 Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation and were analyzed by One-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Tukey's test ($p \leq 0.05$), for the comparison between SV and other groups using GraphPad Prism® 7.00 software (La Jolla, CA, USA). Sample normality was tested using the Shapiro Wilk's test. In the gene and protein expression analysis, the treatments were considered to have altered gene expression when the fold change (FC) of the target gene differed from the SV group (Student's t-test and ANOVA test, $p \leq 0.05$).

3. Results

3.1 BrC reduces DU145 cell viability in 2D cultures and MCTS

Cell viability was evaluated using resazurin and LDH assays. In the resazurin assay, after 24 h, the BrC calculated IC_{50} values were 47.31 and 229.8 μ M in 2D and 3D models, respectively. Furthermore, after the same time of treatment, the BrC calculated IC_{50} in HGF cells in the 2D model was 42.88 μ M (Supplementary Figure 1). In 3D spheroids (Figure 2b), BrC 50 μ M reduced cell viability after 24, 48, and 96 h, while BrC 60 μ M demonstrated the same action at all times of treatment. After 96 h, BrC 60 μ M reduced cell viability to 47%, an effect similar to that observed for docetaxel 100 μ M (49%) after the same time of exposure. The BrC calculated IC_{50} values in MCTS were time dependent with values of 229.8, 210.5, 116.1, and 65.02 μ M after 24, 48, 72, and 96 h, respectively (Figure 2c). Overall, BrC 60 μ M demonstrated an effect similar to the chemotherapeutic drug docetaxel (100 μ M) on the cell viability of prostate MCTS at all times of treatment.

The same pattern was observed in the LDH release assay in both models. The calculated IC_{50} values were 188.7 μ M after 24 h, and 104.8 μ M after 72 h of treatment

in 2D and 3D models, respectively (Figure 3).

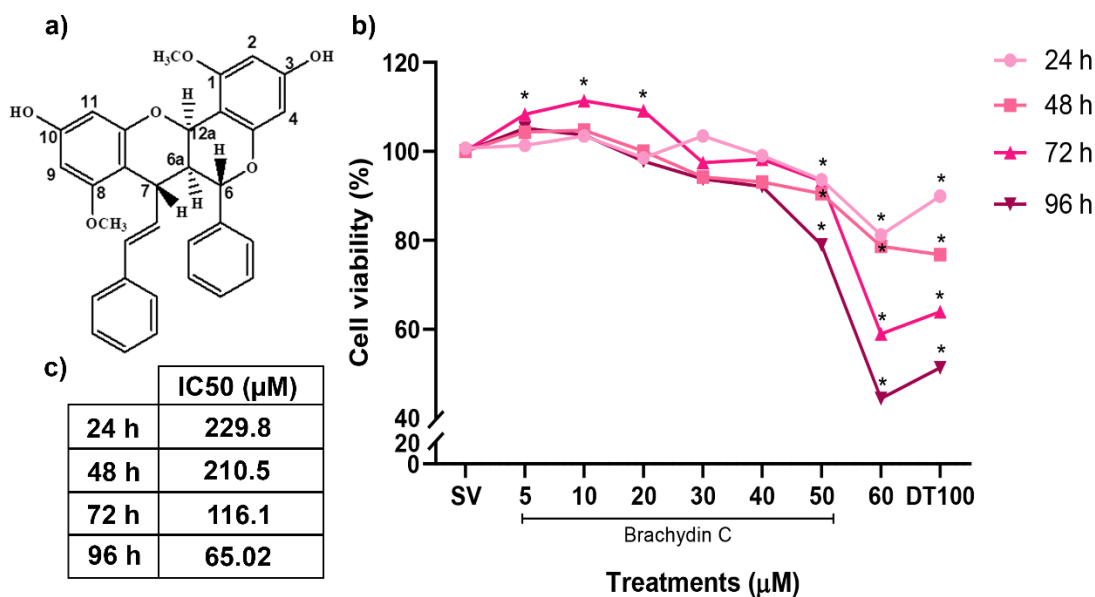


Figure 3. (a) Chemical structure of the flavone Brachyidin C (CID: 102339052). (b) Cell viability of DU145 multicellular tumoral spheroids (MCTS) after 24, 48, 72, and 96 h of treatment with Brachyidin C (5 to 60 μM), solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), and positive control (docetaxel, DT 100 μM). The cell viability was measured by the resazurin assay. (c) Calculated IC₅₀ values of Brachyidin C in MCTS after different times of treatment. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as mean ± SD. *Significantly different from SV ($p \leq 0.05$), ANOVA followed by Tukey's post-test.

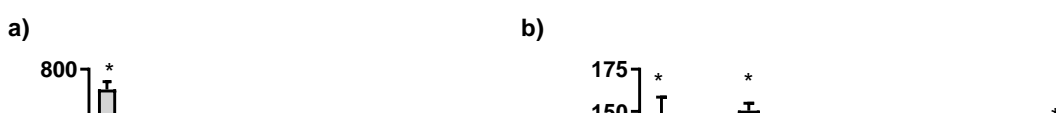


Figure 4. LDH release of DU145 cultured in (a) 2D model after 24 h and (b) multicellular tumoral spheroids after 72 h of treatment with Brachyidin C, solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), docetaxel (DT 100 μM), and positive control (PC, 100% cytolysis). The LDH levels in the culture medium were measured with a lactate dehydrogenase (LDH) assay kit. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as mean ± SD. *Significantly different from solvent control ($p \leq 0.05$), ANOVA followed by Tukey's post-test.

3.2 BrC did not decrease cell proliferation in 2D but affected DU145 MCTS integrity and morphology

The clonogenic assay and cell proliferation curves were used to assess the effect of BrC on the replicative capacity of DU145 cells in the 2D model. BrC (0.24, 1.50, 6.00, and 15.36 μM) did not impair surviving fraction (%) (Figure 4a) or proliferation evaluated through cell counting (Figure 4b) and total protein content (Figure 4c). In this context, no antiproliferative effects of BrC were observed after any period of treatment.

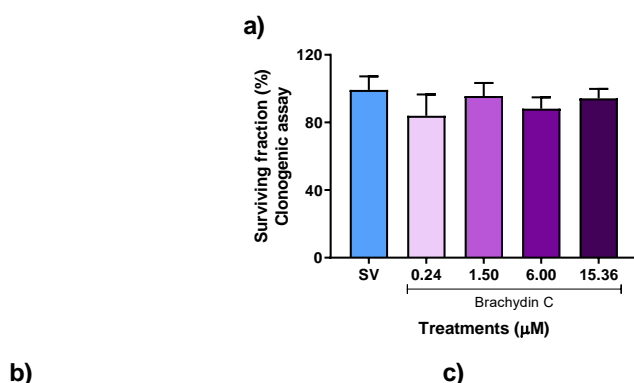


Figure 5. (a) Surviving fraction (%) of DU145 prostate cells after treatments with solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), docetaxel (DT, 2 mM) and brachydin C (0.24, 1.50, 6.00, and 15.34 μM) in the clonogenic assay. Cell proliferation growth curves of DU145 cells treated with SV and BrC for 96 h as assessed by (b) the number of cells and (c) quantification of total proteins. Data represent the mean \pm standard deviation obtained in biological triplicates (N=3). * $p \leq 0.05$ vs. SV group (DMSO 0.5%) after ANOVA followed by Tukey's test.

In the 3D model, MCTS were analyzed for 11 days after the fourth day of initiation at 48-h intervals, and the results are presented in Figure 5a. From day 7 onwards, BrC (5, 10, and 20 μM) decreased the growth of spheroids when compared to the SV. A different effect was observed after treatment with BrC (30, 40, 50, and 60 μM) which induced the spheroid disaggregation, causing an increase in the volume followed by a significant reduction. In contrast, after treatment with DT 100 μM , no increase in the total volume of the MCTS was observed. After day 7, DT 100 μM induced a drastic reduction in the spheroid volume until complete disaggregation

(Figure 5b). The resazurin assay on day 11 demonstrated that BrC concentrations which induced spheroid disaggregation (30, 40, 50, and 60 μM) reduced cell viability to 58, 47, 14, and 11%, respectively (Figure 5c), showing that longer treatments are more efficient in inducing cell death at chemotherapy levels.

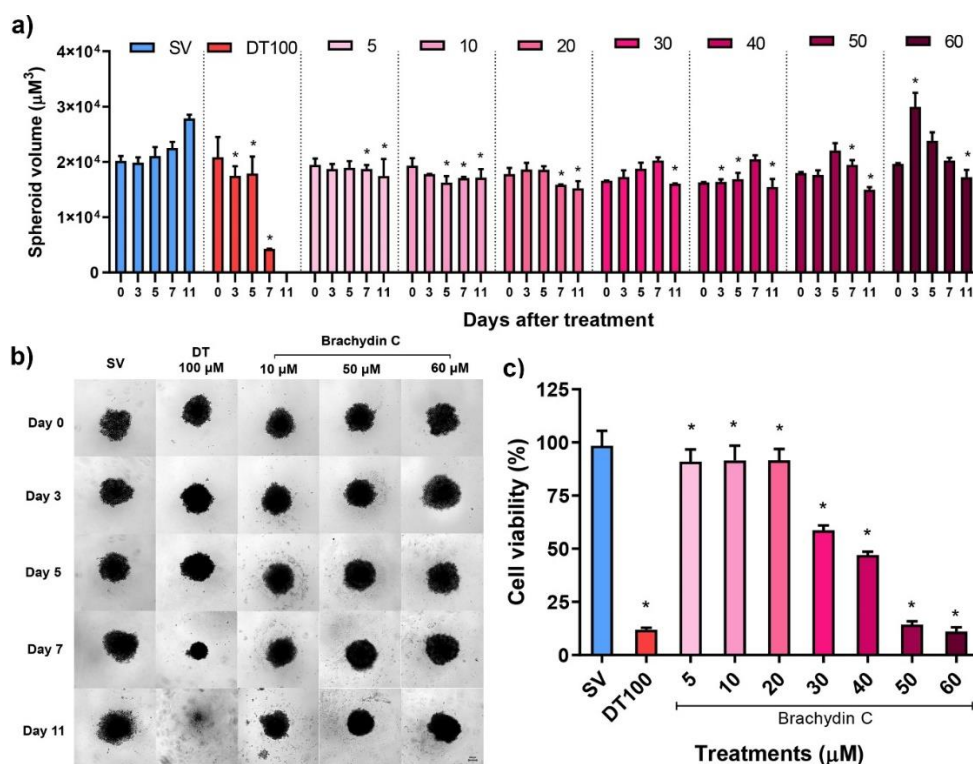


Figure 6. (a) Volume (μM^3) of DU145 multicellular tumoral spheroids (MCTS) treated for 11 days with Brachydin C (5 to 60 μM), solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), and positive control (docetaxel, DT100 μM). The points represent the average of the volume covered by the spheroids (N = 3). (b) Representative images of MCTS growth and integrity after treatment with SV, DT 100 μM , and BrC (10, 50, and 60 μM). Original 40x magnification. Bar represents 100 μm . (c) Cell viability on day 11 measured by the resazurin assay. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as mean \pm SD. *Statistically different from the SV control on the day of analysis. ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$).

