



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HIGOR LOPES NUNES

**BRAQUIDINAS ISOLADAS DE *FRIDERICIA PLATYPHYLLA*
(CHAM.) L.G.LOHMANN:
ANÁLISE TOXICOGENÔMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DE
PRÓSTATA**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HIGOR LOPES NUNES

**BRAQUIDINAS ISOLADAS DE *FRIDERICIA PLATYPHYLLA*
(CHAM.) L.G.LOHMANN:
ANÁLISE TOXICOGENÔMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DE
PRÓSTATA**

HIGOR LOPES NUNES

**BRAQUIDINAS ISOLADAS DE *FRIDERICIA PLATYPHYLLA*
(CHAM.) L.G.LOHMANN:
ANÁLISE TOXICOGENÔMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DE
PRÓSTATA**

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.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ilce Mara de Syllos
Cólus

Londrina
2019

HIGOR LOPES NUNES

BRAQUIDINAS ISOLADAS DE *FRIDERICIA PLATYPHYLLA* (CHAM.)

L.G.LOHMANN:

**ANÁLISE TOXICOGENÔMICA EM CÉLULAS TUMORAIS DE
PRÓSTATA**

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.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilce Mara de Syllos
Cólus
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Carmen Lucia Bassi Branco
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

Prof^a. Dr^a. Juliana Mara Serpeloni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Laura Lopes (mãe) e Wilson Nunes (pai). Obrigado por terem compreendido quando não pude visitá-los ou quando não pude estar presente o quanto gostaria. Eu amo muito vocês.

À minha orientadora Ilce Mara de Syllos Cólus que dedicou muito do seu tempo nesses cinco anos e meio de laboratório. Muito obrigado pelos ensinamentos, cobranças, atenção e amizade durante esse longo período, foi essencial para a construção do Higor que finaliza essa dissertação.

À minha amiga Juliana Mara Serpeloni que me ajudou desde o início e me coorientou na graduação, obrigado pela dedicação do seu tempo quando necessitei. Agradeço também ao Gustavo Strassacapa e a você pela amizade conquistada.

A todos os meus companheiros de laboratório, pela amizade e assistências: Beatriz Mattos, Monyse Nóbrega, Diego Luis Ribeiro, Mariana Stinglin e Maiara Piva.

A todos meus ex-companheiros de laboratório que me ensinaram muito e contribuíram na minha formação, assim como a amizade conquistada: Katiuska Rodrigues, Lucas Benício, Ana Flávia Specian, Heloísa Cilião e Marilesia Souza.

A todos os ICs do laboratório que ensinei, acompanhei e ainda estarei contribuindo de alguma forma em suas formações: Larissa Oliveira, Hector Furini, Gabriela Weiss e Amanda Francelino.

Ao Prof. Dr. Fernando Macedo (UEL) por ensinar e auxiliar na técnica de RMN.

À Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha (UFMA) por ter disponibilizado as moléculas utilizadas nesse estudo.

Ao Dr. Rui Reis (Hospital do Amor -Barretos), por ter disponibilizado acesso ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) e aos materiais para realização de experimentos.

Ao André Lengert e Viviane Aline, do Hospital do Amor, que me auxiliaram durante os experimentos realizados no CPOM.

Aos meus familiares que me ajudaram direta ou indiretamente nesta minha etapa.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

À Coordenadora do programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, que sempre esteve disposta a ajudar os alunos e a resolver problemas.

Enfim, à Universidade Estadual de Londrina e a todos os professores da pós-graduação que me proporcionaram conhecimento e me ajudaram no processo de formação profissional.

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

Lopes Nunes, Higor.

Braquidinas isoladas de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann – Análise toxicogenômica em células tumorais de próstata / Higor Lopes Nunes. - Londrina, 2019. 63 f. : il.

Orientador: 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, 2019.

Inclui bibliografia.

1. fitoquímicos - Tese. 2. citotoxicidade - Tese. 3. western blot - Tese. 4. genotoxicidade - Tese. I. Mara de Syllos Cólus, Ilce. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

Apoio financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo No. 401516/2016-4.

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) – Processo No. 00849/18.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Science and everyday life cannot and should not be separated.”
Rosalind Franklin*

NUNES, Higor Lopes. **Braquidinas isoladas de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann**: análise toxicogenômica em células tumorais de próstata. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), 2019.

RESUMO

O aumento de casos de câncer tem reforçado a importância de se estudar possíveis produtos, como os de origem vegetal, que combatam o desenvolvimento progressivo dos mesmos. O estudo em questão avaliou os compostos braquidinas A, B e C, extraídos das raízes da espécie vegetal *F. platyphylla*, quanto aos seus possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos, oxidativos e influência na motilidade e capacidade de invasão de células tumorais humanas, assim como possíveis alterações no metabolismo e expressão de proteínas. Foram utilizadas culturas de células *in vitro* das linhagens tumorais de próstata humana, PC-3 e DU145. Nove concentrações (0,24 a 30,72 μ M) foram avaliadas nos ensaios de viabilidade celular (MTT, vermelho neutro e LDH) sendo as braquidinas predominantemente citotóxicas a partir da concentração de 3,84 μ M em ambas as linhagens. Os valores de IC₅₀ para as braquidinas A, B e C foram, respectivamente, 23,41; 4,28 e 4,44 μ M (PC-3) e 6,75; 6,69 e 7,06 μ M (DU145). As concentrações utilizadas nos demais ensaios empregados no presente estudo foram escolhidas baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e nas IC₅₀ calculadas. As braquidinas A e B foram capazes de induzir necrose na concentração de 6,00 μ M e a braquidina C induziu apoptose nas concentrações de 0,96, 1,5 e 6,00 μ M. Esses fitoquímicos não induziram aumento de espécies reativas intracelulares em nenhuma das condições avaliadas (concentração e tempo) utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA; também não foram genotóxicas pelo ensaio do cometa. O perfil metabólico, avaliado por ¹H-RMN, foi alterado, notando-se um aumento de colina, lactato e alanina para as células tratadas com braquidina C na concentração de 3,84 μ M. Foi observado uma diminuição dos mesmos metabólitos, incluindo acetato, para as células tratadas com 3,84 μ M de braquidina A. A expressão de proteínas também foi modificada, observando-se um aumento na expressão de p21 na concentração de 3,84 μ M nas células tratadas com braquidinas B e C, indicando atraso no ciclo celular. As concentrações de 6,00 μ M (braquidina A) e 3,84 μ M (braquidina B) diminuíram a expressão da proteína Phospho-AKT o que pode também atrasar o ciclo e a proliferação celular. Em todas as concentrações foi notado um aumento de PARP clivada, proteína relacionada com a indução de processos apoptóticos. As braquidinas diminuíram significativamente os processos migratórios e invasivos das células DU145 a partir da concentração de 6,00 μ M. Com esse estudo foi possível definir as concentrações citotóxicas das braquidinas, assim como algumas atividades que exercem nas linhagens celulares tumorais de próstata humana, PC-3 e DU145, como por exemplo, diminuição da proliferação celular, indução de morte e redução de processos migratórios.

Palavras-chave: Fitoquímicos. Citotoxicidade. PC-3. DU145. *Western blot*. Genotoxicidade.

NUNES, Higor Lopes. **Brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann**: toxicogenomic analysis using prostate tumor cells. 63 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation - Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, Londrina (PR), 2019.

ABSTRACT

The increase in cancer cases has reinforced the importance of studying possible products, such as those of vegetal origin, that combat the progressive development of these. The present study evaluated the compounds brachydin A, B and C, extracted from *Fridericia platyphylla* roots, for their possible cytotoxic, genotoxic, oxidative effects and their influence on the motility and invasiveness of human tumor cells, as well as their possible changes in protein metabolism and expression. *In vitro* cell cultures of the human prostate tumor cell lines, PC-3 and DU145 were used. Nine concentrations (0.24 to 30.72 μ M) were evaluated in viability assays (MTT, neutral red and LDH) being the brachydins predominantly cytotoxic from the concentration 3,84 μ M in both cell lines. The IC₅₀ values for brachydins A, B e C were, respectively, 23.41; 4.28 and 4.44 μ M (PC-3) and 6.75; 6.69 and 7.06 μ M (DU145). The concentrations used in subsequent assays were chosen based on the results obtained in the cytotoxicity assays and on calculated IC₅₀ values. Brachydins A and B were capable to induce necrosis at the concentration of 6.00 μ M and brachydin C induced apoptosis at concentrations of 0.96, 1.5 and 6.00 μ M. These phytochemicals did not induce increase of intracellular reactive species in none of the evaluated conditions (concentration and time) using the CM-H₂DCFDA probe; they also were not genotoxic by comet assay. The metabolic profile, evaluated by ¹H-NMR, was modified, noticing an increase in choline, lactate and alanine for the cells treated with brachydin C at concentration of 3.84 μ M. It was observed decrease in the same metabolites, including acetate, for cells treated with brachydin A at 3.84 μ M. The proteins expression was also changed, with an increase of p21 expression in cells treated with brachydin B and C at the concentration of 3.84 μ M, indicating delay in the cell cycle. The concentrations of 6.00 μ M (brachydin A) and 3.84 μ M (brachydin B) decreased the Phospho-AKT expression, which may influence cellular cycle and proliferation. At all concentrations were noticed an increase in cleaved PARP, a protein related to the induction of apoptotic processes. The brachydins at 6.00 μ M has significantly decreased cell motility and invasiveness in DU145 cells. With this study it was possible to define the cytotoxic concentrations of brachydins, as well as some activities that exert on both human tumor cell lines, PC-3 and DU145, such as reduction of cell proliferation, induction of cell death and reduction of migratory processes.

Keywords: Phytochemicals. Cytotoxicity. PC-3. DU145. Western blot. Genotoxicity.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema simplificado da biossíntese de metabólitos secundários derivados da glicose.	22
Figura 2 -	Cervejinha-do-campo (<i>Fridericia platyphylla</i>).	25
Figura 3 -	Estrutura química das braquidinas.	27
Figura 4 -	Células HeLa após 1,5h de tratamento com MTT. Setas indicam formazam acumulado em gotículas lipídicas.	29
Figura 5 -	Esquema do funcionamento do kit utilizado para o ensaio LDH.	31
Figura 6 -	Representação de uma célula com danos no DNA no ensaio cometa	37
Figura 7 -	Princípio da migração transwell.	41
Figura 8 -	Ensaio de invasão transwell com a membrana matrigel	41
Figura 9 -	Padrões considerados para a análise das células PC-3 no ensaio de apoptose/necrose com tripla coloração com Hoechst 33342 (Ho), Diacetato de Fluoresceína (DAF) e Iodeto de Propídio (IP).	46
Figura 10 -	Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do MTT nas células tumorais de próstata (PC-3) após tratamentos por 24 horas com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.	53
Figura 11 -	Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do vermelho neutro nas células tumorais de próstata (PC-3) após tratamentos por 24 horas com diferentes coentrações das braquidinas A, B ou C.	53
Figura 12 -	Ensaio do LDH após tratamentos das células tumorais de próstata (PC-3) com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.	53
Figura 13 -	Ensaio de quantificação de ERs oxidativo utilizando-se a sonda CM-H ₂ DCFDA	56
Figura 14 -	Resultados obtidos no ensaio do cometa para a linhagem PC-3 submetida a três diferentes concentrações de braquidinas e seus respectivos controles.	57
Figura 15 -	Representação do perfil metabólico das células PC-3 tratadas com braquidinas e os respectivos controles (negativo e solvente).	58