3.3 BrC did not alter the redox state of DU145 cells in 2D cultures and MCTS

The effects of CM-H₂DCFDA allowed reactive species quantification through the emission of a fluorescent signal and were used to evaluate the effects of BrC on redox status of DU145 cell culture in 2D and 3D models. As shown in Figures 6a (2D) and 6b (3D), none of the BrC concentrations tested changed the redox state when compared to the SV group. The activity of the CM-H₂DCFDA probe for reactive species detection was proven after observing a significant increase in the fluorescent

signal after the addition of H₂O₂ (1mM) at all times of treatment.

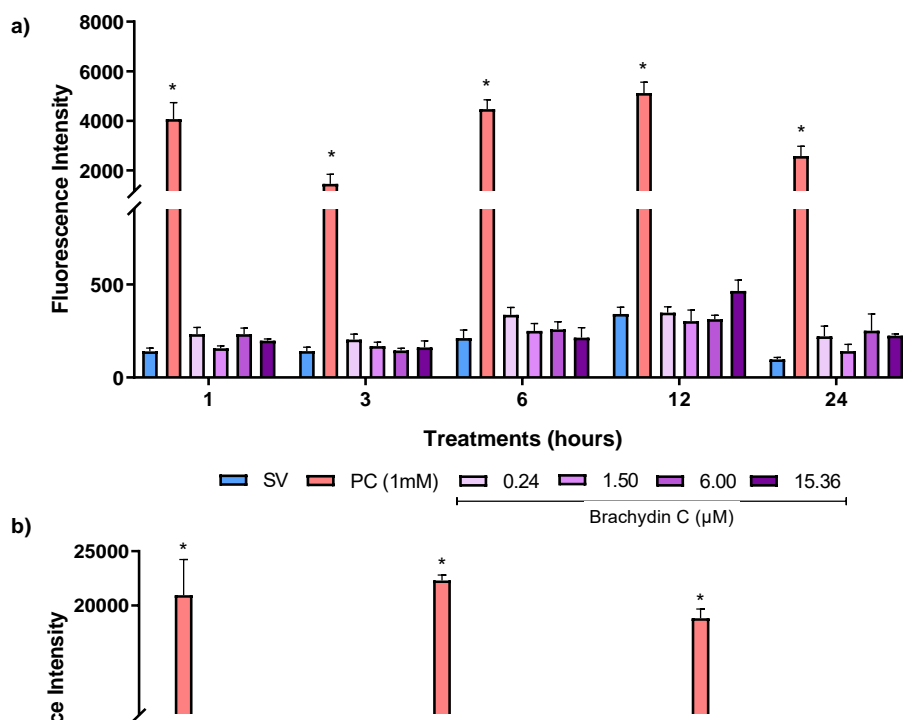


Figure 7. Production of reactive species detected by the fluorescent probe CM-H₂DCFDA in DU145 cell culture in (a) 2D and (b) multicellular tumoral spheroids treated with solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), Brachylin C, or positive control (PC, 1mM, hydrogen peroxide for 30 min.) *Statistically different from the SV. ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$).

3.4 BrC reduced DU145 cell migration and invasion in 2D model

Three different assays were used to assess the effect of BrC on the migration capacity of DU145 cells in 2D monolayers. The results shown in Figure 7a, demonstrate that BrC 6.00 μM decreased horizontal migration in the wound healing assay after 48 h of treatment compared with SV. The representative images of these treatments are depicted in Figure 7b. Additionally, Figures 7c and 7d show that BrC 6.00 μM decreased the vertical migration and invasion of DU145 cells by the transwell system after 24 h of treatment, and their respective representative images are depicted in Figures 7e and 7f.

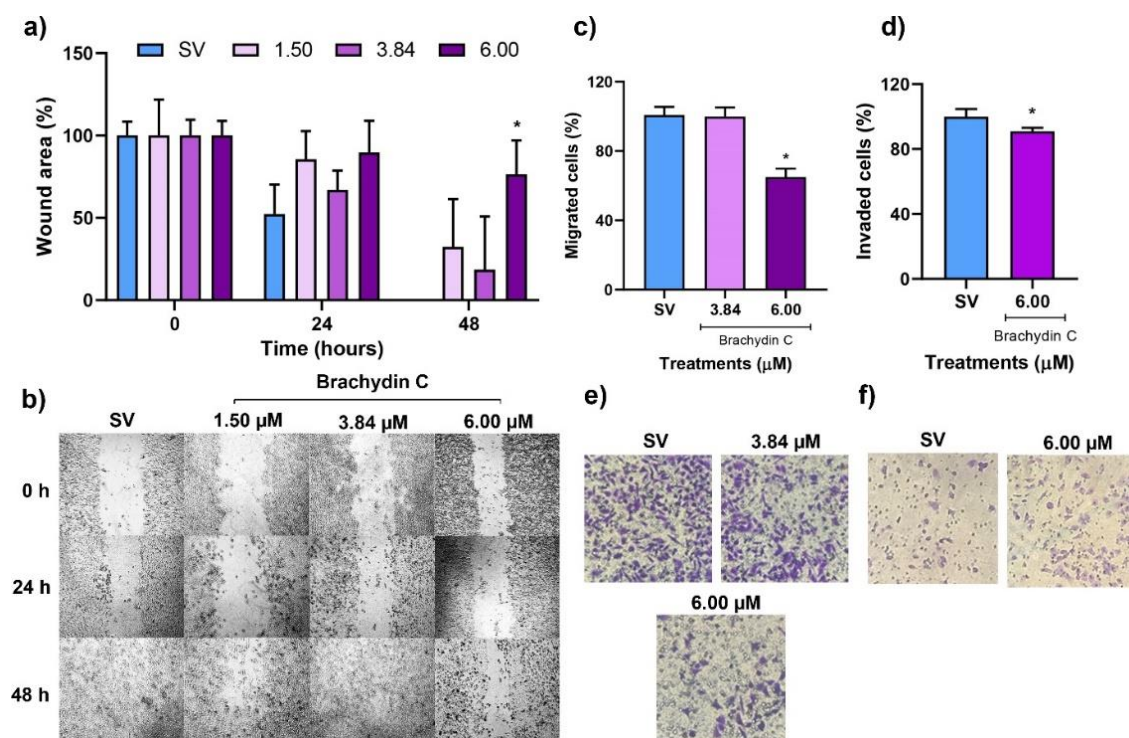


Figure 8. BrC impaired the migration of DU145 cells in 2D cultures. Percentage of (a) wound area after different times of treatment (0, 24, and 48 h). b) Representative figures in 4X objective. Percentage of (c) migrated and (d) invaded DU145 cells in transwell chambers after 24 h of treatment with BrC (3.84 and 6.00 μM) and solvent vehicle (SV; DMSO 0.25%) and representative figures 10X (e) migrated and (f) invaded cells. The bars represent the mean \pm standard deviation (sum of 4 fields in the membrane in 10X objective). All measurements were carried out in biological triplicates and the data are shown as mean \pm standard deviation. *Significantly different from SV control of the respective time of treatment, ANOVA followed by Tukey's post-test, ($p \leq 0.05$).

3.5 BrC impaired DU145 cell migration in MCTS

The ECM[®] migration assay was performed to assess the anti-migratory effects of BrC on DU145 MCTS. After 48 h, BrC (5 to 60 μM) impaired cell migration compared to SV control (Figure 8a). Figure 8b shows representative images of the migration area of MCTS treated with BrC (5, 40, 50, and 60 μM).