Figura 16 - Sobreposição dos espectros obtidos após tratamento da linhagem PC-3 com as braquidinas A, B ou C e com seus grupos controle negativo e do solvente.....	58
Figura 17 - Quantificação por densitometria das proteínas p21, p27, Phospho-Akt (pAKT) e PARPc na linhagem celular PC-3.....	59
Figura 18 - Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do MTT nas células tumorais de próstata (DU145) após tratamentos por 24 horas com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.	60
Figura 19 - Fotomicrografia (30X) dos insertos após migração/invasão da linhagem DU145 e seus respectivos tratamentos corados com cristal violeta.	61
Figura 20 - Migração e invasão, mensurada por absorbância, da linhagem DU145 após tratamento com as braquidinas.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação Dos Resultados Estatísticos Obtidos Após Diferentes Ensaio De Citotoxicidade Em Células Pc-3 Após Tratamento Com Diferentes Concentrações Das Braquidinas.....	54
Tabela 2 -	Frequência De Células Tumorais De Próstata (Pc-3) Viáveis, Apoptóticas E Necróticas Após Tratamento Com Três Diferentes Concentrações De Braquidina A, B Ou C, E Seus Respectivos Controles.	55
Tabela 3 -	Resumo Do Estudo Feito No Banco De Dados Público Pubchem Comparando Com As Braquidinas.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância (ANOVA)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASIC	Do inglês <i>Acid-Sensing Ion Channel</i>
ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	Do inglês <i>BCL2 Associated X, Apoptosis regulator</i>
BCL-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BrA	Braquidina A
BrB	Braquidina B
BrC	Braquidina C
CID	Do inglês <i>PubChem Compound Identification Number</i>
DAF	Diacetato de Fluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Do inglês <i>Dithiothreitol</i>
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPX4	Glutaciona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
Ho	Hoescht 33342
HPLC	Do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio
IP	Iodeto de propídio
LAMON	Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
LDH	Lactato desidrogenase
MCR	Morte Celular Regulada
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NAD+	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-kB	Do inglês <i>Factor Nuclear kappa B</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p21	Proteína 21
p27	Proteína 27
pAKT (Phospho-Akt)	Proteína Quinase B
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
TBS	Do inglês <i>Tris Buffered Saline</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Fitoterápicos, Fitoquímicos e Fitofármacos	20
2.2	<i>Fridericia platyphylla</i> (Cham.) L.G.Lohmann	24
2.2.1	Braquidinas.....	26
2.3	Viabilidade e morte celular	27
2.3.1	MTT	28
2.3.2	Vermelho neutro	30
2.3.3	LDH	30
2.3.4	Apoptose/Necrose	31
2.4	Quantificação de espécies reativas intracelulares	33
2.5	Genotoxicidade	35
2.5.1	Ensaio do Cometa	36
2.6	Metabolômica	37
2.7	<i>Western Blotting</i>	38
2.8	Migração e Invasão Celular	39
2.8.1	Migração <i>Transwell</i>	40
2.8.2	Invasão <i>Transwell</i>	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Linhagens Celulares e Condições de Cultivo	43
4.2	Braquidinas	43
4.3	Ensaio de viabilidade/citotoxicidade	44
4.3.1	MTT	44
4.3.2	Vermelho Neutro.....	44
4.3.3	LDH	45
4.3.5	Análise de morte celular com tripla coloração	45

4.4	Quantificação de espécies reativas intracelulares com sonda CM-H₂DCFDA	46
4.5	Ensaio do Cometa	47
4.6	Metabolômica	48
4.7	Western Blot	48
4.7.1	Proteínas avaliadas	49
4.8	Migração e Invasão Celular	50
4.8.1	Migração Transwell.....	50
4.8.2	Invasão Transwell.....	51
4.9	Análises Estatísticas	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Linhagem PC-3	52
5.1.1	Viabilidade Celular.....	52
5.1.1.1	MTT	52
5.1.1.2	Vermelho neutro	52
5.1.1.3	LDH	53
5.1.1.4	Comparação entre braquidinas	54
5.1.1.5	Indução de apoptose/necrose	54
5.1.2	Quantificação de espécies reativas intracelulares	55
5.1.3	Genotoxicidade.....	57
5.1.4	Metabolômica	57
5.1.5	Expressão de proteínas.....	59
5.2	Linhagem DU145	60
5.2.1	Viabilidade Celular.....	60
5.2.1.1	MTT	60
5.2.2	Migração e Invasão	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais têm sido historicamente uma valiosa fonte de drogas para a medicina e até os dias atuais ainda são importantes para o descobrimento e desenvolvimento de novas drogas. Diversos produtos naturais provindos de plantas estão sendo estudados quanto a modulação de diferentes alvos moleculares e tratamento de doenças (ATANASOV et al., 2015), entre elas o câncer.

O câncer é uma das doenças que mais causa morbidade e mortalidade no mundo, e tem sido controlado com diversas terapias, como cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e quimioterapia citotóxica. Nesta última categoria encontram-se os quimioterápicos citotóxicos, que podem ser sintéticos, como por exemplo agentes alquilantes, ou naturais, como as moléculas derivadas de plantas.

Os fitoterápicos e fitofármacos, medicamentos obtidos utilizando-se exclusivamente matéria prima proveniente de partes de um vegetal ou o próprio vegetal, têm sido uma alternativa para o tratamento de doenças crônicas, levando-se em conta o alto custo dos medicamentos sintéticos, principalmente quando os pacientes necessitam de um tratamento por um longo período (FUKUMASU et al., 2008).

Plantas medicinais já são tradicionalmente utilizadas no Brasil e tornam-se fitoterápicos ou fitofármacos quando são autorizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem industrializadas e comercializadas. Para isso, a ANVISA exige que sua eficácia e segurança sejam validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (ANVISA, 2016), que permitam sua caracterização e utilização de maneira eficaz.

Os produtos do metabolismo secundário das plantas são foco de muitas pesquisas que têm como objetivo extraí-los, isolá-los, definir suas estruturas e avaliá-los *in vitro* e *in vivo* quanto a possíveis atividades biológicas, em especial, farmacológica (ATANASOV et al., 2015; LIU, 2004).

Testes *in vitro* baseados em células possuem de média a alta performance e demonstram a eficácia de um fitoquímico em nível celular, levando à identificação de alvos moleculares e possíveis mecanismos de ação. Os ensaios escolhidos devem ser simples, com alta sensibilidade e reprodutibilidade (ATANASOV et al., 2015).

No presente estudo foram avaliados três compostos fenólicos obtidos do extrato das raízes da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann, denominados braquidina A, B e C. *Fridericia platyphylla* antes era identificada como *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau. Portanto, ao longo dessa fundamentação teórica, muitas vezes a espécie citada será *A. brachypoda*, pois foram utilizados artigos publicados com a taxonomia antiga.

F. platyphylla é nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como “cervejinha-do-campo”, “cipó-una” e/ou “tintureiro”. Já se tem conhecimento do uso tradicional de chás preparados a partir de raízes desta planta para o tratamento de pedra nos rins e artrite (RODRIGUES; CARLINI, 2005). Extratos da raiz de *F. platyphylla* também já demonstraram significativa atividade anti-inflamatória (DA ROCHA et al., 2011) e sua porção diclorometano aliviou dor aguda em testes *in vivo* com ratos (RODRIGUES et al., 2017). Seus princípios ativos isolados, entre eles os compostos avaliados no presente estudo, demonstraram atividade anti-*Trypanossoma cruzi* em ensaios *in vitro* e *in vivo* (DA ROCHA et al., 2014).

Para contribuir com a caracterização farmacológica das braquidinas, foram avaliados neste trabalho os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e oxidantes das três braquidinas em linhagens celulares tumorais de próstata humana (PC-3 e DU145), assim como seus efeitos sobre o perfil metabólico e sua influência na motilidade e capacidade invasora das células.

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios fazem parte do acervo de células do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Nas últimas décadas este laboratório tem investigado cânceres urogenitais, analisando marcadores moleculares (como polimorfismos de nucleotídeos únicos) em estudos caso-controle com pacientes portadores de câncer de próstata, pênis e bexiga e também procurado por novas drogas com características citotóxicas que possam combater estas neoplasias.

Portanto, com este trabalho pretendemos contribuir para o conhecimento de algumas das atividades biológicas das braquidinas, para que tais compostos possam ser investigados futuramente como medicamento fitofármaco para o tratamento de doenças, especialmente o câncer de próstata.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fitoterápicos, Fitoquímicos e Fitofármacos

Por mais de um milênio plantas medicinais têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos e são, até os dias atuais, a origem de diversos medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2012). As buscas por seus compostos ativos tiveram início no começo do século 19, desencadeando nas décadas seguintes uma série de estudos buscando por princípios ativos de muitas plantas medicinais (ATANASOV et al., 2015).

Plantas frequentemente utilizadas na medicina tradicional são assumidas como seguras devido à sua utilização a longo prazo. Todavia, chás e extratos vegetais podem produzir efeitos adversos como qualquer droga, podendo apresentar risco em potencial para o consumo (SHAHEEN; AHMAD; HAROON, 2017), como foi demonstrado em estudo de, 6 plantas medicinais (*Lophira alata*, *Eranthia chlorantha*, *Phragmanthera capitata*, *Kalanchoe crenata*, *Elephantopus mollis* e *Millettia macrophylla*) onde foram investigados seus efeitos citotóxicos e antiproliferativos em linhagens tumorais humanas (SPC212 – mesotélio, A549 – pulmão, HepG2 – fígado, DLD-1 – coloretal e MCF-7 – mama) e em uma linhagem normal de fibroblastos humanos (KUETE et al., 2017).

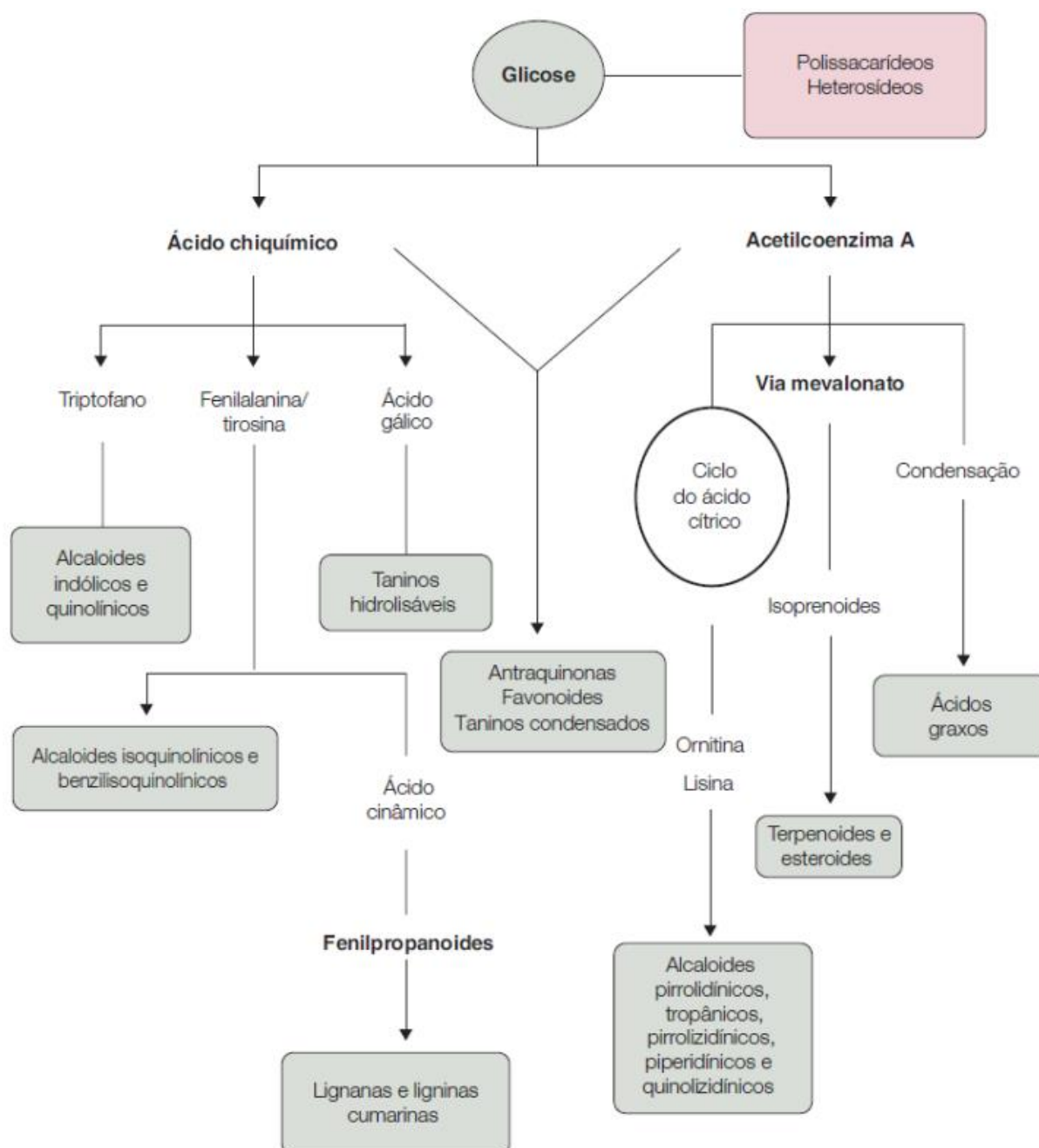
As plantas desenvolveram um sistema biossintético que gera uma mistura complexa de moléculas bioativas, provenientes de seu metabolismo secundário, denominadas de fitoquímicos e que normalmente contribuem para uma dada função, como crescimento da planta, controle da reprodução, defesa contra competidores, predadores e patógenos (DADASHPOUR et al., 2017). Os fitoquímicos podem ser classificados como carotenoides, fenólicos (onde estão inclusos ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos e coumarinas), alcaloides, compostos nitrogenados e compostos organosulfurados, todos derivados do metabolismo secundário da glicose (Figura 1) (CAMPOS-VEGA; DAVE OOMAH, 2013, SAAD et al., 2016).

Após processos de extração e isolamento dos fitoquímicos da planta de origem, eles passam por diversas análises químicas para definir suas estruturas, que muitas vezes são complexas, para então serem testados em modelos de laboratório em experimentos *in vitro* ou *in vivo* (JOHNSON, 2007).