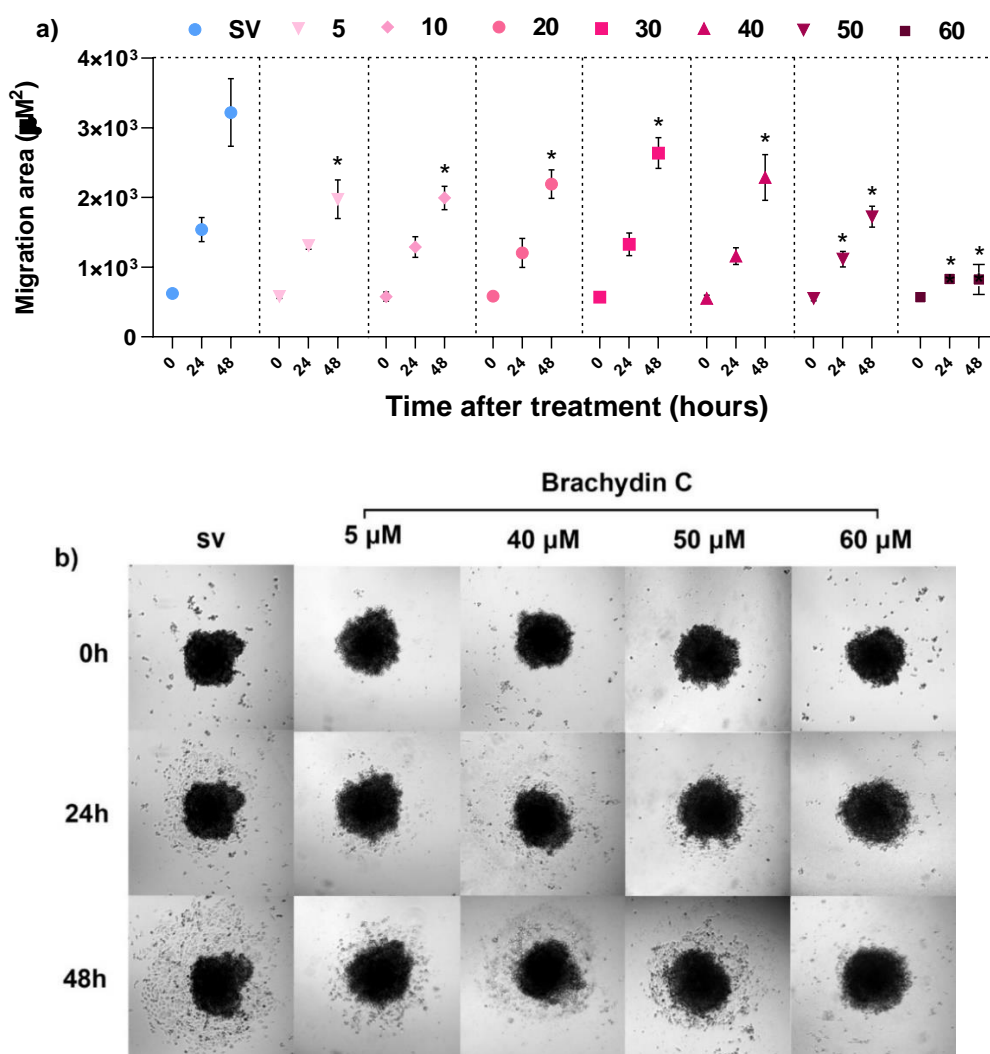


Figure 9. (a) Area of cell migration (μM^2) from the multicellular tumoral spheroids in the extracellular matrix (ECM[®]) evaluated 0, 24, and 48 h after treatment with Brachydin C (BrC 5 to 60 μM) and solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%). The bars represent the mean \pm standard deviation of the area covered by the spheroid and cell migration. *Statistically different from the SV group. ANOVA and Dunnett's post-test, ($p \leq 0.05$). (b) Representative images of DU145 MCTS cell migration area. Original 40x magnification. Bar represents 100 μm .

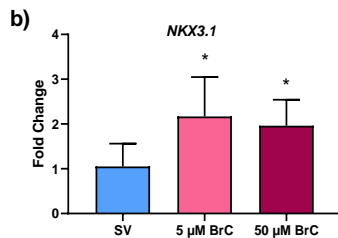
3.5 BrC modulates mRNA levels of genes related to cell death, cell proliferation, migration, and invasion in DU145 MCTS

To further characterize the cytotoxic effects of BrC, the expression of *BCL2*, *CASP3*, *CASP9*, *BAX*, *BIRC5*, and *TNF- α* genes in DU145 MCTS exposed to BrC 5 and 50 μM were examined using RT-qPCR analysis after 48 h. The cytotoxic concentration of BrC (50 μM) upregulated *CASP3* and *TNF- α* , while both concentrations tested, 5 and 50 μM , downregulated *BIRC5* (Figure 9a).

BrC (5 and 50 M) upregulated the tumor suppressor gene *NKX3.1* (Figure 9b), which is correlated with antiproliferative activity on DU145 MCTS.

MMP9, *MMP11*, *ITGAM*, and *CDH1* gene expression were measured to further characterize the anti-migratory effects of BrC. BrC downregulated *MMP9* (BrC 5 μ M), *MMP11* (BrC 5 and 50 μ M), and *ITGAM* (BrC 50 μ M) (Figure 9c) besides upregulating the *CDH1* gene (BrC 50 μ M). The complete data on gene expression analysis are presented in supplementary Table1.

a)



c)

Figure 10. Quantitative real time polymerase chain reaction of genes related to (a) cell death,

(b) cell proliferation, and (c) cell adhesion and migration evaluated in DU145 multicellular tumoral spheroids after 48 h of treatment with solvent group (SV, DMSO 0.25%) and Brachydin C (5 and 50 μM). Bars represent mean \pm standard deviation. *Fold change of the target gene differed from the SV group. Student's t-test, $p \leq 0.05$. The *RPS18*, *GAPDH*, and *HPRT1* were used as reference genes.

3.6 BrC modulated the expression of proteins related to cell death pathways in DU145 MCTS

The relationship between the BrC (50 and 60 μM) cytotoxic effect and proteins (CASP3, CASP7, CASP8, NF- κB , BAX, and TNF- α) involved in the cell death pathway was assessed by western blotting. The protein levels of CASP3, CASP8, and NF- κB did not differ from the SV group (the complete data are presented in Supplementary Table 2). On the other hand, CASP7 and BAX were upregulated and TNF- α downregulated after treatment with BrC 60 μM (Figure 10). These results may support the role of BrC as an anticancer agent by modulating the expression of genes involved in the cell death pathway.

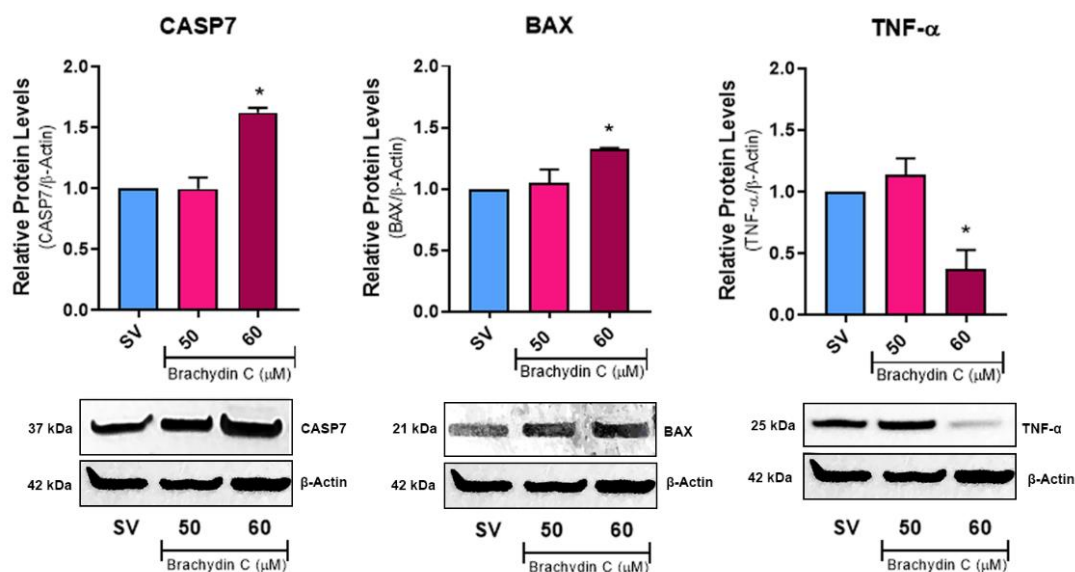


Figure 11. Modulation in the expression of proteins involved in cell death by Brachydin C. Western blotting analysis in homogenates isolated from DU145 multicellular tumoral spheroids treated with Brachydin C (50 and 60 μM) or solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%) for 72 h. *Statistically different from the SV group. Student's t-test, $p \leq 0.05$. β -Actin was used as a reference protein.

4. Discussion

Chemotherapy is a crucial treatment for prostate cancer. However, drug resistance is a common and significant problem that compromises the efficacy of

this therapy, emphasizing the importance of developing new anticancer agents (HUSSAIN *et al.*, 2021). Because cancer cells have the capacity to change the signaling pathway, pharmacological inhibition of a specific pathway is insufficient to limit cancer development. In this perspective, a drug with the ability to disrupt several signaling pathways might be a promising cancer therapy option (MAKWANA; RUDRAWAR; ANOOPKUMAR-DUKIE, 2021).

BrC, evaluated in the present study, is a flavonoid, a class of compounds that have become attractive as anticancer agents in prostate cancer because they can achieve these effects by suppressing cell proliferation (YE *et al.*, 2020), impairing angiogenesis (DEEP *et al.*, 2012), inhibiting cell migration (WANG *et al.*, 2021), causing cell cycle arrest (CHEN *et al.*, 2020), promoting apoptosis (LI *et al.*, 2021), and modulating oxidant enzymes (KIM *et al.*, 2020). Our research group previously described the anticancer effects of BrA, BrB, and BrC in prostate cancer cells (PC3) cultured in 2D monolayer (NUNES *et al.*, 2020). Herein, the antitumoral effects of the flavonoid BrC were investigated using DU145 cells cultured in 2D and 3D models of prostate cancer.

Tumor cells showed different efficiency of spheroid formation, or none, and even for the same tumor type, the efficiency of MCTS formation was different depending on cell lines (HAN *et al.*, 2021). This fact is mainly related to the inherent differences in cell-to-cell adhesions of cancer cell lines that result in differences in the formation and compactness of MCTS, classifying their morphology into three groups: compact spheroids, tight aggregates, and loose aggregates of cells. As can be seen in Figures 6b and 9, DU145 cells form tight aggregates and, in most circumstances, these MCTS are more sensitive to drugs than compacted aggregates (HAN *et al.*, 2021).

We first evaluated the effects of BrC on viability in 2D and 3D models using resazurin, which evaluates the inherent reductive capacity of viable cells (EILENBERGER *et al.*, 2018) and the LDH assay, which indicates plasma membrane permeabilization caused by cell death (KABAKOV; GABAI, 2018). BrC was shown to be a time-dependent cytotoxic to DU145 spheroids in the resazurin assay, with an calculated IC_{50} almost 5 times higher than that found in a 3D model. Similar results were reported by De Grandis *et al.* (DE GRANDIS *et al.*, 2021) who treated DU145 cells with cisplatin for 24 h and the drug resistance of DU145 cells was 3 times higher in MCTS than in 2D culture. These findings confirm how cells grown in 2D and 3D

models behave differently. The results with cytotoxic flavonoid BrC were consistent with the fact that, when compared to 2D culture, 3D MCTS contains an extra area of extensive cell-cell contacts that function as a physical barrier to restrict drug diffusion, and, consequently, results in increased drug resistance (GONG *et al.*, 2015). Besides prostate, different MCTS displayed markedly higher resistance to chemotherapeutic drugs than 2D cultures, such as those from colon (KOCH *et al.*, 2021) and breast tumor cells (IMAMURA *et al.*, 2015).

Apoptosis signaling pathways have been demonstrated to be attractive targets for the development of new anticancer agents (CHUNG, 2018). We assessed the expression of genes and proteins involved in cell death using DU145 spheroids to better explore the mechanism involved in the decrease in cell viability. *CASP3* was upregulated in BrC (50 μM) treatment, while *CASP9* gene expression was not affected. We also found that BrC (60 μM) increased *CASP7* protein expression, while having no effect on *CASP8*. Caspases are involved in both the intrinsic and extrinsic pathways of apoptotic cell death and have been proposed for use in therapeutic approaches (BOICE; BOUCHIER-HAYES, 2020). *CASP8* and *CASP9* trigger the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways, respectively, which subsequently activate downstream effector caspases (*CASP3* and *CASP7*), resulting in cell death.

We found the gene of cytokine TNF- α , one of the major inflammatory signaling pathways, upregulated in BrC (50 μM) and TNF- α protein downregulated in BrC (60 μM), which may suggest a different role of BrC in the pathways activated by this cytokine. In addition, BrC seems to reduce cell viability via different pathways depending on the concentration evaluated. Overall, our findings suggest that BrC had no effect on initiator caspases, despite the effectors being upregulated. Several studies indicate that flavonoids can play a role in the extrinsic apoptotic pathway (ABOTALEB *et al.*, 2019; ELANGO *et al.*, 2018; KAUNTZ *et al.*, 2011), whereas others suggest that the intrinsic apoptotic pathway is involved (CHOI; JUNG; KIM, 2014; QIN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015).

Apoptosis evasion is a survival strategy used by most malignancies, and as resistance to anticancer agents becomes more prevalent, therapies targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) have garnered substantial scientific interest in re-sensitizing cancer cells to chemotherapies (FRAZZI, 2021; RATHORE *et al.*, 2017). *BIRC5* codifies the IAP survivin, which was downregulated by BrC (5 and 50 μM) in MCTS. Survivin inhibited *CASP9* (intrinsic pathway) and effector caspases (like

CASP7 and CASP3), and cell cycle control, and has a role in signaling pathways such as p53, Wnt, hypoxia, TGF, and Notch (CHEN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-GARCÍA *et al.*, 2019). Survivin anticancer strategies can be classified into inhibitors; (i) of the interaction of survivin and its partner proteins; (ii) of survivin homodimerization; (iii) that decrease *BIRC5* transcription; (iv) that induce *BIRC5* mRNA degradation; and (v) immunotherapy (LI *et al.*, 2019). Our results suggest that BrC (5 and 50 μM) decreases *BIRC5* transcription or induces the degradation of its mRNA, a very promising result considering the role of survivin as a target and biomarker for drug development and cancer therapy.

Furthermore, reactive species have been shown to have a significant role in cell death and several chemotherapy drugs stimulate an imbalance in redox state to kill the cancer cells (KASIAPPAN and SAFE, 2016). Flavonoids play a dual function in redox status homeostasis, acting as both antioxidant and pro-oxidant agents (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Our results with the CM-H₂DCFDA probe showed that BrC had no effect on redox status, suggesting that the decrease in cell viability observed in BrC-treated DU145 cells is not attributable to oxidative stress.

Besides cell death, proliferation is a critical component of cancer growth and progression, indicating the capacity of cells to divide. In the 2D models, clonogenic assay, and cell proliferation curves, BrC (0.24 to 15.36 μM) treatments had no effect on cell proliferation. In the 3D model, antiproliferative effects were observed in all concentrations evaluated. *NKX3.1* is a tumor suppressor gene that plays important roles in epithelial prostate cell proliferation (ANTAO; RAMAKRISHNA; KIM, 2021). As a result, its loss of expression is frequent in prostate cancer and is linked to cancer development (HAO *et al.*, 2020). Studies with human prostate cells have demonstrated that the upregulation of *NKX3.1* in LNCaP cells reduced cell proliferation (JIANG *et al.*, 2005), whereas stabilization of *NKX3.1* expression suppressed the proliferative and invasive activities of PC-3 cells (ZHANG *et al.*, 2010). BrC (5 and 50 μM) upregulated *NKX3.1*, a result that might represent a mechanism by which this flavonoid decreased cell proliferation in all concentrations evaluated while simultaneously interfering with spheroid integrity.

To investigate the morphology of spheroids, as well as the effect of treatments on spheroid architecture (FOGLIETTA *et al.*, 2020), BrC (30, 40, 50, and 60 μM) promoted light disruption of spheroids, resulting in an increase in area followed by a substantial decrease, suggesting that BrC has an influence on the integrity of

spheroids. Furthermore, the increase in the volume might be attributed to the loss of cell-cell adhesion after the early death of some cells. Our results obtained in *ITGAM* expression analysis corroborate the architectural changes since the integrin was downregulated after BrC 50 μM but not BrC 5 μM . Integrin is involved in a variety of adhesion interactions, and its expression has been associated with tumor survival, angiogenesis, and metastasis markers such as VEGF, PIP5K1, and Ser437-pAKT (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010; KARLSSON *et al.*, 2020).

BrC inhibits the migration of DU145 prostate cancer cell lines in 2D and 3D cultures. Cell migration is a key characteristic of tumor invasion, metastasis, and angiogenesis, and it has been closely linked to a poor prognosis (TRINDADE *et al.*, 2019). Tumor cells acquire a mesenchymal phenotype during epithelial-mesenchymal transition (EMT), when cell polarity and the connection to the basement membrane are lost and the capacity to breakdown extracellular matrix is acquired (DEEZAGI; SAFARI, 2020; YANG *et al.*, 2020), allowing the cells to pass through the basement membrane and destroy the ECM using metalloproteinases before reaching the circulation (ROY *et al.*, 2020). MMPs, in general, promote the degradation of several ECM components, and *MMP9* and *MMP11*, in particular, play key roles in tumor initiation and invasion (PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016).

RT-qPCR analysis showed modulation of the biomarkers of EMT after treatment with BrC. *MMP9* (BrC 5 μM) and *MMP11* (BrC 5 and 50 μM) were downregulated. Elevated *MMP9* mRNA levels were detected in serum from individuals with different cancers, and were correlated with a poor prognosis (MARÍN-AGUILERA *et al.*, 2015), while upregulation of *MMP11* decreased patient survival rate (GENG *et al.*, 2020; SBARDELLA *et al.*, 2012). Because of its affinity for collagen IV, *MMP9* has previously been recognized as a basement membrane degrading protease and *MMP11* interacts with stromal components, contributing to malignancy of human tumorigenesis (GENG *et al.*, 2020). Besides MMP genes, BrC 50 μM upregulated *CDH1*, which encodes E-cadherin. “Cadherin switching” is the downregulation of E-cadherins and upregulation of N-cadherins in EMT (LOH *et al.*, 2019). Reduced E-cadherin expression was more common in recurrent than in primary cancer and is positively associated with tumor progression (BURANDT *et al.*, 2021). Our results showed that BrC can modify the EMT mechanism and could be further explored regarding its role as an antimetastatic compound. Among the advantages of the 3D MCTS model is the similar expression of genes and proteins compared to solid tumors

that could be a suitable *in vitro* model for studying tumor biology and drug discovery (CONDELLO *et al.*, 2019) and reinforces the importance of our results obtained in these parameters.

5. Conclusions

In conclusion, BrC exhibited cytotoxic as well as antiproliferative effects and can target the IAP codified by *BIRC5*, and its inhibition renders cancer cells susceptible to apoptotic cell death. This cytotoxic effect might also be attributed to the modulation of *TNF- α* and *CASP3* genes and *CASP7* protein. The decreasing cell proliferation could be due to upregulation of *Nkx3.1*. BrC reduced DU145 cell motility by upregulating *CDH1* and downregulating *ITGAM*, *MMP9* and *MMP11*. Moreover, these data point to the effectiveness of BrC in 3D cellular systems, which have been shown to be more resistant to therapies than 2D models. BrC was shown to control a variety of important signaling pathways involved in cancer progression and, because of the preceding investigations, BrC is a good candidate as a prostate anticancer agent and has the potential to be further investigated as a promising therapeutic option. Future experiments with cells obtained from patients (organoids) and *in vivo* experiments with xenographic tumors are planned to further investigate BrC in different concentrations and its possible clinical application.