Sem o conhecimento específico de seu mecanismo de ação dentro da célula, os fitoquímicos já têm sido usados na medicina tradicional, como por exemplo, a

salicina, que possui efeitos anti-inflamatório e analgésico. A salicina foi originalmente extraída de *Salix alba* (Salgueiro-branco) e mais tarde sinteticamente produzida para se tornar a já utilizada hoje, aspirina (SNEADER, 2000). *Taxus baccata* (Teixo) é conhecida por ser extremamente tóxica para animais que se alimentavam de suas folhas ou crianças que comeram suas frutas. Wani et al. (1971) isolaram da casca do caule de *Taxus baccata* o alcaloide paclitaxel, que mais tarde se tornou uma importante droga no tratamento do câncer (MOLYNEUX et al., 2007; WANI et al., 1971). Atualmente paclitaxel, juntamente com sua derivação semi-sintética docetaxel, a vinblastina e vincristina (*Catharanthus roseus*), são drogas de origem vegetal utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer por possuírem atividades citostáticas (SINGH et al., 2016; WEAVER, 2014).

Figura 1: Esquema simplificado da biossíntese de metabólitos secundários derivados da glicose.



Fonte: Saad et al. (2016)

Alguns fitoquímicos são conhecidos como fitotoxinas, que são tóxicos para seres humanos em certas concentrações (SHIBAMOTO; BJELDANES, 2009), como por exemplo, o ácido aristolóquico, extraído do gênero *Aristolochia*, que é carcinogênico em baixas concentrações (SHAW, 2010). Polifenóis e flavonoides podem induzir a produção de espécies reativas quando ingeridos em altas quantidades (HALLIWELL, 2007) e outros fitoquímicos interferem na absorção de nutrientes e são classificados como antinutrientes (AKANDE et al., 2010).

Fitoquímicos podem ainda serem genotóxicos, ou seja, causarem danos no material genético, como por exemplo, o alcaloide pirrolizidínico, que promove adutos, quebras e ligações cruzadas na molécula de DNA, trocas entre cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e indução de micronúcleos, podendo ser também carcinogênicos em células endoteliais de fígado e em hepatócitos (CHEN; MEI; FU, 2010; MEI et al., 2010). Um exemplo de fitoquímico genotóxico é a sanguinarina, um alcalóide extraído de *Sanguinaria canadensis*, que age também nas ATPases transmembranas (CROAKER et al., 2017).

Os fitoquímicos podem ser considerados como fitofármacos, ou seja, substâncias derivadas de plantas medicinais que passam por industrialização e têm legislação específica, sendo responsáveis por diversos efeitos terapêuticos com ou sem efeitos colaterais (EFFERTH et al., 2017). Portanto, os fitofármacos são medicamentos alopáticos, onde o princípio ativo é um fitoquímico isolado (SAAD et al., 2016).

Quando utilizado para tratamento de doenças, os medicamentos com substâncias de origem vegetal podem ser considerados também fitoterápicos. Estes são medicamentos derivados de uma mistura complexa de princípios ativos que atuam de modo sinérgico (SAAD et al., 2016). Desde 1978 a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) reconhece o uso de fitoterápicos e fitofármacos, e incentiva os países a formularem políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de medicamentos tradicionais de eficácia comprovada, recomendando a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa aos sistemas de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela legislação para medicamentos com substâncias de origem vegetal. A Portaria 06/95 diferencia as plantas medicinais dos fitoterápicos e de fitofármacos, ressaltando que os últimos apresentam formulação específica (BRASIL, 2006). Segundo a ANVISA (RDC nº 26/14), fitoterápico/fitofármaco é todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos (ANVISA, 2014).

2.2 *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann

O gênero *Fridericia*, sinônimo de *Arrabidaea* (KAEHLER, 2018), pertence à família Bignoniaceae e ocorre desde o México até a Argentina, incluindo o cerrado brasileiro. Diversas espécies deste gênero já têm sido utilizadas na medicina tradicional por apresentarem atividades antioxidante (*Arrabidaea patellifera*, MARTIN et al., 2008), antimicrobiana, antitumoral (*Arrabidaea samydoides*, PAULETTI; DA SILVA BOLZANI; YOUNG, 2003), anti-inflamatória (*Arrabidaea triplinervia*, LEITE et al., 2006) e adstringente (*Arrabidaea chica*, ZORN et al., 2001). Estudos fitoquímicos já realizados em espécies deste gênero indicam a presença de C-glucosilxantonas, fenilpropanoides, flavonoides (inclusive antocianidinas), derivados de alantoinas e triterpenos (GONZÁLEZ et al., 2000; MARTIN et al., 2008; MIRANDA et al., 2017).

F. platyphylla (Figura 2), anteriormente identificada como *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau, é encontrada nas vegetações de cerrado, campinarana e caatinga, popularmente conhecida como “cipó-una”, “cervejinha-do-campo” e/ou “tintureiro”. É uma planta com forma de arbusto ou liana, de origem nativa e não endêmica, ocorrendo em todas as regiões brasileiras, com exceção dos estados Amapá, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KAEHLER, 2018).

Alcerito et al. (2002) relataram atividade antifúngica do extrato de folhas de *F. platyphylla* e a análise fitoquímica deste indicou alto conteúdo de flavonoides, sendo quatro deles isolados e caracterizados: 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona, cirsioliol (primeira vez descrito na família Bignoniaceae), cirsimaritina e hispidulina. Estes compostos demonstraram atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*.

O extrato bruto das folhas de *F. platyphylla* e suas frações demonstraram atividade leishmanicida perante formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, por meio de inibição de enzimas e proteases cruciais para a sobrevivência do parasita. Porém, não apresentaram efeitos antioxidantes, favorecendo o parasita, pois não interferem no mecanismo de ação dos macrófagos (PEREIRA, 2012).

Figura 2: Cervejinha-do-campo (*Fridericia platyphylla*).



Fonte: <http://www.ervanariamarcosguiao.com/product-page/cervejinha-do-campo>

O extrato etanólico das raízes de *F. platyphylla* demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em camundongos, inibindo o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal e inibindo a formação de granulomas (DA ROCHA et al., 2011).

F. platyphylla tem sido pouco estudada em relação às suas atividades biológicas, principalmente quanto aos seus efeitos em células humanas. Em estudo desenvolvido no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, Serpeloni et al. (2013) mostraram que o extrato de raiz de *F. platyphylla* foi altamente citotóxico em células humanas gástricas normais (GAS) e tumorais (ACP02), diminuiu a viabilidade celular, induziu necrose e não apresentou efeito mutagênico.

Estudos recentes com extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* indicaram efeito gastroprotetor em diferentes ensaios com ratos portadores de úlcera gástrica, onde foi observada uma redução significativa dos danos causados pela úlcera (DA ROCHA et al., 2017). Em outro estudo foi avaliado o potencial mutagênico dos extratos de folhas, raízes e caule desta planta utilizando-se o teste de Ames, onde todos esses extratos apresentaram mutagenicidade para a cepa TA98 (relacionada a mutação *frameshift*) de *Salmonella typhimurium*, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica. Também foram avaliadas as frações aquosas e diclorometânicas das raízes e folhas; a porção aquosa das folhas

foi mutagênica e a diclorometânica de folhas e raízes apresentou apenas indícios de mutagenicidade. No mesmo estudo foi avaliada a atividade estrogênica e os extratos de folhas e de raízes demonstraram interação com o receptor de estrógeno (RESENDE et al., 2017).

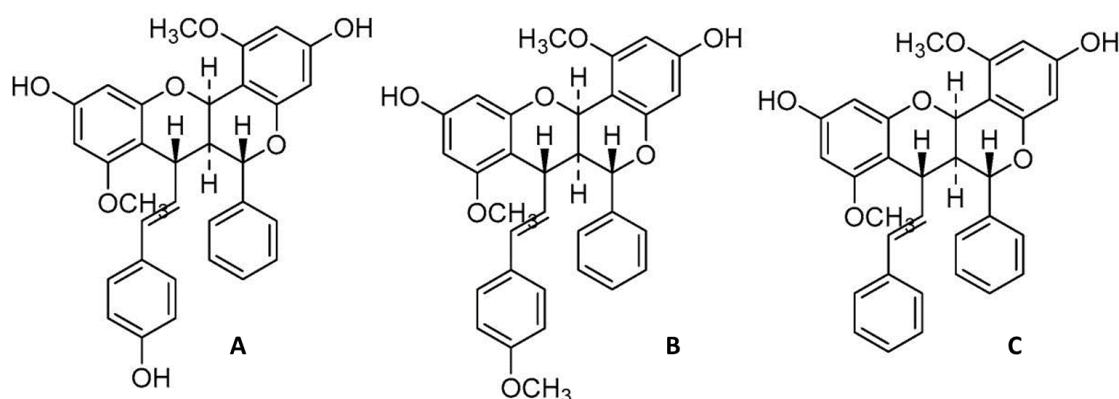
2.2.1 BRAQUIDINAS

As braquidinas são flavonoides inéditos isolados da porção diclorometano de um extrato hidroalcoólico das raízes de *Fridericia platyphylla* por Rocha et al. (2014). Para se obter esses compostos ativos, os autores dividiram o extrato em uma fração de CH₂CL₂, fizeram a análise por HPLC-PDA-ESIMS e as três estruturas identificadas foram denominadas de braquidinas A, B e C (Figura 3), tendo apenas um único radical diferente entre elas; braquidina A possui um grupo hidroxila, braquidina B um grupo metoxil e braquidina C não possui este radical.

Quando a atividade desses três compostos foi avaliada contra tripomastigotas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*, braquidina A foi inativa enquanto braquidinas B e C exibiram potencial atividade citotóxica, com IC₅₀ de 5,3µM e 6,6µM, respectivamente (DA ROCHA et al., 2014). A citotoxicidade destas braquidinas também foi avaliada utilizando-se macrófagos de exsudato peritoneal obtidos de camundongos albinos (BALB/c). Braquidina A novamente foi inativa até concentrações de 20µM enquanto B e C exibiram, respectivamente, LC₅₀ de 15,6µM e 17,3µM (DA ROCHA et al., 2014). As braquidinas B e C também foram avaliadas quanto à atividade contra amastigotas intracelulares (B: IC₅₀ 6,0µM e C: IC₅₀ 6,8µM), e foram capazes de inibir a invasão do parasita em células do hospedeiro na concentração de 10µM. Além disso, em ensaio *in vivo* utilizando-se camundongos albinos infectados com *T. cruzi*, braquidina B (100 mg/kg/dia/5dias) foi capaz de reduzir a parasitemia sanguínea e mortalidade dos animais quando comparados com grupo controle (DA ROCHA et al., 2014). A possível atividade com o receptor de estrógeno também foi avaliada, porém, os resultados não foram estatisticamente significativos (RESENDE et al., 2017).

Em estudo recente, a porção diclorometano (mistura das braquidinas A, B e C) do extrato das raízes também foi estudada quanto aos seus efeitos contra dor aguda em camundongos Swiss machos e suas possíveis interações com nociceptores. Os resultados foram uma redução na resposta nociceptiva dos camundongos (na concentração de 30mg/kg) e uma possível interação dos compostos com receptores opioides e os canais iônicos TRPM8 e ASIC, relacionados ao alívio de dor aguda (RODRIGUES et al., 2017).

Figura 3: Estrutura química das braquidinas.



Fonte: Rodrigues et al.(2017).

2.3 Viabilidade e morte celular

O cultivo de células humanas *in vitro* tem sido uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de novas drogas, pois permite avaliar danos e alterações morfológicas induzidas por xenobióticos. Em abordagens de larga-escala de produtos naturais, compostos isolados, ou moléculas sintéticas, é necessário identificar a efetividade dessas substâncias, sendo para isso importante a diferenciação entre células viáveis, mortas ou de alguma maneira, danificadas (PRÄBST et al., 2017).

O termo viabilidade celular é frequentemente definido como o número de células saudáveis em uma amostra em relação às inviáveis/mortas (STODDART, 2011). A análise *in vitro* da viabilidade se tornou uma abordagem comum para identificar uma variedade de alterações biológicas em diversas áreas da pesquisa científica, avaliando parâmetros fisiológicos, estruturais e/ou funcionais das células (GILBERT; FRIEDRICH, 2017).

Os ensaios de viabilidade celular *in vitro* também são importantes para se definir concentrações citotóxicas e não citotóxicas de agentes químicos, com o

objetivo de garantir o uso de concentrações seguras dos mesmos. Esses ensaios são bastante empregados em estudos que avaliam o uso seguro de extratos de plantas utilizados pela população na medicina tradicional (ATANASOV et al., 2015; SPECIAN et al., 2016).