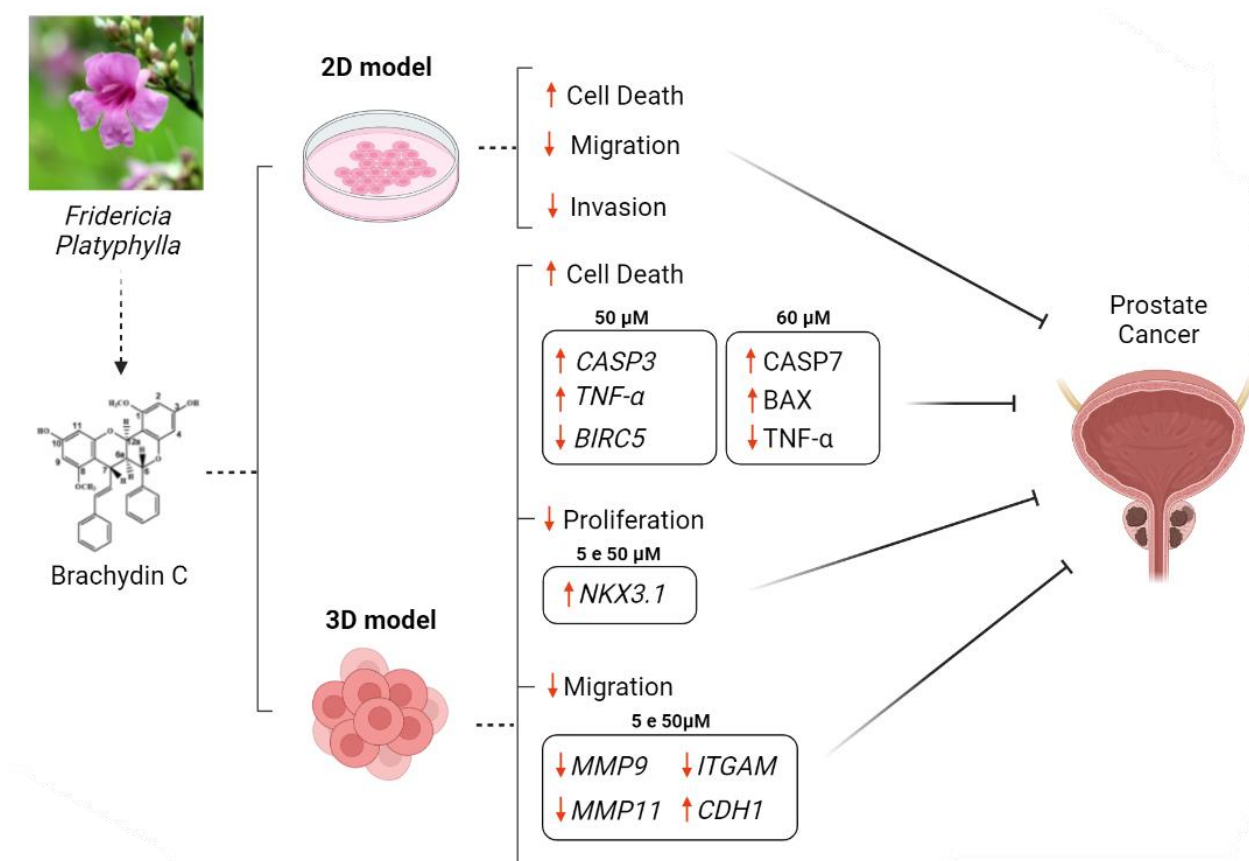


Figure 12. Graphical abstract of Brachyidin C activities in 2D and 3D models of prostate cancer. Cell death was induced by BrC, whereas cell proliferation, migration, and invasion were decreased.

Supplementary Materials



Figure S1. Cell viability of (a) DU145 and (b) HGF cultured in 2D model after 24 h of treatment with Brachydin C (0.24 to 30.72 μM), solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%), and positive control (docetaxel, DT 100 μM). The cell viability was measured by the resazurin assay. All measurements were carried out in biological triplicates (N=3) and the data are shown as mean \pm SD. *Significantly different from SV ($p \leq 0.05$), ANOVA followed by Tukey's post-test.

Table S1. Quantitative real time polymerase chain reaction of genes related to cell death, proliferation, adhesion, and migration evaluated in DU145 multicellular tumoral spheroids (MCTS) after 48 h of treatment with Brachyidin C (5 and 50 μ M) or solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%). Fold change of the target gene was considered different from the SV group when $p \leq 0.05$ (Student's t-test). *RPS18*, *GAPDH*, and *HPRT1* were used as reference genes.

Gene expression			
Gene Name	BrC (μM)	Fold Change	p-value
Cell Death			
<i>TNF-α</i>	5	1.33	0.2621
	50	4.11	0.0008
<i>BIRC5</i>	5	0.47	0.0052
	50	0.34	< 0.0001
<i>BAX</i>	5	0.78	0.1379
	50	1.06	0.8263
<i>BCL2</i>	5	1.72	0.0819
	50	0.97	0.7617
<i>CASP9</i>	5	0.98	0.8810
	50	0.80	0.1178
<i>CASP3</i>	5	0.77	0.2292
	50	1.78	0.0100
Cell proliferation			
<i>Nkx3.1</i>	5	2.17	0.0192
	50	1.96	0.0087
Cell adhesion and migration			
<i>CDH1</i>	5	0.89	0.5849
	50	2.03	0.0005
<i>ITGAM</i>	5	0.99	0.8499
	50	0.55	0.0115
<i>MMP9</i>	5	0.52	0.0078
	50	1.36	0.3107
<i>MMP11</i>	5	0.38	0.0003
	50	0.13	< 0.0001

Table S2. Expression of proteins involved in cell death evaluated by Western blot analysis in homogenates isolated from DU145 MCTS treated with Brachyidin C (50 and 60 μM) or solvent vehicle (SV, DMSO 0.25%) for 72 h. Fold change of the target gene was considered different from the SV group when $p \leq 0.05$ (Student's t-test). The β -actin protein was used as a reference protein.

<i>Protein expression</i>			
<i>Protein</i>	<i>BrC (μM)</i>	<i>Fold Change</i>	<i>p-value</i>
CASP3	50	0.84	0.5941
	60	0.95	0.3191
CASP7	50	0.93	0.9965
	60	1.65	0.0030
CASP8	50	0.86	0.5644
	60	1.07	0.8832
BAX	50	0.97	0.6718
	60	1.31	0.0239
TNF- α	50	1.05	0.4821
	60	0.58	0.0216
NF κ B	50	0.81	0.3631
	60	1.24	0.5265

Author Contributions: Conceptualization, J.M.S., I.M.S.C. and L.C.B.O.; methodology, L.C.B.O. and J.R.N.; formal analysis, L.C.B.O, J.M.S and I.M.S.C.; investigation, L.C.B.O, J.M.S and I.M.S.C.; resources, J.M.S, I.M.S.C, C.Q.R and D.L.R; data curation, L.C.B.O, J.M.S and I.M.S.C.; writing—original draft preparation, L.C.B.O, I.M.S.C. and J.M.S; writing—review and editing, L.C.B.O, I.M.S.C. and J.M.S.; supervision, D.L.R, I.M.S.C and J.M.S.; project administration, D.L.R, I.M.S.C and J.M.S.; funding acquisition, I.M.S.C and J.M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: Grants 426246/2018-7 and 401516/2016-4) and CAPES (Finance Code 001 – Brazil).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are grateful to Dr. Cláudia Bueno dos Reis Martinez (Universidade Estadual de Londrina) for the use of the Victor X3 microplate fluorimeter and Dr. Claudete de Fatima Ruas (Universidade Estadual de Londrina) for the use of the L-Pix Chemi photodocumentator.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

- ABOTALEB, M. *et al.* **Flavonoids in cancer and apoptosis**. MDPI AG, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>
- AGHAJANI, M. *et al.* CD133 suppression increases the sensitivity of prostate cancer cells to paclitaxel. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 3691–3703, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05411-9>.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- ANTAO, A. M.; RAMAKRISHNA, S.; KIM, K. S. The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. **International Journal of Stem Cells**, v. 14, n. 2, p. 168–179, 2021. Available at: <https://doi.org/10.15283/ijsc20121>.
- BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1867, n. 6, p. 118688, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118688>.
- BRISDELLI, F. *et al.* Proteomic analysis of quercetin-treated K562 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21010032>.
- BURANDT, E. *et al.* E-Cadherin expression in human tumors: a tissue microarray study on 10,851 tumors. **Biomarker Research**, v. 9, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/S40364-021-00299-4>.
- CARRIZZO, A. *et al.* A novel promising frontier for human health: The beneficial effects of nutraceuticals in cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Science**, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228706>.
- CHEN, J. *et al.* Lipophilized epigallocatechin gallate derivative exerts anti-proliferation efficacy through induction of cell cycle arrest and apoptosis on du145 human prostate cancer cells. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12010092>.
- CHEN, X. *et al.* Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314–323, 2016. Available at: <https://doi.org/10.7150/JCA.13332>
- CHOI, E. J.; JUNG, J. Y.; KIM, G. H. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER α expression and induction of apoptosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 454–458, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1771>.
- CHOUDHARI, A. S. *et al.* **Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice**. Frontiers Media S.A., 2020. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>

CHUNG, C. Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 2018. Available at: <https://doi.org/10.2146/ajhp170607>.

CONDELLO, M. *et al.* Anticancer activity of “Trigno M”, extract of *Prunus spinosa* drupes, against in vitro 3D and in vivo colon cancer models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109281, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109281>

CORRÒ, C.; NOVELLASDEMUNT, L.; LI, V. S. W. A brief history of organoids. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 319, n. 1, p. C151–C165, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>.

DA COSTA LOPES, L. *et al.* Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology letters**, v. 116, n. 3, p. 189–198, 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996480>.

DA ROCHA, C. Q. *et al.* Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1345–1350, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1021/np401060j>.

DE GRANDIS, R. A. *et al.* A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682968>.

DE SOUSA ANDRADE, L. M. *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>.

DEEP, G. *et al.* Angiopreventive efficacy of pure flavonolignans from milk thistle extract against prostate cancer: Targeting VEGF-VEGFR signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034630>

DEEZAGI, A.; SAFARI, N. Rosuvastatin inhibit spheroid formation and epithelial–mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer PC-3 cell line. **Molecular Biology Reports**, 47:11, v. 47, n. 11, p. 8727–8737, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05918-1>.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, 2, 303-336, 2012 Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.

EILENBERGER, C. *et al.* Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-

response determination of 3D tumor spheroids. **MethodsX**, v. 5, p. 781, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2018.07.011>.

ELANGO, R. *et al.* Hesperetin induces an apoptosis-triggered extrinsic pathway and a p53- independent pathway in human lung cancer H522 cells. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 6, p. 559–569, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1327949>.

FOGLIETTA, F. *et al.* Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. **Life Sciences**, v. 254, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117784>

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FRAZZI, R. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00521-0>.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GENG, X. *et al.* The prognostic value and potential mechanism of Matrix Metalloproteinases among Prostate Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1550, 2020. Available at: <https://doi.org/10.7150/IJMS.46780>.

GONG, X. *et al.* Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130348>.

HAN, L. *et al.* Total flavonoids suppress lung cancer growth via the COX–2–mediated Wnt/ β –catenin signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 19, n. 3, p. 1824–1830, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11271>.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, 21, 152, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.

HAO, Q. *et al.* Arctigenin inhibits prostate tumor growth in high-fat diet fed mice through dual actions on adipose tissue and tumor. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-58354-3>.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.

HUSSAIN, Y. *et al.* Quercetin and its nano-scale delivery systems in prostate cancer therapy: Paving the way for cancer elimination and reversing chemoresistance. **Cancers**, 13(7), 1602, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13071602>.

IMAMURA, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 2015.

Available at: <https://doi.org/10.3892/OR.2015.3767>.

JIANG, A. L. *et al.* Up-regulation of NKX3.1 expression and inhibition of LNCaP cell proliferation induced by an inhibitory element decoy. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 5, p. 335–340, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00047.x>.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell death and survival assays. Calderwood S., Prince T. (eds) Chaperones. **Methods in Molecular Biology**, vol 1709, 2018. v. 1709, p. 107–127. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9.

KARLSSON, R. *et al.* Establishment of prostate tumor growth and metastasis is supported by bone marrow cells and is mediated by pip5k1 α lipid kinase. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12092719>.

KASIAPPAN, R.; SAFE, S. H. ROS-Inducing Agents for Cancer Chemotherapy. **Reactive Oxygen Species**, v. 1, n. 1, p. 22–37–22–37, 2016. Available at: <https://rosj.org/index.php/ros/article/view/10>.

KASIRI, N. *et al.* Therapeutic potential of quercetin on human breast cancer in different dimensions. **Inflammopharmacology**, 28, 39–62, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00660-y>.

KAUNTZ, H. *et al.* Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived metastatic cells. **Apoptosis**, v. 16, n. 10, p. 1042–1053, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0631-z>.

KIM, U. *et al.* Phloretin Inhibits the Human Prostate Cancer Cells Through the Generation of Reactive Oxygen Species. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 2, p. 977–984, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00643-y>.

KOCH, J. *et al.* Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0244513, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244513>.

KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* Flavonoids as Anticancer Agents. **Nutrients**, v. 12, n. 2, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/NU12020457>.

LI, D.; HU, C.; LI, H. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells (Review). **Biomedical Reports**, v. 8, n. 5, p. 399–406, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3892/BR.2018.1077>.

LI, F.; ALJAHDALI, I.; LING, X. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study? **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1362-1>.

LI, Z. L. *et al.* The main anthocyanin monomer of: Lycium ruthenicum Murray induces apoptosis through the ROS/PTEN/PI3K/Akt/caspase 3 signaling pathway in prostate cancer DU-145 cells. **Food and Function**, v. 12, n. 4, p. 1818–1828, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0fo02382e>.

LOH, C. Y. *et al.* The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, 8, 1118, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8101118>.

MAJI, S. *et al.* Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 137, p. 37–75, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.11.001>.

MAKWANA, V.; RUDRAWAR, S.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Signalling transduction of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR-axis in prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166129>.

MARÍN-AGUILERA, M. *et al.* Molecular profiling of peripheral blood is associated with circulating tumor cells content and poor survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 10604, 2015. Available at: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3550>.

MARTÍNEZ-GARCÍA, D. *et al.* Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 887–909, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/MED.21547>.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Scratch wound healing assay. *In*: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. **Methods in Molecular Biology**, v. 2109, p. 225–229, 2020. Available at: https://doi.org/10.1007/7651_2019_259.

NASCIMENTO, J. R. do *et al.* Electrochemical Behavior of Unusual Dimeric Flavonoids Isolated from *Fridericia platyphylla*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 6, p. 1286–1293, 2021. Available at: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210031>.

NUNES, H. L. *et al.* Characterization of the in vitro cytotoxic effects of bradydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, p. 1–12, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>.

OJALILL, M. *et al.* Interaction between prostate cancer cells and prostate fibroblasts promotes accumulation and proteolytic processing of basement membrane proteins. **Prostate**, v. 80, n. 9, p. 715–726, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23985>.

PITTAYAPRUEK, P. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS17060868>.

QIN, J. *et al.* Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 74–79, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014921>.

RATHORE, R. *et al.* Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). **Apoptosis**, v. 22, n. 7, p. 898, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10495-017-1375-1>.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, p. 1–31, 2004. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>.

RIZEQ, B. *et al.* The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4521–4533, 2020. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.34374>.

ROCHA, V. P. C. *et al.* Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>.

RODRIGUES, V. P. *et al.* Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18112304>.

ROY, R. *et al.* Metalloproteinases and their roles in human cancer. **Anatomical Record**, v. 303, n. 6, p. 1557–1572, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.24188>.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27–36, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>

SBARDELLA, D. *et al.* Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 119–208, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.015>

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 147, p. 59–110, 2014. Available at: https://doi.org/10.1007/10_2014_273.

SERPELONI, J. M. *et al.* *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. **Human and Experimental Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 338–354, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1177/0960327119888261>.

SERPELONI, Juliana Mara *et al.* Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 345–355, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.003>.

SILVA-OLIVEIRA, R. J. *et al.* Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 3, p. 253–263, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0270-z>.

SPECIAN, A. F. L. *et al.* LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most

suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2729–2744, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9998-6>.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.

TEO, M. Y.; RATHKOPF, D. E.; KANTOFF, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 479, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-051517-011947>.

TRINDADE, G. G. G. *et al.* Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 198–209, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.003>

VEERAMUTHU, D. *et al.* Flavonoids: Anticancer Properties. **Flavonoids: Anticancer Properties, Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health**, Goncalo C. Justino, IntechOpen, 2017. Available at: <https://doi.org/10.5772/68095>.

VINCI, M. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, v. 10, p. 29, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>

VINCI, M. *et al.* Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. **Methods in Molecular Biology**, v. 986, p. 253–266, 2013. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4_16.

WANG, Y. *et al.* Hispidulin inhibits proliferation, migration, and invasion by promoting autophagy via regulation of PPAR γ activation in prostate cancer cells and xenograft models. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 85, n. 4, p. 786–797, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa108>.

YANG, F. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of circulating tumor cells in prostate cancer is promoted by survivin. **The Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1177/0300060519892395>.

YE, J. *et al.* Breviscapine suppresses the growth and metastasis of prostate cancer through regulating PAQR4-mediated PI3K/Akt pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 127, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110223>.

ZHANG, J. *et al.* Hesperetin Induces the Apoptosis of Gastric Cancer Cells via Activating Mitochondrial Pathway by Increasing Reactive Oxygen Species. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 10, p. 2985–2995, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3696-7>.

ZHANG, P. *et al.* Gene expression profiles in the PC-3 human prostate cancer cells induced by NKX3.1. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 3, p. 1505–1512, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9549-8>.

ZUBAIR, H. *et al.* Cancer chemoprevention by phytochemicals: Nature's healing touch. **Molecules**, v. 22, p. 395, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22030395>.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo em modelos 2D e 3D de próstata (DU145), demonstram que o flavonoide BrC, isolado a partir das raízes da *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann:

- Diminuiu a viabilidade celular em ambos os modelos analisados;
- alterou a área, após promover desagregação dos esferoides, porém não interferiu na proliferação celular no modelo 2D;
- não alterou o equilíbrio redox intracelular;
- reduziu a migração celular em ambos os modelos estudados;
- modulou a expressão de genes envolvidos nas vias de morte, proliferação e migração/adesão celular;
- modulou a expressão de proteínas relacionadas aos processos de morte celular.

Em resumo, nossos resultados mostram que a BrC tem atividade anticâncer nas células tumorais de próstata DU145, diminuindo a viabilidade e o potencial metastático dessas células cultivadas em monocamada e em EMTs 3D. Uma vez que o câncer é uma doença heterogênea, novas abordagens terapêuticas são necessárias para contornar a ativação de processos intracelulares que representam uma ameaça ao sucesso dos quimioterápicos. Por meio da regulação negativa do gene que codifica a proteína survivina (*BIRC5*), da regulação positiva de *Nkx3.1* e de outros genes e proteínas relacionadas ao processo de morte celular (*CASP3*, *TNF- α* , *CASP7*, *BAX*), a BrC surge como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer de próstata inibindo o crescimento tumoral.

Além do efeito citotóxico, a regulação negativa dos genes que codificam metaloproteinases (*MMP9* e *MMP11*) e *ITGAM*, a regulação positiva de *CDH1* e a diminuição da migração celular em matriz extracelular sugerem também atividade antimetastática desse flavonoide. Estudos futuros vislumbram experimentos *in vivo*, utilizando, por exemplo, tumores xenográficos, para investigar com mais detalhes os efeitos da BrC em suas diferentes concentrações e sua possível aplicação clínica.

7 BIBLIOGRAFIA

ABOTALEB, M. *et al.* Flavonoids in cancer and apoptosis. **Cancers**, v. 11, p. 28, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>.

AGGARWAL, B. B. *et al.* Models For Prevention and Treatment of Cancer: Problems vs Promises. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 9, p. 1083, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2009.05.027>.

AGHAJANI, M. *et al.* CD133 suppression increases the sensitivity of prostate cancer cells to paclitaxel. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 5, p. 3691–3703, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05411-9>.

AMAWI, H. *et al.* Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? **Chinese journal of cancer**, v. 36, n. 1, p. 50, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0217-4>.

AMELIAN, A. *et al.* Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 861-871, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.014>.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.

ANTAO, A. M.; RAMAKRISHNA, S.; KIM, K. S. The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. **International Journal of Stem Cells**, v. 14, n. 2, p. 168–179, 2021. Available at: <https://doi.org/10.15283/ijsc20121>.

BEHESHTI, F. *et al.* Anticancer Activity of Ipomoea purpurea Leaves Extracts in Monolayer and Three-Dimensional Cell Culture. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/6666567>.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1867, n. 6, p. 118688, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118688>.

BONAM, S. R. *et al.* What Has Come out from Phytomedicines and Herbal Edibles for the Treatment of Cancer? **ChemMedChem**, v. 13, n. 18, p. 1854–1872, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800343>.

BRANCATO, V. *et al.* Could 3D models of cancer enhance drug screening?. **Biomaterials**, v. 232, p. 119744, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119744>

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRISDELLI, F. *et al.* Proteomic analysis of quercetin-treated K562 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21010032>.

BURANDT, E. *et al.* E-Cadherin expression in human tumors: a tissue microarray study on 10,851 tumors. **Biomarker Research**, v. 9, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/S40364-021-00299-4>.

CARRIZZO, A. *et al.* A novel promising frontier for human health: The beneficial effects of nutraceuticals in cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21228706>.

CARRUBA, G. *et al.* Steroid-growth factor interaction in human prostate cancer. 1. Short-term effects of transforming growth factors on growth of human prostate cancer cells. **Steroids**, v. 59, n. 7, p. 412–420, 1994. Available at: [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0039-128X(94)90010-8).