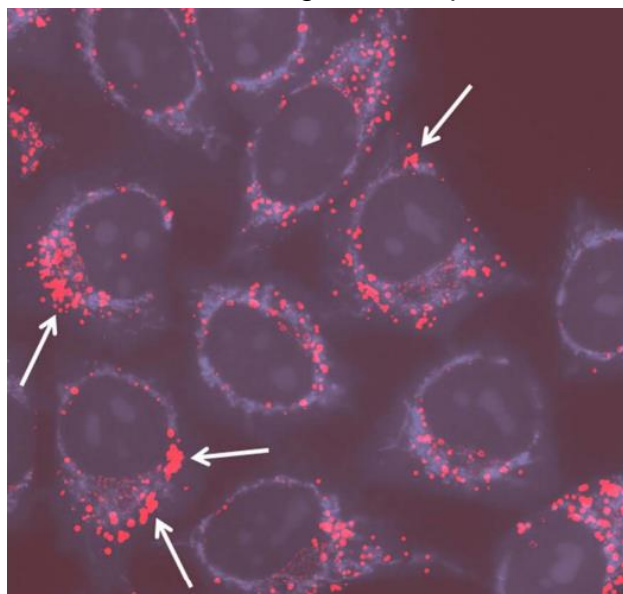
Existem metodologias diferentes para a análise de citotoxicidade de compostos e é importante a combinação delas (SPECIAN et al., 2016), pois utilizando-se mais de uma metodologia, a abordagem se torna mais confiável e, com um maior número de parâmetros sendo avaliados, aumenta-se também a reprodutibilidade dos resultados (GILBERT; FRIEDRICH, 2017). Os efeitos biológicos observados após a combinação de ensaios permitem inferir sobre os mecanismos de ação dos compostos, podendo resultar na identificação de moléculas e/ou organelas-alvo para determinar suas atividades biológicas (ATANASOV et al., 2015).

2.3.1 MTT

Um dos testes de viabilidade celular mais comuns, o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), frequentemente utilizado para se determinar a citotoxicidade de substâncias, já foi validado quanto à sua funcionalidade em diferentes linhagens celulares (MOSMANN, 1983). Neste ensaio, o sal de tetrazólio MTT, solúvel em água, é convertido pela enzima succinato-desidrogenase, presente na mitocôndria, em cristais de formazam insolúveis, pela clivagem do anel de tetrazólio. O produto formazam (de coloração roxa) é impermeável às membranas da célula e, portanto, se acumula no complexo de Golgi (RASHID-DOUBELL; HOROBIN, 1993) e em gotículas lipídicas (UCHINOMIYA et al., 2016) de células saudáveis (MOSMANN, 1983; STOCKERT et al., 2018) (Figura 4).

Os cristais de formazam normalmente possuem uma forma pontiaguda que pode danificar a integridade da célula, induzir morte celular e, conseqüentemente,

Figura 4: Células HeLa após 1,5h de tratamento com MTT. Setas indicam formazam acumulado em gotículas lipídicas.



diminuir o metabolismo e parar a reação de redução. Como os cristais são formados no meio intracelular, os protocolos baseados nos sais de MTT possuem uma etapa de lise celular e dissolução do formazam antes da leitura em espectrofotômetro. Todos esses aspectos tornam impossível a realização deste ensaio com avaliação em tempo real; devido a isso, o ensaio do MTT é caracterizado como um ensaio *end-point*, uma vez que causa a morte da célula (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; PRÄBST et al., 2017).

Fonte: Stockert et al., 2018.

Muitos trabalhos têm encontrado resultados falso-positivos, uma vez que o sal de tetrazólio pode ser reduzido por outros compostos e não pela atividade mitocondrial (SPECIAN et al., 2016), como por exemplo, diversos compostos de origem vegetal, entre eles os flavonoides (BRUGGISSER et al., 2002; PENG; WANG; REN, 2005; TALORETE et al., 2006).

O sal de MTT pode ser reduzido a cristais de formazam pela atividade de NADH ou NADPH dentro das células, mas fora da mitocôndria (BERRIDGE; TAN, 1993). Diante disso, estudos recentes sugerem que o ensaio do MTT, ao invés de ser utilizado como parâmetro para avaliar a redutase mitocondrial, deve ser usado

como uma medida da taxa de produção de NAD(P)H, uma vez que o MTT também é reduzido por enzimas glicolíticas do retículo endoplasmático (STOCKERT et al., 2018).

2.3.2 VERMELHO NEUTRO

O ensaio do vermelho neutro, também utilizado para analisar a viabilidade celular, é baseado na capacidade de células viáveis incorporarem e reterem o corante eurodina, tendo como base a integridade do lisossomo e o metabolismo celular. O corante pertence a uma classe que contém a estrutura fundamental fenazina adicionado de radical metil, que capacita o corante a entrar na célula por difusão simples, se concentrando nos lisossomos, onde se liga a grupos aniônicos e fosfatases na matriz lisossomal (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

O ensaio depende da capacidade da célula em manter o gradiente de pH existente entre lisossomo e citoplasma, por meio do metabolismo de ATP. Conseqüentemente, a quantidade de corante absorvido é diretamente proporcional ao número de células viáveis, podendo então serem identificadas células vivas, danificadas ou mortas (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Quando sob o efeito de agentes xenobióticos que podem danificar e/ou modificar o metabolismo e a integridade dos lisossomos, a difusão do corante, assim como a sua retenção podem ser diminuídas, e isto conseqüentemente reduz sua quantidade dentro da célula, expressando então um caráter citotóxico do xenobiótico (ATES et al., 2017).

Assim como o MTT, esse ensaio é amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de diversas substâncias químicas, como produtos farmacêuticos, naturais e cosméticos (RODRIGUES et al., 2013), porém, também possui limitações, pois o corante pode reagir com substâncias voláteis, instáveis ou com baixa solubilidade, podendo resultar em resultados falso-positivos (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

2.3.3 LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica, encontrada em diversos tipos celulares e responsável pela conversão de piruvato em lactato na presença de NADH, ou de lactato em piruvato na presença de NAD⁺. O ensaio de liberação da enzima LDH também é utilizado como um indicador de citotoxicidade. É baseado no extravasamento desta enzima e de substâncias normalmente

intracelulares para o meio extracelular (ZOU et al., 2013). A liberação da LDH intracelular é um indicador de morte celular irreversível devido aos danos na membrana plasmática (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Portanto, o ensaio pode analisar o potencial de compostos que podem danificar a integridade da membrana ou outras atividades celulares que resultem nisso.

A identificação da enzima também é feita por meio de um ensaio colorimétrico em que são utilizados reagentes comerciais constituídos principalmente por lactato, NAD^+ e INT (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio), um sal similar ao MTT,. Em experimentos onde ocorre morte celular, parte do meio extracelular deve ser removido para detecção da LDH liberada. Em mistura com os reagentes comerciais, a LDH extravasada converte o lactato em piruvato utilizando NAD^+ para catalisar a reação e produzindo também NADH; este reduz o sal INT em formazan (coloração arroxeadada) e sua detecção pode ser realizada por espectrofotometria (Figura 5).

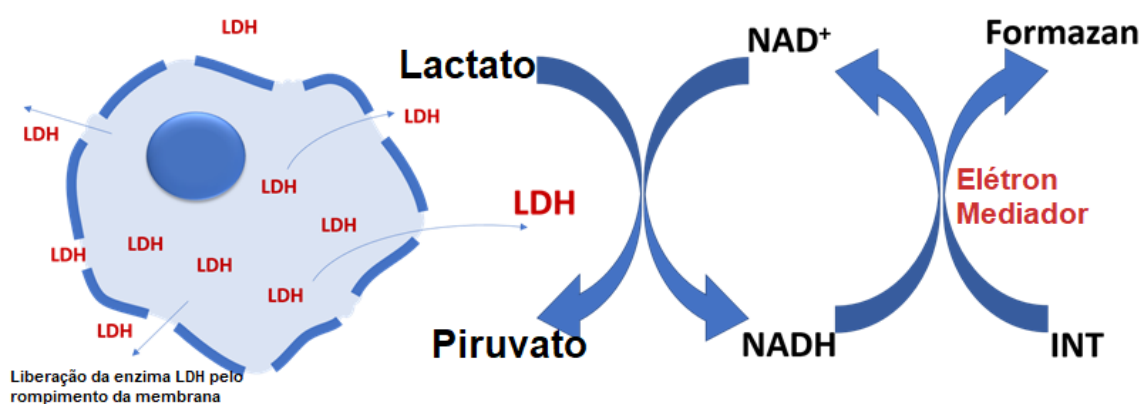


Figura 5: Esquema do funcionamento do kit utilizado para o ensaio LDH.

Fonte: Canvax Biotech, 2018.

2.3.4 APOPTOSE/NECROSE

O termo apoptose foi primeiramente usado por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 para descrever morfologicamente uma forma distinta de morte celular, e desde então, os componentes da apoptose e seus mecanismos moleculares têm sido descritos (KERR, 1972; PAWELETZ, 2001; KERR, 2002).

O processo de morte celular regulada (MCR) pode ser induzido por diversos fatores; ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento celular e

também como um mecanismo homeostático para controlar a população celular. Há diversos mecanismos de MCR, cada um com sua via metabólica específica, resultando num tipo de morte diferente. Quando a morte é devida a elevados danos físicos, químicos ou mecânicos, ela é caracterizada como morte celular acidental (MCA) e seu efeito é imediato e a célula adquire uma característica de necrose (GALLUZZI et al., 2018).

São múltiplos os processos de MCR, como exemplo, apoptose (extrínseca e intrínseca), necroptose (necrose “programada”), ferroptose (distúrbios no estado redox), piroptose, autofagia, lisossomo-dependente, etc e as células no estágio final são morfologicamente separados em duas classes, a aparência apoptótica e a necrótica (GALLUZZI et al., 2018).

Mediada por caspases, a apoptose é uma morte celular programada em que ocorrem diversas alterações morfológicas (encolhimento da célula, condensação dos cromossomos, fragmentação do núcleo na fase tardia e formação de corpos apoptóticos) e bioquímicas (exposição da fosfatidilserina para o lado externo da membrana) (CHEN; KANG; FU, 2018). A principal diferença entre os dois mecanismos principais de apoptose (extrínseca e intrínseca) é a origem do dano. Resumidamente, a via extrínseca é ativada por receptores de membrana que recebem um sinal que induz a morte celular e esta é mediada pela ativação da caspase-8; já na via intrínseca, a sinalização parte de dentro da célula e é principalmente mediada pela mitocôndria quando há dano excessivo no DNA ou estresse oxidativo, desencadeando a cascata de sinalização apoptótica pela ativação da prócaspase-9 (ELMORE, 2007; GALLUZZI et al., 2018).

Um mecanismo diferente à morte celular por apoptose é a necrose, que é considerado um processo tóxico, degradativo e dependente de energia, podendo danificar células adjacentes, diferentemente do processo de apoptose, no qual não há prejuízo às células vizinhas (ELMORE, 2007).

Apoptose e necrose podem ocorrer simultaneamente (ZHANG et al., 2015) devido à interconexão entre suas vias metabólicas. A forma final da morte celular depende do tipo celular, do microambiente ao qual a célula está inserida e do fator que induziu a morte (CHEN; KANG; FU, 2018).

A busca pela indução de apoptose é uma das abordagens utilizadas na identificação e desenvolvimento de terapias anticâncer, desde que o medicamento seja seletivo para as células tumorais (KUMAR et al., 2016) e um dos focos atuais é

a procura por fitoquímicos que possam auxiliar neste efeito. Em uma revisão de Kumar et al. (2016), os autores relataram diversos componentes de origem vegetal, extratos ou fitoquímicos isolados, com efeitos anticarcinogênicos e indutores de apoptose em diferentes linhagens celulares. Alguns exemplos são os extratos de folhas de *Camellia sinensis* que induzem o aumento da expressão de caspases-3, -8 e -9 em células HT-29 (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2015) e extratos de raízes de *Trypterygium hypoglaucom* que aumentam a expressão de genes relacionados à NF-κB e de caspases-3 e 8 em células leucêmicas humanas HL-60 (ZHUANG et al., 2004).

Como exemplo de flavonoides, mesma classificação das braquidinas desse estudo, tem-se a herbacetina, que diminuiu a proteína quinase p-AKT, aumentou a clivagem da polimerase PARP, diminuiu a expressão do gene inibidor de apoptose *BCL-2* e aumentou a do gene *BAX*, pró apoptótico, em células de hepatocarcinoma humano HepG2 (QIAO et al., 2013).

Um ensaio de apoptose/necrose, baseado na permeabilidade seletiva da membrana, permite a diferenciação desses dois tipos de morfologias de morte celular por meio do uso de corantes fluorescentes que evidenciam diferentes regiões da célula. Isto possibilita identificar células em processo de morte por apoptose (a célula não apresenta ruptura da membrana plasmática) ou por necrose, onde a membrana plasmática apresenta-se rompida (VANDEN BERGHE et al., 2013).