CHAICHAROENAUDOMRUNG, N.; KUNHORM, P.; NOISA, P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. **World Journal of Stem Cells**, v. 11, p. 1065-1083, 2019. Available at: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>

CHEN, S. *et al.* Down-regulation of androgen-receptor and PSA by phytochemicals. **International journal of oncology**, v. 32, n. 2, p. 405, 2008. Available at: [/pubmed/articles/PMC2586941/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/171258694/).

CHEN, J. *et al.* Lipophilized epigallocatechin gallate derivative exerts anti-proliferation efficacy through induction of cell cycle arrest and apoptosis on du145 human prostate cancer cells. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12010092>.

CHEN, X. *et al.* Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314–323, 2016. Available at: <https://doi.org/10.7150/JCA.13332>

CHEN, Y. Scratch Wound Healing Assay. **Bio-protocol**, v. 2, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.100>.

CHOI, E. J.; JUNG, J. Y.; KIM, G. H. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER α expression and induction of apoptosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 454–458, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1771>.

CHOUDHARI, A. S. *et al.* Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1614, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>

CHUGHTAI, B. *et al.* Benign prostatic hyperplasia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16031, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.31>.

CHUNG, C. Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 75, p. 945-952, 2018. Available at: <https://doi.org/10.2146/ajhp170607>.

CILIÃO, H. L. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of high concentrations of the immunosuppressive drugs cyclosporine and tacrolimus in MRC-5 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 2, p. 179–187, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.11.008>.

CONDELLO, M. *et al.* Anticancer activity of “Trigno M”, extract of *Prunus spinosa* drupes, against in vitro 3D and in vivo colon cancer models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109281, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109281>

CORVI, R.; MADIA, F. In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 600–608, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.08.024>.

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. Available at: <https://doi.org/10.14440/jbm.2015.63>.

DA COSTA LOPES, L. *et al.* Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology letters**, v. 116, n. 3, p. 189–198, 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996480>.

DA ROCHA, Cláudia Q *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396–401, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.009>.

DA ROCHA, Cláudia Quintino *et al.* Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. **Journal of Natural Product**, v. 77, n. 6, p. 1345–1350, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1021/np401060j>.

DE GRANDIS, R. A. *et al.* A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682968>.

DE SOUSA ANDRADE, L. M. *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103935>.

DEEP, G. *et al.* Angiopreventive efficacy of pure flavonolignans from milk thistle extract

against prostate cancer: Targeting VEGF-VEGFR signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034630>

DEEZAGI, A.; SAFARI, N. Rosuvastatin inhibit spheroid formation and epithelial–mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer PC-3 cell line. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 8727–8737, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05918-1>.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 9-22, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc2748>.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.

EDMONDSON, R. *et al.* Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1089/ADT.2014.573>.

EFFERTH, T. *et al.* Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284–50304, 2017. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17466>.

EGUCHI, T. *et al.* Organoids with cancer stem cell-like properties secrete exosomes and HSP90 in a 3D nanoenvironment. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191109>

EILENBERGER, C. *et al.* Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. **MethodsX**, v. 5, p. 781, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2018.07.011>.

ELANGO, R. *et al.* Hesperetin induces an apoptosis-triggered extrinsic pathway and a p53- independent pathway in human lung cancer H522 cells. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 6, p. 559–569, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1327949>.

FABBRI, L. *et al.* The plasticity of mRNA translation during cancer progression and therapy resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, p. 558- 577, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00380-y>.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

FINE, S. W.; REUTER, V. E. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 142–152, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04004.x>.

FOGLIETTA, F. *et al.* Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. **Life Sciences**, v. 254, 2020.

Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117784>

FONTANA, F. *et al.* Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 143, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8020143>

FONTANA, F. *et al.* Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 460, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9020460>

FORBES, A. M. *et al.* Synthesis and anticancer activity of new flavonoid analogs and inconsistencies in assays related to proliferation and viability measurements. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 2, p. 831–842, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2452>.

FORMAN, H. J. *et al.* Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 233–235, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FRAZZI, R. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00521-0>. Acesso em: 15 jul. 2021.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009a. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>

FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - Old hat or new challenge? **International Journal of Radiation Biology**, v. 12, p. 849-871, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1080/09553000701727531>.

GENG, X. *et al.* The prognostic value and potential mechanism of Matrix Metalloproteinases among Prostate Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1550, 2020. Available at: <https://doi.org/10.7150/IJMS.46780>.

GEYBELS, M. S. *et al.* Dietary flavonoid intake, black tea consumption, and risk of overall and advanced stage prostate cancer. **American journal of epidemiology**, v. 177, n. 12, p. 1388–1398, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/kws419>.

GONG, X. *et al.* Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015. Available at:

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130348>.

HAN, L. *et al.* Total flavonoids suppress lung cancer growth via the COX–2–mediated Wnt/ β –catenin signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 19, n. 3, p. 1824–1830, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11271>.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.

HAO, Q. *et al.* Arctigenin inhibits prostate tumor growth in high-fat diet fed mice through dual actions on adipose tissue and tumor. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-020-58354-3>.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.

HATOK, J. *et al.* In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0011-3>.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X).

HUSSAIN, Y. *et al.* Quercetin and its nano-scale delivery systems in prostate cancer therapy: Paving the way for cancer elimination and reversing chemoresistance. **Cancers**, v. 13, p. 1602, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13071602>.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates—where are we going wrong? **Nature Reviews Clinical Oncology** 2011 8:4 , v. 8, n. 4, p. 189–190, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.34>.

IMAMURA, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3892/OR.2015.3767>.

ISHIGURO, T. *et al.* Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. **Cancer Science**, v. 108, p. 283-289, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1111/cas.13155>

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>

JIANG, A. L. *et al.* Up-regulation of NKX3.1 expression and inhibition of LNCaP cell proliferation induced by an inhibitory element decoy. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 5, p. 335–340, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00047.x>.

JING, Y. *et al.* Autophagy-mediating microRNAs in cancer chemoresistance. **Cell**

Biology and Toxicology, v. 36, p. 517-536, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09553-1>.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell death and survival assays. **Calderwood S., Prince T. (eds) Chaperones. Methods in Molecular Biology**, v. 1709, p. 107–127, 2018. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_9.

KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.

KANADASWAMI, C. *et al.* The antitumor activities of flavonoids. **In vivo**, v. 19, p. 895-909, 2005. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16097445>.

et al. Establishment of prostate tumor growth and metastasis is supported by bone marrow cells and is mediated by pip5k1 α lipid kinase. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12092719>.

KASIAPPAN, R.; SAFE, S. H. ROS-Inducing Agents for Cancer Chemotherapy. **Reactive Oxygen Species**, v. 1, n. 1, p. 22–37–22–37, 2016. Available at: <https://rosj.org/index.php/ros/article/view/10>.

KASIRI, N. *et al.* Therapeutic potential of quercetin on human breast cancer in different dimensions. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 39-62, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00660-y>.

KAUNTZ, H. *et al.* Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived metastatic cells. **Apoptosis**, v. 16, n. 10, p. 1042–1053, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0631-z>.

KIM, U. *et al.* Phloretin Inhibits the Human Prostate Cancer Cells Through the Generation of Reactive Oxygen Species. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 2, p. 977–984, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00643-y>.

KOCH, J. *et al.* Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0244513, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244513>.

KOOTI, W. *et al.* Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 4, p. 982–995, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1177/2156587217696927>.

KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, v. 12, p. 457, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu12020457>

KOTECHA, R.; TAKAMI, A.; ESPINOZA, J. L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. **Oncotarget**, v. 7, p. 52517-52529, 2016. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9593>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An

overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.

LAHLOU, M. Screening of natural products for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, p. 697-705, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1517/17460441.2.5.697>.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, p. 670-691, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 178-196, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

LAZZARI, G. *et al.* Light sheet fluorescence microscopy versus confocal microscopy: in quest of a suitable tool to assess drug and nanomedicine penetration into multicellular tumor spheroids. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 195–203, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.019>.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>.

LEE, M. M. *et al.* Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 12, n. 7, p. 665–668, 2003. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869409>.

LEEK, R. *et al.* Methods: Using three-dimensional culture (spheroids) as an in vitro model of tumour hypoxia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 899, p. 167–196, 2016. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4_10.

LI, D.; HU, C.; LI, H. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. **Biomedical Reports**, v. 8, n. 5, p. 399–406, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3892/BR.2018.1077>.

LI, F.; ALJAHDALI, I.; LING, X. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study? **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1362-1>.

LI, L. *et al.* EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis. **Oncogene**, v. 38, n. 35, p. 6241–6255, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0873-8>

LI, Z. L. *et al.* The main anthocyanin monomer of *Lycium ruthenicum* Murray induces apoptosis through the ROS/PTEN/PI3K/Akt/caspase 3 signaling pathway in prostate cancer DU-145 cells. **Food and Function**, v. 12, n. 4, p. 1818–1828, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1039/d0fo02382e>.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.

LIANG, Y.; MCDONNELL, S.; CLYNES, M. Examining the Relationship between Cancer Invasion / Metastasis and Drug Resistance. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 3, p. 257–277, 2005. Available at: <https://doi.org/10.2174/1568009023333872>

LINDER, A. *et al.* Analysis of regulator of G-protein signalling 2 (RGS2) expression and function during prostate cancer progression. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35332-4>

LIU, Q. *et al.* Factors involved in cancer metastasis: A better understanding to “seed and soil” hypothesis. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0742-4>

LIU, R. H. Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 384S-392S, 2013. Available at: <https://doi.org/10.3945/an.112.003517>

LOH, C. Y. *et al.* The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, v. 8, p.1118, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8101118>.

LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 304–318, 2006. Available at: <https://doi.org/10.3732/ajb.93.2.304>.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. **Biology**, v. 3, p. 345-367, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology3020345>

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, p. 395–406, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>

LV, S. *et al.* Histone methyltransferase KMT2D sustains prostate carcinogenesis and metastasis via epigenetically activating LIFR and KLF4. **Oncogene**, v. 37, n. 10, p. 1354–1368, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0026-x>

MAJI, S. *et al.* Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. **Advances in Cancer Research**, 2018. v. 137, p. 37–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.11.001>.

MAKWANA, V.; RUDRAWAR, S.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Signalling transduction of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR-axis in prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v.1867, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166129>.