2.4 Quantificação de espécies reativas intracelulares

A homeostase redox, como por exemplo o controle do pH, é importante para a sobrevivência celular. Processos de oxidação-redução ocorrem em todos os processos fundamentais da vida e alterações fisiológicas ou patofisiológicas podem alterar essa homeostase, causando o estresse oxidativo (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

O estresse oxidativo consiste num aumento significativo das quantidades de espécies reativas (ERs) dentro da célula, ou numa diminuição significativa da capacidade redutora de defesas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase (GPX4), ou ambas. Os efeitos do estresse oxidativo dependem da dimensão de tais variações. Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos nocivos do estresse oxidativo se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, restabelecendo o equilíbrio normal intracelular. Perturbações de maior escala podem

levar à morte celular por apoptose, necrose ou ferroptose, através da abertura de canais iônicos, lipoperoxidação, modificações em proteínas e oxidação do DNA (BURTON; JAUNIAUX, 2011).

Durante o estresse oxidativo a célula não é capaz de neutralizar a grande quantidade de ERs com suas defesas antioxidantes. A maioria destas espécies, produzidas por meio da redução do oxigênio molecular (EROs), é produzida em pequenas quantidades em organismos que utilizam metabolismo aeróbio e quaisquer danos que provoquem são reparados de forma constante. No entanto, em condições extremas de estresse oxidativo, os danos levam ao esgotamento dos níveis de ATP, o que evita uma apoptose celular controlada e provoca a falha total do funcionamento da célula, levando à necrose (LEE; SHACTER, 1999; LELLI et al., 1998).

Quando há perda da atividade da GPX4 a célula é induzida à ferroptose, uma morte celular programada devida à acumulação de EROs que interagem com os lipídios. Regulada por vias específicas, essa forma de morte celular ferro-dependente é genética, bioquímica e morfologicamente diferente das outras mortes celulares como apoptose, necrose ou necroptose (YANG; STOCKWELL, 2016).

Já se tem dados na literatura de compostos e extratos de origem vegetal que apresentaram efeitos antioxidantes pela eliminação de espécies reativas, ou estimularam a defesa antioxidante da célula, demonstrando um potencial para atuarem na prevenção do câncer (SERPELONI et al., 2015; SRIVIDYA et al., 2011).

Na avaliação da atividade antioxidante de um composto, associa-se o mesmo a um agente indutor de ER, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a detecção das ERs pode ser feita com sondas específicas, como por exemplo a CM- H_2 DCFDA. Após sua oxidação por oxidantes potentes, tais como os produzidos por reações catalisadas por íons metálicos e peroxidases, esta sonda torna-se fluorescente. A leitura fluorimétrica indicará se houve diminuição ou não das ERs quando comparadas ao grupo tratado com peróxido de hidrogênio, pois quanto maior a quantidade de ERs detectada, maior a absorbância (FORMAN et al., 2015).

Deve ser lembrado que o ensaio utilizando-se a sonda CM- H_2 DCFDA não identifica espécies reativas específicas, mas sim, oxidantes potentes, tais como os produzidos por reações catalisadas por íons metálicos e peroxidases (FORMAN et al., 2015). Por conseguinte, para a detecção de determinadas espécies reativas é necessária a identificação, separação e quantificação dos produtos de oxidação, não

se devendo afirmar que espécies reativas estão envolvidas em determinado processo biológico baseado unicamente no uso de oxidação de corantes (FORMAN et al., 2015), como a sonda utilizada no presente estudo.

2.5 Genotoxicidade

A genotoxicidade é a capacidade que alguns agentes químicos e físicos possuem de causar dano no DNA e afetar a integridade de uma célula, podendo esses danos serem potencialmente mutagênicos. O termo mutagenicidade é utilizado quando um dano genotóxico se torna uma mutação permanente. Portanto, todos os mutágenos são genotóxicos e nem todos os agentes genotóxicos são mutagênicos (BENIGNI; BOSSA; TCHEREMENSKAIA, 2013). Há diferentes ensaios sensíveis e específicos para se analisar a genotoxicidade de moléculas; quando combinados, sua sensibilidade tende a aumentar, permitindo uma melhor avaliação do composto que está sendo analisado (KANG et al., 2013).

Alguns compostos têm a capacidade de induzir danos em regiões frágeis do DNA, mais sensíveis a sofrerem lesões; são nessas regiões que normalmente os proto-oncogenes estão presentes, assim podendo levar a efeitos carcinogênicos (DILLON; BURROW; WANG, 2010).

A indução de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser consequência da resposta do metabolismo celular à presença de agentes químicos. As EROs formadas podem induzir genotoxicidade. Um exemplo é o metabolismo do arsênico, um metal pesado considerado um potente carcinógeno, que produz radicais hidroxila que causam danos ao DNA e induzem principalmente câncer de mama (KHANJANI; JAFARNEJAD; TAVAKKOLI, 2017), pulmão, próstata e pâncreas (LIU et al., 2001; GARCÍA-ESQUINAS et al., 2013).

A genotoxicidade é importante para o tratamento quimioterápico, que utiliza as propriedades de genotoxinas priorizando a indução de dano ao DNA em células tumorais. Os danos no material genético são transmitidos para as próximas células durante a divisão celular e o acúmulo de danos pode levar à instabilidade genômica e/ou induzir morte celular (HEIJINK; KRAJEWSKA; VAN VUGT, 2013). Um dos grandes problemas de drogas genotóxicas é a indução de dano tanto em células normais quanto em células tumorais. Apesar da diferença na proliferação e na sensibilidade, frequentemente as células normais são afetadas precocemente aumentando o risco de câncer secundário (LIU et al., 2001).

2.5.1 ENSAIO DO COMETA

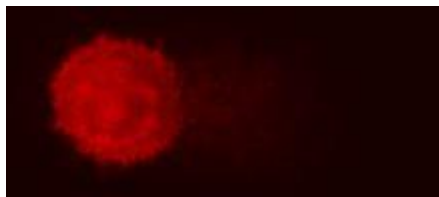
Denominado como *Single Cell Gel Electrophoresis*, simplificado por ensaio do cometa, é um método rápido, sensível, barato e confiável, que permite determinar o dano no DNA em células eucarióticas associadas com exposição a agentes potencialmente genotóxicos (LOVELL; OMORI, 2008). Primeiramente foi desenvolvido por Ostling & Johansson (OSTLING; JOHANSON, 1984) em versão de pH neutro e mais tarde modificado por Singh (SINGH et al., 1988) para uma versão alcalina, aumentando a especificidade e reprodutibilidade do ensaio. O seu princípio é simples; as células são embebidas em agarose *low-melting*, depois é feita a lise celular em pH neutro ou alcalino e em seguida realizada a eletroforese.

Atualmente o ensaio do cometa na versão neutra é usado para detectar quebras de fitas duplas no DNA, enquanto o ensaio alcalino é mais sensível para detectar DNA fragmentado, sítios álcali-lábeis, *crosslinks* entre DNA-DNA e DNA-proteína e quebras de cadeias simples de DNA associadas a sítios incompletos de reparo por excisão (LU; LIU; YANG, 2017).

O DNA danificado é capaz de migrar graças à influência da corrente elétrica; quanto menores os fragmentos de DNA, mais eles migrarão quando comparados aos maiores fragmentos. O resultado dessa migração do DNA se assemelha à figura de um cometa (Figura 6). Este é corado e sua fluorescência analisada em microscópio de fluorescência para determinar a extensão do dano causado. A análise pode ser feita manualmente ou automaticamente; esta última é aprimorada por meio do uso de softwares específicos de imagem (COLLINS, 2004). Os parâmetros mais utilizados são o comprimento da cauda (*tail length*) a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda (*tail moment*). Este último combina o comprimento com a intensidade da cauda do cometa, a porcentagem de DNA na cauda, relativa à intensidade da cabeça reflete a quantidade de DNA danificado (LU; LIU; YANG, 2017).

Esse ensaio pode ser realizado em estudos *in vitro* e *in vivo*, e é um dos ensaios mais utilizados em combinação com outros ensaios genotóxicos, por ser um método sensível e eficiente para a determinação de compostos que possam ser danosos ao DNA (BHAGAT, 2017; NANDHAKUMAR et al., 2011; TICE et al., 2000). Apesar da eficiência, esse ensaio não identifica os mecanismos ou vias pelos quais a droga possa estar causando o efeito genotóxico (TICE et al., 2000).

Figura 6: Célula tumoral de próstata humana (PC-3) com danos no DNA no ensaio cometa



Fonte: arquivo pessoal.

2.6 Metabolômica

A metabolômica tem como objetivo identificar e quantificar o metaboloma, ou seja, todas as moléculas com baixa massa molar (metabólitos) que participam de uma rede de transformações químicas que estão presentes em uma célula (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). O ensaio fornece o perfil de metabólitos primários e secundários, os produtos finais da expressão gênica em condições fisiológicas, que são os responsáveis pelo fenótipo (LAST; JONES; SHACHAR-HILL, 2007). O termo surgiu no final dos anos noventa e é relacionado ao estudo qualitativo e quantitativo dos metabólitos, afim de relacioná-los a perturbações ambientais ou mudanças genéticas (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; DUNN et al., 2011; SMOLINSKA et al., 2012; BADDINI; NETTO; TEIXEIRA, 2014).

A composição de metabólitos de vias biológicas específicas permite auxiliar na compreensão do organismo saudável em relação a alterações patológicas (KUMAR, 2016).

A espectroscopia ressonância magnética nuclear (RMN) é um dos métodos mais utilizados para se obter dados sobre metabolômica. Essa técnica detecta metabólitos primários e secundários sem a destruição da amostra. Cada substância possui seu pico específico e a alta reprodutibilidade torna a RMN adequada para a formação de um banco de dados de metabolômica de domínio público (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

Em muitas doenças as alterações metabólicas precedem as anatômicas, e a técnica de RMN se apresenta como um método eficiente de detecção precoce destas alterações, por ser potencialmente sensível a estas mudanças (TOMITA; NISHIOKA, 2005).

O conhecimento das características metabolômicas é fundamental para auxiliar o diagnóstico e a descoberta de drogas terapêuticas contra o câncer (OLIVARES et al., 2015) e a técnica de RMN tem sido muito empregada para avaliar

drogas que interfiram no metabolismo do tumor. Atualmente drogas recém-descobertas e drogas utilizadas para outras finalidades terapêuticas, como por exemplo a metformina (droga anti-diabética), estão em fase pré-clínica de avaliação metabólica, a fim de identificar se elas podem agir no metabolismo de células tumorais (OLIVARES et al., 2015), propiciando esperanças e boas perspectivas para terapia do câncer.

2.7 Western Blotting

A proteômica é o estudo das proteínas e permite avaliar sua quantidade, função e estrutura. É uma ferramenta muito utilizada quando se tem como objetivo estudar mudanças no metabolismo em resposta a xenobióticos. O estudo da proteômica dá um resultado final sobre o organismo melhor compreendido do que a genômica, pois esta última pode apenas estimar a expressão da proteína, enquanto em determinados ensaios de proteômica é possível uma quantificação mais exata. Além disso, a quantidade de proteínas pode variar constantemente, dependendo das condições ambientais das células (ASLAM et al., 2017; CHANDRASEKHAR et al., 2014).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para um estudo das proteínas em uma célula e são divididas, basicamente, em três classes: (1) proteômica de expressão: usada para avaliar qualitativamente ou quantitativamente os diferentes níveis de expressão de proteínas totais, comparando diferentes condições, como por exemplo, células tumorais e células normais. Nessa abordagem é comum o emprego de ensaios como *western blotting*, espectrometria de massa e eletroforese bidimensional; (2) proteômica estrutural: tem como objetivo esclarecer as formas tridimensionais das proteínas e suas complexidades; para isso são feitos estudos com cristalografia de raio-x e/ou espectroscopia por RMN; (3) proteômica funcional: tem como objetivo elucidar o funcionamento e mecanismos moleculares de proteínas específicas, tentando explicar suas funções biológicas. As análises necessitam de estudos aprofundados que utilizam desde as técnicas já citadas como técnicas avançadas de ionização (CHANDRASEKHAR et al., 2014).

Com o objetivo de avaliar as respostas das células frente a diferentes concentrações dos compostos-teste, no presente estudo foi utilizado o *Western blotting* para a análise de expressão. O *Western Blotting* é uma técnica importante e robusta para a imunodeteção de proteínas; essas são separadas por eletroforese e

transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e permite a detecção precisa de proteínas-alvo por meio de anticorpos monoclonais antígeno-específicos (ASLAM et al., 2017).

Apesar de ser uma técnica antiga, o *blotting* de proteínas tem evoluído constantemente desde sua invenção, resultando em maneiras diferentes de transferir proteínas, utilizando-se membranas de diferentes materiais, cada qual com suas vantagens e desvantagens. O método é bem sensível, porém, dependente de vários fatores, como a qualidade da corrida na eletroforese; a transferência; a retenção do antígeno durante o processo e também do sistema de detecção utilizado no final. Os resultados podem ser comprometidos caso haja deficiência em alguma dessas etapas (KURIEN; SCOFIELD, 2015).

Com a utilização do *Western blotting* é possível estudar diferentes mecanismos celulares que possam estar sendo afetados pelos tratamentos utilizados. Dependendo dos efeitos previamente observados nos ensaios anteriores, é possível analisar vias específicas, com o objetivo de descobrir onde um xenobiótico pode estar agindo, como por exemplo, estudar vias de proliferação, morte, migração, danos celulares, danos ao DNA, etc.

2.8 Migração e Invasão Celular

Algumas células eucarióticas possuem a capacidade de migração e invasão, fenômenos que ocorrem durante a gastrulação (KELLER, 2005) e no desenvolvimento do sistema nervoso (HATTEN, 1999), do sistema vascular (ROSSANT; HOWARD, 2002), da placenta e durante a migração de leucócitos (FRIEDL; WEIGELIN, 2008). Porém, há situações patológicas que podem desregular o movimento celular, como por exemplo, a metástase em câncer. Este é um dos maiores problemas para o tratamento dessa doença, pois envolve múltiplos processos de crescimento, migração de células através do sangue e do sistema linfático e estabelecimento de colônias distantes (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; KRAMER et al., 2013).

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é uma característica das células epiteliais que adquirem um fenótipo mesenquimal, importante para o desenvolvimento do organismo. A TEM contribui para a cicatrização de feridas e também no processo patológico, causando a transição de células neoplásicas de carcinomas primários, que desenvolvem características migratórias, invasivas,

chegando a uma disseminação metastática (DIEPENBRUCK; CHRISTOFORI, 2016; NIETO et al., 2016; GLOUSHANKOVA; RUBTSOVA; ZHITNYAK, 2018).

Determinar a capacidade migratória e invasiva de células tumorais e esclarecer seus mecanismos de ação é uma das estratégias mais relevantes para o diagnóstico, prognóstico, desenvolvimento de novas drogas e tratamento do câncer (KRAMER et al., 2013).

A migração nada mais é que o movimento celular sobre um substrato, como a matriz extracelular, fibras, membranas basais e até mesmo em placas de plástico; porém, é realizado em superfícies 2D, sem possuir algo que obstrua o movimento (KRAMER et al., 2013). Para a realização da migração, o córtex celular deve estar rico em filamentos de actina e então ser realizado em 3 etapas: protusão (estruturas ricas em actina são impulsionadas para fora da borda anterior da célula), ligação (conexão da actina do citoesqueleto com o substrato através de integrinas da membrana plasmática) e tração (associação das fibras de tensão miosina II e actina arrastam a massa citoplasmática (HOSOOKA et al., 2001).

A invasão é definida como o movimento celular através de uma matriz 3D onde a célula precisa modificar o seu formato e interagir com a matriz extracelular. Para a realização da invasão a célula necessita de adesão, proteólise da matriz extracelular e migração (FRIEDL; WOLF, 2010; KRAMER et al., 2013).

Linhagens tumorais (PC-3 e DU145) e normal (PNT2) de próstata já foram relatadas quanto às suas capacidades de migração (ELGASS; COOPER; CHOPRA, 2014) e essas mesmas células tumorais conseguem invadir a matriz extracelular (COLELLA; JACKSON; GOODWYN, 2004), servindo então como bons modelos para realização desses ensaios.

2.8.1 MIGRAÇÃO *TRANSWELL*

O ensaio de migração *transwell* foi desenvolvido primeiramente por Boyden (a técnica também ficou conhecida como câmara de Boyden) para analisar respostas quimiotáticas de leucócitos (BOYDEN, 1962; KRAMER et al., 2013). O ensaio se baseia em duas câmaras com meio de cultura separadas por uma membrana porosa onde as células podem transmigrar (Figura 7). O tamanho das células a serem analisadas é importante para definir o tamanho dos poros. As células que ficam aderidas na câmara superior podem migrar verticalmente através dos poros para o compartimento inferior, onde o meio possui uma concentração maior de soro

(KRAMER et al., 2013). Há dois modos de quantificar as células que migraram: (1) fixá-las na membrana, corá-las e quantificá-las ou (2) corá-las com fluoróforos, dissociá-las da membrana e quantificá-las com leitor de fluorescência, sendo a segunda a recomendada pela revisão de Kramer et al. (2013).

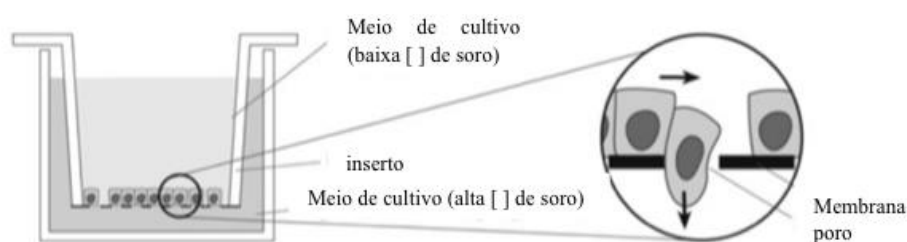


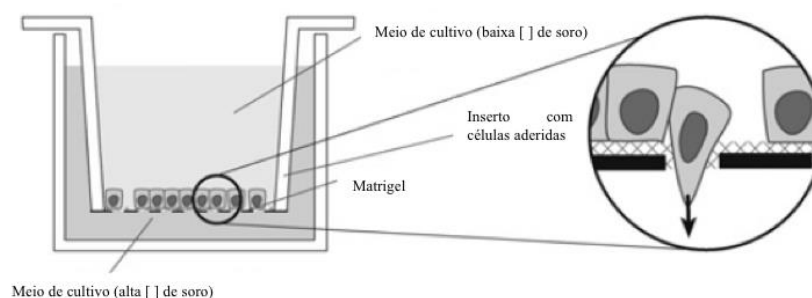
Figura 7: Princípio da migração transwell.

Fonte: Kramer et al. (2013) modificado.

2.8.2 INVASÃO *TRANSWELL*

O ensaio de invasão *transwell* é similar à migração *transwell*. O que os diferencia na etapa de montagem é a inclusão de uma membrana matrigel que simula uma matriz extracelular, cobrindo os poros e impedindo que células não-invasivas migrem através dela. Assim, células invasivas podem degradar a matriz e se moverem para a outra câmara, aderindo-se no compartimento inferior (Figura 8). Kramer et al. (2013) recomendam calcular a razão de células invasivas em relação às que migraram nos ensaios de migração, obtendo-se assim, um índice de invasão e determinando a contribuição da invasão para a velocidade da motilidade. O ensaio de invasão *transwell* é o mais utilizado dentre os ensaios de invasão (KRAMER et al., 2013), tendo já sido utilizado, por exemplo, em estudos com trofoblastos (TANG et al., 2012), câncer colorretal (ZHANG et al., 2013) e melanoma (KREISEDER et al., 2013).

Figura 8: Ensaio de invasão transwell com a membrana matrigel



Fonte: Kramer et al. (2013) modificado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal utilizar os fitoquímicos braquidinas A, B e C, obtidos do extrato das raízes da espécie vegetal *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann, para tratar células tumorais de próstata humana e avaliar algumas de suas atividades biológicas com o intuito de indicá-las como possíveis compostos antitumorais.

3.2 Objetivos específicos

Utilizar duas linhagens de células tumorais de próstata humana (PC-3 e DU145) tratadas com braquidinas A, B ou C para avaliar a capacidade desses fitoquímicos de induzir:

a) em células PC-3:

- citotoxicidade, apoptose ou necrose;
- genotoxicidade;
- alteração quantitativa de espécies reativas intracelulares;
- mudanças no perfil metabólico;
- alterações na expressão de proteínas.

b) em células DU145:

- citotoxicidade;
- alterações na motilidade celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

As linhagens celulares utilizadas neste estudo, PC-3 e DU145, são ambas humanas e tumorais de próstata. A linhagem PC-3, isolada e estabilizada de um adenocarcinoma de próstata metastático em osso grau 4 de um homem de 62 anos de idade, foi obtida da ATCC (ATCC® CRL-1435™). A linhagem DU145, isolada de um sítio metastático em cérebro, também foi obtida da ATCC (ATCC® HTB-81™), estabilizada de carcinoma de um homem de 69 anos de idade.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 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) e estreptomicina 0,10 g/L (CAS: 3810-74-0) em garrafas de cultura com capacidade de 60 mL e área de crescimento 25 cm². Os cultivos foram mantidos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

O uso dessas linhagens é justificado pelas linhas de pesquisa do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON), onde são estudados diversos marcadores moleculares relacionados ao câncer de próstata. Além disso, essas duas linhagens celulares são bem estabelecidas e já foram utilizadas em diversos estudos para caracterização de novas drogas (DEL BELLO et al., 2019; ROGERS et al., 2015).

Durante os experimentos para avaliar a influência das braquidinas sobre o processo de migração celular não foi possível analisar este parâmetro com as células PC-3, pois estas não responderam adequadamente, ou seja, não migraram. Assim, decidimos utilizar outra linhagem tumoral de próstata, a DU145. Para isso foi realizado primeiramente o ensaio MTT para definição das concentrações citotóxicas e em seguida o experimento para avaliar o processo de migração celular.

4.2 Braquidinas

Isoladas da porção diclorometano de um extrato hidroalcoólico das raízes de *Fridericia platyphylla* por Rocha et al. (2014), as braquidinas A, B e C foram diluídas em quantidades iguais de PBS e DMSO, portanto, uma concentração final de 50% de DMSO. Foram preparadas 9 diferentes concentrações, variando de 24 a 3072µM, sendo as concentrações em cultura celular cem vezes menor, o que resultou numa concentração final de DMSO a 0,5% no meio de cultura. Para todos os ensaios foi

utilizado um controle negativo – cultura tratada somente com PBS e um controle de solvente – cultura tratada com DMSO a 0,5%.

4.3 Ensaios de viabilidade/citotoxicidade

Para os ensaios de viabilidade celular foram semeadas 1×10^4 células por poço, em placas de cultura de 96 poços e realizados experimentos com 8 repetições técnicas. A linhagem PC-3 foi utilizada em todos os ensaios e a DU-145 somente no ensaio MTT. As células foram estabilizadas em meio de cultura completo (RPMI 1640 com L-Glutamina e sem bicarbonato de sódio, complementado com 10% de soro bovino fetal) por 24 horas. Após este período o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS e os tratamentos adicionados por 24 horas em meio de cultura sem soro bovino fetal. Foram analisadas nove concentrações (0,24; 0,75; 0,96; 1,50; 3,84; 6,00; 15,36; 24,00 e 30,72 μM) do composto diluído em 50% de dimetilsulfóxido (DMSO). Essas concentrações foram definidas com base no trabalho de Rocha (2014).

4.3.1 MTT

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com Mosmann (1983), com modificações, em ambas as linhagens celulares. Decorrido o período de tratamento as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 4 horas a 37°C. Após a retirada da solução de MTT foram adicionados 200 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biotek Eon, Winooski, VT, EUA) a 550nm. Os valores obtidos para o grupo controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade. Para o cálculo do IC_{50} , este foi considerado como a concentração que reduz a viabilidade celular pela metade.

4.3.2 VERMELHO NEUTRO

O ensaio do vermelho neutro foi realizado na linhagem PC-3, segundo Repetto, Del Peso e Zurita (2008) com modificações. Após o período de tratamento a solução de vermelho neutro (40 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada e as células incubadas por 3 horas a 37°C. Para a leitura em espectrofotômetro (540nm) foi adicionado 0,2mL da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em etanol 50%). Os valores obtidos para o grupo controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade.