MARÍN-AGUILERA, M. *et al.* Molecular profiling of peripheral blood is associated with circulating tumor cells content and poor survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 10604, 2015. Available at:

<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3550>.

MARTÍNEZ-GARCÍA, D. *et al.* Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 887–909, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/MED.21547>.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Scratch wound healing assay. *In: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. Methods in Molecular Biology*, v. 2109, p. 225–229, 2020. Available at: https://doi.org/10.1007/7651_2019_259.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, p. 571–582, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0881-9>.

MCCAULEY, J.; ZIVANOVIC, A.; SKROPETA, D. Bioassays for anticancer activities. **Methods in Molecular Biology**, v. 1055, p. 191–205, 2013. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14.

MELLADO, M. *et al.* In vitro antioxidant and antiproliferative effect of the extracts of *Ephedra chilensis* K Presl aerial parts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12906-019-2462-3>.

MENG, F.; WU, G. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 455–467, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9379-3>.

MIRAHMADI, M. *et al.* Potential inhibitory effect of lycopene on prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110459>.

MURALI, V. S. *et al.* An image-based assay to quantify changes in proliferation and viability upon drug treatment in 3D microenvironments. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 502, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5694-1>.

NAMEKAWA, T. *et al.* Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 74, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8010074>

NASCIMENTO, J. R. do *et al.* Electrochemical Behavior of Unusual Dimeric Flavonoids Isolated from *Fridericia platyphylla*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 6, p. 1286–1293, 2021. Available at: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210031>.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p. 94–108, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NGUYEN-NIELSEN, M.; BORRE, M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for

Prostate Cancer. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 46, p. 484-490, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2016.07.002>.

NISTICÒ, P.; BISSELL, M. J.; RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011908>

NUNES, H. L. *et al.* Characterization of the in vitro cytotoxic effects of bradydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, p. 1–12, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1784339>.

ODERO-MARAH, V. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1095, p. 101–110, 2018. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_6.

OJALILL, M. *et al.* Interaction between prostate cancer cells and prostate fibroblasts promotes accumulation and proteolytic processing of basement membrane proteins. **Prostate**, v. 80, n. 9, p. 715–726, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23985>.

OPARKA, M. *et al.* Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. **Methods**, v. 109, p. 3–11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.008>.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

PATIL, N.; GAITONDE, K. Clinical Perspective of Prostate Cancer. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 25, n. 3, p. 103–108, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1097/RMR.000000000000091>.

PATTIES, I. *et al.* Enhanced inhibition of clonogenic survival of human medulloblastoma cells by multimodal treatment with ionizing irradiation, epigenetic modifiers, and differentiation-inducing drugs. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 94, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0376-1>.

PIETRZKOWSKI, Z. *et al.* Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. **Cancer research**, v. 53, n. 5, p. 1102–1106, 1993. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8439954>.

PITTAYAPRUEK, P. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS17060868>.

PRÄBST, K. *et al.* Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. **Methods in Molecular Biology**, v. 1601, p. 1–17, 2017. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1.

PSYCHARAKIS, S. E. *et al.* High resolution volumetric imaging of primary and secondary tumor spheroids using multi-angle Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**, p. 866–869, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2018.8512388>.

QIN, J. *et al.* Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 74–79, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014921>.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012. Available at: <https://doi.org/10.3390/s120912347>.

RATHORE, R. *et al.* Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). **Apoptosis**, v. 22, n. 7, p. 898, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10495-017-1375-1>.

RAVI, M. *et al.* 3D cell culture systems: Advantages and applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **Review World J Oncol**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019. Available at: <https://doi.org/10.14740/wjon1191>.

REALE, G. *et al.* Association between dietary flavonoids intake and prostate cancer risk: A case-control study in Sicily. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 39, p. 14–18, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.05.002>.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, p. 1–31, 2004. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>.

RIZEQ, B. *et al.* The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4521–4533, 2020. Available at: <https://doi.org/10.7150/jca.34374>.

ROCHA, V. P. C. *et al.* Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 1, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>.

RODRIGUES, V. P. *et al.* Involvement of Opioid System, TRPM8, and ASIC Receptors in Antinociceptive Effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18112304>.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, C. *et al.* **Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies**. *Antioxidants*, v. 8, p. 137, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox8050137>

ROMMERSWINKEL, N. *et al.* Analysis of cell migration within a three-dimensional collagen matrix. **Journal of Visualized Experiments**, n. 92, 2014. Available at:

<https://doi.org/10.3791/51963>

ROY, R. *et al.* Metalloproteinases and their roles in human cancer. **Anatomical Record**, v. 303, n. 6, p. 1557–1572, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.24188>.

RYCAJ, K. *et al.* Cellular determinants and microenvironmental regulation of prostate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 44, p. 83-97, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.009>

SALEHI *et al.* Phytochemicals in Prostate Cancer: From Bioactive Molecules to Upcoming Therapeutic Agents. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1483, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11071483>.

SALLES, A. E. *Fridericia platyphylla*, **Flickr**, 2007. Available at: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/23247870854>.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27-36, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>

SBARDELLA, D. *et al.* Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 119-208, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.015>

SCHATTEN, H. Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1095, p. 1–14, 2018. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

SEISEN, T. *et al.* The prostate gland: a crossroad between the urinary and the seminal tracts. **Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie**, v. 22 Suppl 1, p. S2-6, 2012. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1166-7087\(12\)70028-3](https://doi.org/10.1016/S1166-7087(12)70028-3).

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 147, p. 59–110, 2014. Available at: https://doi.org/10.1007/10_2014_273. Acesso em: 1 set. 2019.

SERPELONI, J. M. *et al.* *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. **Human and Experimental Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 338–354, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1177/0960327119888261>.

SERPELONI, Juliana Mara *et al.* Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 345–355, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.003>. Acesso em: 28 mar. 2019.

SHAH, N. *et al.* Drug resistance occurred in a newly characterized preclinical model of lung cancer brain metastasis. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06808-2>.

SILVA-OLIVEIRA, R. J. *et al.* Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 3, p. 253–263, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0270-z>.

SPECIAN, A. F. L. *et al.* LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2729–2744, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9998-6>.

STONE, K. R. *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). **International journal of cancer**, v. 21, n. 3, p. 274–281, 1978. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/631930>

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.

SUTHERLAND, R. M. *et al.* A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 18, p. 491-495, 1970. Available at: <https://doi.org/10.1080/09553007014551401>

TEO, M. Y.; RATHKOPF, D. E.; KANTOFF, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. **Annual review of medicine**, v. 70, p. 479, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-051517-011947>.

TEVIS, K. M.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment. **Advanced Biosystems**, [s. l.], v. 1, n. 10, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1002/adbi.201700083>

TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development (Cambridge, England)**, v. 144, n. 8, p. 1382–1398, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.148270>.

TRINDADE, G. G. G. *et al.* Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 198–209, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.003>

VEERAMUTHU, D. *et al.* Flavonoids: Anticancer Properties, Flavonoids - **From Biosynthesis to Human Health**, Goncalo C. Justino, IntechOpen, 2017. Available at: <https://doi.org/10.5772/68095>.

VINCI, M. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, v. 10, p. 29, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>

VINCI, M. *et al.* Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. **Methods in Molecular Biology**, v. 986, p. 253–266, 2013. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4_16.

WALZL, A. *et al.* The resazurin reduction assay can distinguish cytotoxic from cytostatic compounds in spheroid screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, n. 7, p. 1047–1059, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1177/1087057114532352>.

WANG, G. *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 35, p. 21-22, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>

WANG, J. *et al.* Evaluation of the anticancer and anti-metastasis effects of novel synthetic sodium channel blockers in prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Prostate**, v. 79, n. 1, p. 62–72, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/pros.23711>.

WANG, Y. *et al.* Hispidulin inhibits proliferation, migration, and invasion by promoting autophagy via regulation of PPAR γ activation in prostate cancer cells and xenograft models. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 85, n. 4, p. 786–797, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa108>.

WARD, A. B. *et al.* Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. **World journal of surgical oncology**, v. 16, n. 1, p. 108, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1400-z>.

WARE, M. J. *et al.* Generation of homogenous three-dimensional pancreatic cancer cell spheroids using an improved hanging drop technique. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 22, n. 4, p. 312–321, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0280>

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia**, v. 17, p. 1-15, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>

WONG, N. *et al.* Upregulation of FAM84B during prostate cancer progression. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19218–19235, 2017. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15168>

WOODRUM, D. A. *et al.* Prostate cancer: state of the art imaging and focal treatment. **Clinical Radiology**, v. 72, n. 8, p. 665–679, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crad.2017.02.010>.

WU, S.-Y. *et al.* A Wound-Healing Assay Based on Ultraviolet Light Ablation. **SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation**, v. 22, n. 1, p. 36–43, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1177/2211068216646741>.

XIE, C.; LIN, P.-J.; HAO, J. Eggmanone Effectively Overcomes Prostate Cancer Cell Chemoresistance. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9050538>.

YANG, F. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition of circulating tumor cells in prostate

cancer is promoted by survivin. **The Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1177/0300060519892395>.

YE, J. *et al.* Breviscapine suppresses the growth and metastasis of prostate cancer through regulating PAQR4-mediated PI3K/Akt pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 127, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110223>.

ZANONI, M. *et al.* Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, p. 289-301, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1570129>

ZARMOUH, N. O. *et al.* The antiproliferative effects of flavonoid MAO inhibitors on prostate cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25092257>

ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - Tricks of the trade. **Bosnian Journal of Basic Molecular Science**, v. 17, p. 172-178, 2017. Available at: <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.1908>

ZHANG, J. *et al.* Hesperetin Induces the Apoptosis of Gastric Cancer Cells via Activating Mitochondrial Pathway by Increasing Reactive Oxygen Species. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 10, p. 2985–2995, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3696-7>

ZHANG, P. *et al.* Gene expression profiles in the PC-3 human prostate cancer cells induced by NKX3.1. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 1505–1512, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9549-8>. Acesso em: 6 set. 2021.

ZHENG, T. *et al.* Molecular mechanisms of breast cancer metastasis by gene expression profile analysis. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4671–4677, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7157>

ZUBAIR, H. *et al.* Cancer chemoprevention by phytochemicals: Nature's healing touch. **Molecules**, v. 22, p. 395, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22030395>