4.3.3 LDH

O ensaio do LDH foi feito utilizando-se o kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

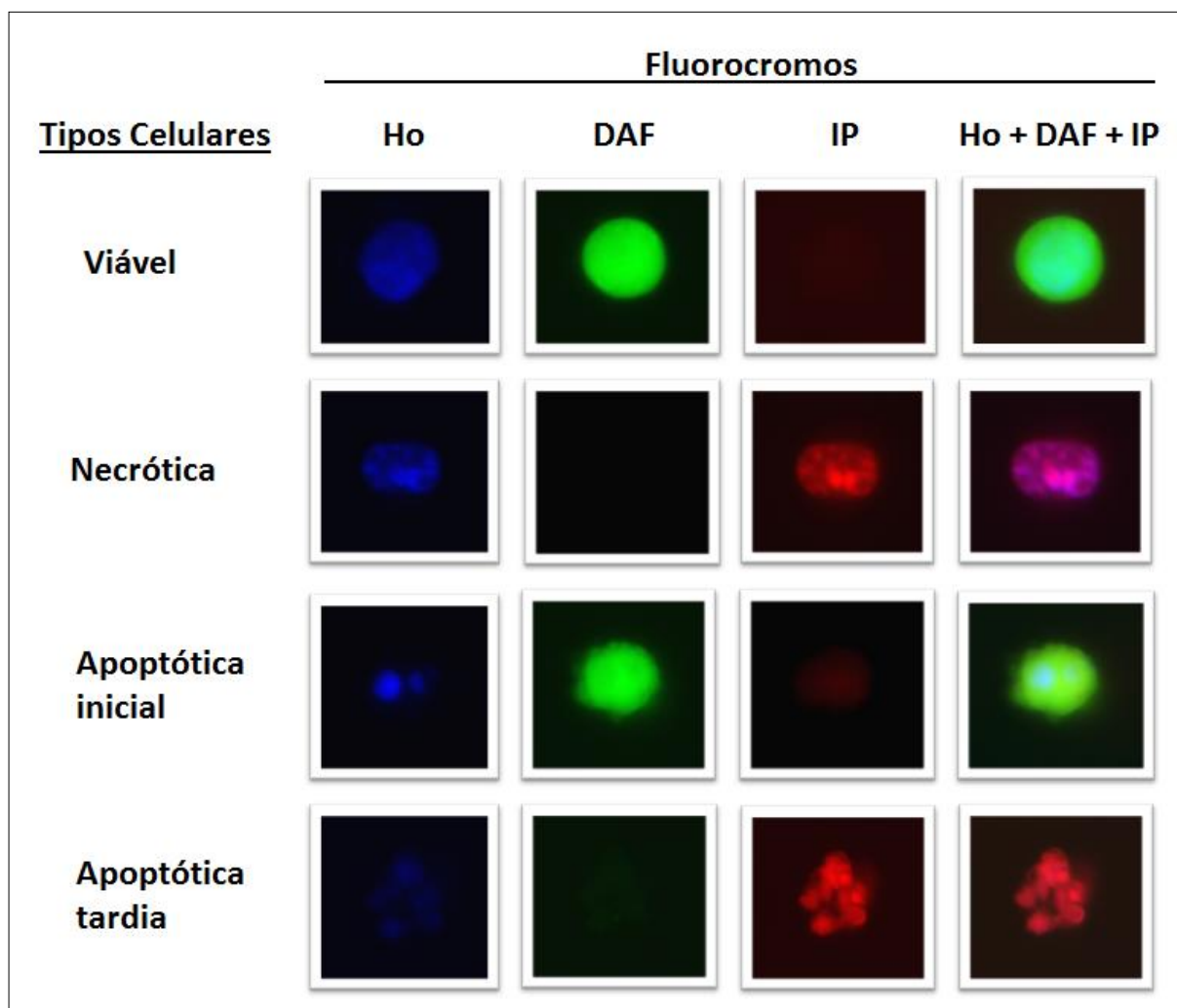
Após o tratamento das células PC-3 com as braquidinas durante 24 horas, 50µL do sobrenadante foi retirado para análise seguindo protocolo do kit comercial. A leitura final foi realizada em espectrofotômetro. O valor de atividade da enzima é o resultado da subtração do valor da leitura feita no comprimento de onda de 680nm (*background* da reação) menos o valor obtido da leitura em 490nm.

4.3.5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR COM TRIPLA COLORAÇÃO

Para a análise de morte celular foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células (PC-3) em placas de 12 poços, estabilizadas e tratadas no tempo de 24h com concentrações definidas nos ensaios de viabilidade celular (1,50; 3,84 e 6,00 µM), para esse ensaio foi utilizado doxorubicina (DXR) a 0,345µM como controle positivo. Após o tratamento das culturas o meio foi removido, as células lavadas com PBS e tripsinizadas. A suspensão celular, juntamente com o meio removido e o PBS resultante da lavagem foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e a cada cultura foram adicionados 400µL de PBS. Todos os experimentos foram feitos em triplicata técnica.

Para a análise da morte foi utilizada a tripla coloração das células com os corantes iodeto de propídio (IP), Hoescht 33342 (Ho) e diacetato de fluoresceína (DAF) conforme Tuttis, K. (2016). O corante iodeto de propídio somente consegue entrar em células com membrana rompida, corando o DNA, enquanto o Hoescht também cora DNA, porém, em células viáveis. O diacetato de fluoresceína se acumula no citoplasma de células viáveis que terão o núcleo corado com Hoescht. A suspensão então foi homogeneizada e adicionados 8µL da mistura de fluorocromos recém preparada (concentração final em cultura de 4,0µg/mL de Ho, 7,5µg/mL de DAF e 1,0µg/mL de IP). Após homogeneizar em vórtex, a suspensão foi mantida por 5 minutos a 37°C e protegida da luz. Em seguida, 20µL foram utilizados para a confecção das lâminas. Foram analisadas 200 células por tratamento em microscópio de fluorescência Olympus BX 43 (Olympus Microscopy, Europa) em objetiva de 40X, anotando-se o número de células viáveis, necróticas, apoptóticas iniciais e finais, seguindo o padrão ilustrado na Figura 9.

Figura 9: Padrões considerados para a análise das células PC-3 no ensaio de apoptose/necrose com tripla coloração com Hoechst 33342 (Ho), Diacetato de Fluoresceína (DAF) e Iodeto de Propídio (IP).



Fonte: Katuska Tuttis (2016).

4.4 Quantificação de espécies reativas intracelulares com sonda CM-H₂DCFDA

Para a quantificação de espécies reativas intracelulares uma suspensão de 100µL contendo 1×10^4 células da linhagem PC-3 foi semeada em placas pretas estéreis de 96 poços (PerkinElmer, Massachusetts, EUA) com 4 replicatas técnicas, onde permaneceram por 24 horas em estufa de CO₂ para estabilização. Em seguida foram adicionados 20µL de quatro diferentes concentrações das braquidinas baseadas nos ensaios de viabilidade celular (0,96; 1,5; 3,84 e 6,0µM) e logo depois incubadas por 1, 3, 12 e 24 horas em estufa de CO₂. Para o grupo controle positivo foi adicionado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1mM por 20 minutos. Logo após, foi feita a lavagem das células com PBS e então adicionados 100µL de solução de CM-H₂DCFDA (5µM) em todos os grupos de tratamento e as células incubadas por 30 minutos. A seguir foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro com

excitação entre 492–495 e emissão entre 517–527nm. Os valores obtidos correspondem à absorbância em fluorescência emitida pela sonda.

4.5 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado segundo Tice et al. (2000). Inicialmente 2×10^5 células da linhagem PC-3 foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas em meio de cultura suplementado com 10% soro durante 24 horas. Após o tempo de estabilização o meio foi removido e substituído por meio sem soro mais os respectivos tratamentos em duplicata técnica: controle negativo (PBS), controle positivo [doxorubicina (DXR) a $0,345 \mu\text{M}$] e três concentrações das braquidinas A, B ou C ($1,5$, $3,84$ e $6,00 \mu\text{M}$) baseadas nos ensaios de viabilidade. Os tratamentos foram feitos no tempo de 4 horas para evitar possíveis atividades de reparo celular; após isso, os meios foram removidos, as células lavadas com PBS, tripsinizadas, inativadas com meio completo e centrifugadas durante 5 minutos a 1000rpm. Parte do meio foi descartado e utilizado para: (1) determinar a viabilidade celular pelo ensaio do azul de trypan com $10 \mu\text{L}$ de suspensão celular, utilizando-se o equipamento Countess® Automated Cell Counter (Life Technologies – Carlsbad, EUA), para verificar se os tratamentos utilizados apresentavam no mínimo 70% das células viáveis; e (2) realizar o ensaio do cometa, onde $30 \mu\text{L}$ de suspensão celular foi misturada com agarose *low melting point* a 0,5% e colocadas sobre lâminas previamente revestidas com agarose normal (1,5%). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10) e mantidas por 1h30 a 4°C . Posteriormente, as lâminas foram rapidamente mergulhadas em água destilada e submersas em solução alcalina (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH >13) em uma cuba de eletroforese durante 20 minutos a 4°C . Em seguida, a eletroforese foi conduzida na mesma solução alcalina durante 20 minutos na voltagem de 25V e 300mA constantes. Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (Tris 0,4M e pH 7,5) por 15 minutos. Depois de secarem em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto (99%) por 5 minutos.

Para a análise citológica, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA GelRed™ [1:10.000 v/v (GelRed:PBS)] (Biotium – Fremont, EUA) e examinadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 43 (Olympus Microscopy,

Europa). O experimento foi realizado em duplicata e para cada tratamento foi analisado um total de 300 células. Para captação dos dados foi utilizado o software Comet Imager v2.2 (MetaSystems, Alemanha) e analisados os parâmetros *Tail length* e %DNA.

4.6 Metabolômica

A técnica para analisar o metaboloma intracelular foi a de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H), realizada segundo SILVA et al. (2013). As células PC-3 foram semeadas a 1×10^7 em frascos de 75 cm^3 com meios de cultura suplementados com 10% SBF por 24 horas. Após esse tempo foi feita uma lavagem das células com PBS e em seguida tratadas com as concentrações das braquidinas e os controles na ausência de soro durante 24 horas. Após o tempo de tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS gelado e então retiradas com o auxílio de raspador de células e passadas para tubos de 1,5mL. As células então foram centrifugadas a 4°C , 1500 rpm, por 5 minutos. Após o PBS ter sido removido, foi adicionado ao pellet 250 μL da solução gelada de metanol e clorofórmio na razão 2:1 e então as células foram sonicadas por 1 minuto, duas vezes. Após 15 minutos do primeiro contato com os solventes, 250 μL de clorofórmio e água destilada foram adicionados na razão 1:1. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, 4°C por 20 minutos. Como resultado da centrifugação, duas fases foram formadas nos tubos, a fase superior (metanol e água) foi separada da fase inferior (orgânica) usando seringa de vidro. Ambas as fases foram evaporadas em temperatura ambiente através de alta centrifugação a vácuo (Speed Vac). As amostras foram ressuspensas em 0,6mL de tampão fosfato (pH 7,4) contendo d4-trimetilsililpropionato de sódio (0.625mmol/L) em água deuterada D_2O . O sobrenadante foi transferido para tubo de RMN.

Os espectros foram adquiridos em espectrômetro de RMN Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para ^1H equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5mm. O sinal residual da água dos espectros foi suprimido usando pressaturação. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm. Os espectros foram analisados utilizando-se o software TopSpin 3.5p17.

4.7 Western Blot

Para avaliação da expressão de proteínas, a linhagem celular PC-3 foi semeada em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço), incubada por 24 horas para

estabilização Após esse tempo, as células foram expostas à concentração de 6 μ M de braquidina A e 3,84 μ M das braquidinas A, B e C por 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão contendo Tris (50mM, pH 7,6-8), NaCl (150mM), EDTA (5mM), Na₃VO₄ (1mM), NaF (10mM), Pirofosfato de Na (10mM), NP-40 (1%), suplementado com cocktail contendo: inibidor de protease DTT (1mM), Leupeptina (1 μ g/mL), aprotinina (1 μ g/mL), PSMF (1mM) e EDTA (1mM) por 1 hora. As células foram raspadas da placa e colocadas em tubo de 1,5mL e então centrifugadas a 13000rpm, 15min 4°C e, subsequentemente, o sobrenadante foi estocado a -80°C.

As proteínas solúveis foram quantificadas por Bradford (Sigma) segundo as recomendações do fabricante. Logo após, 20 μ M de proteínas totais foram separadas através de SDS-PAGE poliacrilamida (12 e 15%) e transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) usando o mini Trans-blot® Turbo Transfer System (Biorad). A transferência ocorreu a 25V por 45 minutos em sistema contendo tampão Tris-base (25mM). Para o bloqueio, as membranas foram tratadas com solução de leite em pó (5%) contendo TBS e Tween (0,1%) (TBS-T; pH 7,6) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário correspondente (12h, 4°C) preparados com solução de TBS-T (0,1%) e BSA (5%). Esse ensaio foi realizado em duplicata biológica, com a colaboração do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital do Amor (Barretos – SP).

4.7.1 PROTEÍNAS AVALIADAS

Com o objetivo de identificar se as braquidinas influenciam na proliferação celular, e compreender melhor suas atividades no processo de morte celular, foram avaliadas as expressões de proteínas relacionadas com ciclo, sobrevivência e morte celular. As proteínas utilizadas e suas características principais estão listadas abaixo:

- a) p21 - atua no ciclo celular, inibindo as atividades de ciclinas-CDK2 e CDK4/6 e, portanto, regula o ciclo celular na progressão de G1 para S (SPENCER et al., 2013).
- b) p27 - atua no ciclo inibindo a ativação dos complexos ciclina E-CDK2 e ciclina D-CDK4 (WANDER; ZHAO; SLINGERLAND, 2011).

- c) Phospho-AKT - versão fosforilada de AKT, proteína que participa de diferentes processos celulares: promove sobrevivência inibindo apoptose através de diversos alvos como *BAD* (CARDONE et al., 1998), *c-RAF* (ZIMMERMANN; MOELLING, 1999) e fatores de transcrição (BRUNET et al., 1999); regula o ciclo celular positivamente (DIEHL et al., 1998) e atua no crescimento celular fosforilando diretamente *mTOR* (NAVÉ et al., 1999); regula a síntese de glicogênio (CROSS et al., 1995) e atua no transporte de glicose estimulada por insulina (HAJDUCH; LITHERLAND; HUNDAL, 2001);
- d) PARP clivada - a PARP é envolvida em processos celulares relacionados com reparo de DNA, estabilidade genômica e morte celular programada (HERCEG; WANG, 2001). Durante o processo de apoptose PARP é clivada, por isso é comumente utilizada como marcador de morte celular programada (OLIVER et al., 1998).

Os anticorpos utilizados foram os anti-PARP (que possibilita a detecção de PARP clivada), anti-phosphoAKT, anti-p27 e anti-p21, todos da *Cell Signalling Technology* e diluídos na concentração de 1:1000. As membranas foram então lavadas com solução TBS-T (0,1%) e incubadas com anticorpo secundário. A detecção foi realizada por quimioluminescência (ECL Western Blotting Detection Reagents, RPN2109, GE Healthcare) e o sinal quimioluminescente foi detectado em sistema de fotodocumentação (ImageQuant™ LAS 4000 mini - GE Healthcare). Os resultados foram quantificados por densitometria após análise das bandas no software ImageJ v.1.41. As proteínas pAKT, p27 e p21 foram normalizadas com alfa-tubulina enquanto a PARP clivada foi normalizada com PARP total.

4.8 Migração e Invasão Celular

4.8.1 MIGRAÇÃO 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 8µm numa placa de 24 poços. Na membrana do inserto, foram semeadas $5,0 \times 10^4$ células da linhagem DU145 em meio de cultivo sem soro bovino fetal, contendo também os tratamentos com as braquidinas (3,84 e 6,00µM), o grupo controle negativo (PBS) e o controle do solvente (DMSO 0,5%). A parte de baixo da placa foi preenchida somente com meio de cultivo completo. As células

permaneceram assim por 24 horas; 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-Japão) com objetiva de 40x (aumento de 400x). Após as fotografias, a coloração foi imediatamente removida das células aderidas no inserto utilizando-se ácido acético 10% e feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm para a quantificação dos dados. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica.

4.8.2 INVASÃO TRANSWELL

Também utilizando o sistema transwell, o ensaio de invasão com câmara de Boyden foi utilizado como descrito por TERRANOVA; HUANEN; MARTIN (1986) e ALBINI et al. (1987). Os insertos contendo membrana com poros de 8 μm de diâmetro foram recobertos com matrigel (BD BioCoat™), (KLEINMAN; MARTIN, 2005) e a linhagem DU145 foi semeada ($5,0 \times 10^4$ células) sobre os insertos. Na parte superior da placa, células foram semeadas em meio de cultivo sem soro bovino fetal, contendo também os tratamentos com as braquidinas (6,00 μM), o grupo controle negativo e o controle do solvente. A parte de baixo da placa foi preenchida somente com meio de cultivo completo. As células que possuem capacidade de invasão atravessaram o matrigel e se localizaram na parte inferior da câmara, as que permaneceram na parte superior foram removidas com o auxílio de um cotonete. Após uma lavagem com PBS, as células foram fixadas, coradas e analisadas como descrito para o ensaio de migração. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica.

4.9 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nos experimentos passaram por verificação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk; nos casos em que a hipótese nula foi recusada (ausência de normalidade), os dados passaram por transformação *boxcox* e então novamente verificada sua normalidade. Com hipótese nula aceita, os experimentos realizados sem a utilização de um controle positivo foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguido de Dunnet. Nos experimentos em que foram utilizados um grupo controle positivo foi realizada a Análise de Variância

(ANOVA) seguido de Tukey, com exceção do ensaio do cometa, onde foi realizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

Para avaliar qual braquidina foi mais citotóxica nos ensaios MTT, LDH e vermelho neutro, foi realizado o teste de Análise de Variância de dois fatores seguido de Tukey. Os estudos foram realizados no software gratuito RStudio® Versão 1.1.442 (RStudio, Inc.).

5. RESULTADOS

5.1 Linhagem PC-3

5.1.1 VIABILIDADE CELULAR

5.1.1.1 MTT

A Figura 10 mostra os resultados obtidos no ensaio do MTT realizado em células PC-3 submetidas a tratamento com as braquidinas A, B e C e seus respectivos controles. Braquidina A diminuiu significativamente a porcentagem de células viáveis a partir da concentração de 15,36 μ M, enquanto B e C diminuíram a viabilidade a partir da concentração de 3,84 μ M. Os valores de IC₅₀ foram de 23,41 μ M, 4,28 μ M e 4,44 μ M para, respectivamente, as braquidinas A, B e C.

5.1.1.2 Vermelho neutro

A Figura 11 mostra os resultados obtidos no ensaio do vermelho neutro realizado em células PC-3 submetidas a tratamento com as braquidinas e seus respectivos controles. Braquidinas A e B diminuíram significativamente a porcentagem de células viáveis a partir da concentração de 6 μ M; já a braquidina C diminuiu a viabilidade a partir da concentração de 3,84 μ M.

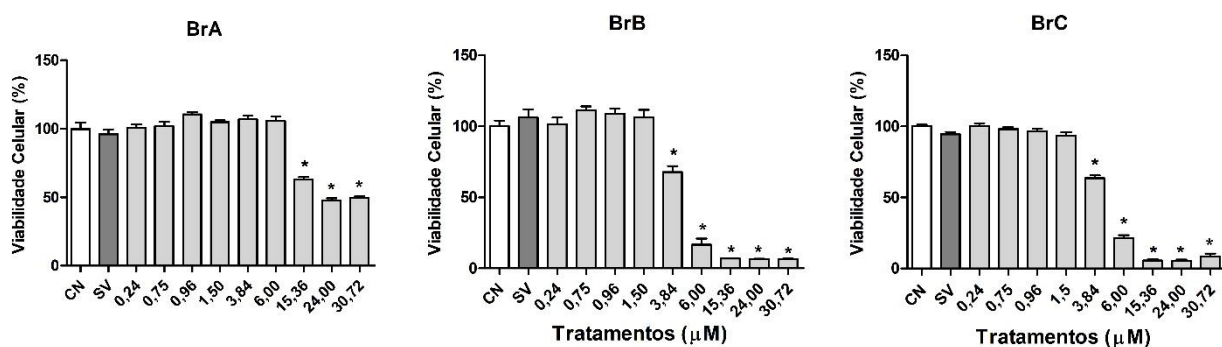
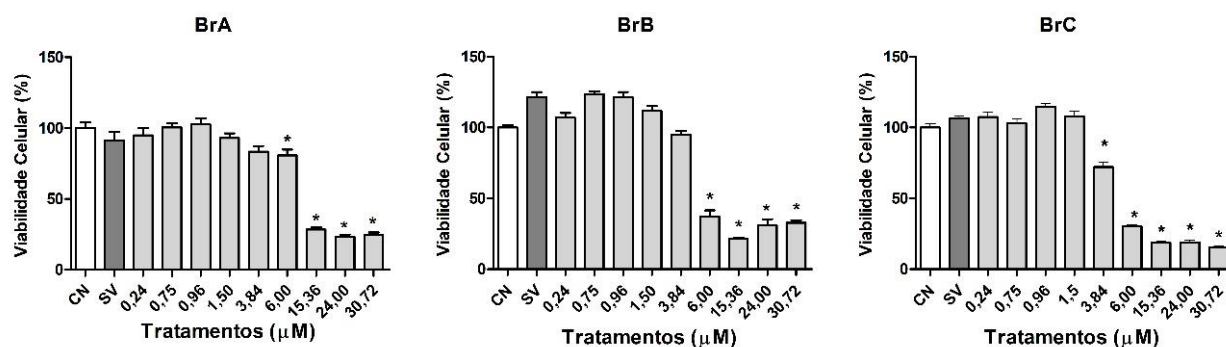


Figura 10: Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do MTT nas células tumorais de próstata (PC-3) após tratamentos por 24 horas com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.

BrA: braquidina A; BrB: braquidina B; BrC: braquidina C; Controle negativo (CN): tampão fosfato salino – PBS; SV: Solvente - DMSO 0,5%. Dados representados por média \pm desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelos testes ANOVA seguido de Dunnett. Fonte: o próprio autor.

Figura 11: Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do vermelho neutro nas células tumorais de próstata (PC-3) após tratamentos por 24 horas com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C

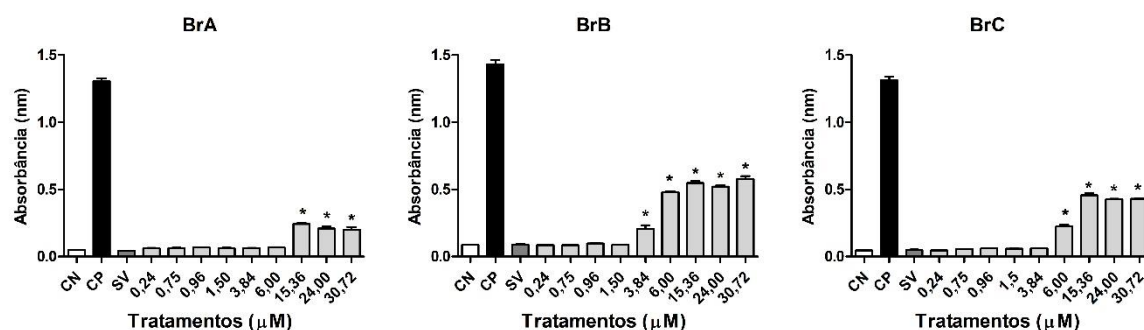


BrA: braquidina A; BrB: braquidina B; BrC: braquidina C; Controle negativo (CN): tampão fosfato salino – PBS; SV: Solvente - DMSO 0,5%. Dados representados por média \pm desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelos testes ANOVA seguido de Dunnett. Fonte: o próprio autor.

5.1.1.3 LDH

A Figura 12 mostra os resultados obtidos no ensaio da enzima LDH em absorbância (nm). Para braquidina A, somente as 3 maiores concentrações indicaram rompimento de membrana; as braquidinas B e C induziram rompimento da membrana a partir das concentrações de 3,84 μM e 6 μM , respectivamente.

Figura 12: Ensaio do LDH após tratamentos das células tumorais de próstata (PC-3) com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.



BrA: braquidina A; BrB: braquidina B; BrC: braquidina C; Controle negativo (CN): tampão fosfato salino – PBS; CP: Controle positivo, reagente de lise (Thermo) - SV: Solvente - DMSO 0,5%. Dados representados por média \pm desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelos testes ANOVA seguido de Dunnett. Fonte: o próprio autor.

5.1.1.4 Comparação entre braquidinas

A Tabela 2 mostra a comparação estatística dos resultados dos testes de citotoxicidade realizados com células PC-3 tratadas com diferentes concentrações de braquidinas. O objetivo desta análise foi comparar as braquidinas quanto aos seus efeitos citotóxicos. Os resultados foram considerados como não citotóxicos: nc ($p \geq 0,05$) ou citotóxicos ($p < 0,05$), assim como a diferença entre as braquidinas dentro das mesmas concentrações ($p < 0,05$).

A análise mostrou que as braquidinas B e C exerceram citotoxicidade em concentrações mais baixas do que a braquidina A. Nas concentrações de 6,00 e 15,36 μM , B e C são igualmente mais citotóxicas que A nos três ensaios realizados (Tabela 2).

Tabela 1: Comparação dos resultados estatísticos obtidos após diferentes ensaios de citotoxicidade em células PC-3 após tratamento com diferentes concentrações das braquidinas.

Ensaio	Concentração da braquidina (μM)				
	3,84	6,00	15,36	24,00	30,72
MTT					
BrA	[nc]	[nc]	[c]	[c]	[c]
BrB	[c] > A,C	[c] > A	[c] > A	[c] > A	[c] > A
BrC	[c] > A	[c] > A	[c] > A	[c] > A	[c] > A
VN					
BrA	[nc]	[c]	[c]	[c]	[c] > B
BrB	[nc]	[c] > A	[c] > A	[c]	[c]
BrC	[c] > A,B	[c] > A	[c] > A	[c]	[c] > A,B
LDH					
BrA	[nc]	[nc]	[c]	[c]	[c]
BrB	[c] > A,C	[c] > A,C	[c] > A	[c] > A	[c] > A,C
BrC	[nc]	[c] > A	[c] > A	[c] > A	[c] > A

BrA(A): braquidina A; BrB(B): braquidina B; BrC(C): braquidina C. ([c]) concentração citotóxica, ([nc]) concentração não citotóxica no ensaio avaliado, (>) estatisticamente diferente e com citotoxicidade maior que. Parâmetros definidos após comparação estatística entre as concentrações de diferentes braquidinas pelos testes ANOVA – Dois Fatores seguido de Tukey. Fonte: o próprio autor.

5.1.1.5 Indução de apoptose/necrose

No ensaio de morte celular as células PC-3 foram tratadas por 24 horas com as braquidinas e os resultados, quando comparados com os do grupo controle

negativo, indicaram que na maior concentração avaliada (6 μ M) braquidina A induziu necrose, enquanto braquidina B induziu necrose e apoptose. Apoptose foi observada nas células tratadas com braquidina C nas três concentrações avaliadas. O controle positivo utilizado, doxorubicina 0,345 μ M, induziu necrose e apoptose.

Tabela 2: Frequência de células tumorais de próstata (PC-3) viáveis, apoptóticas e necróticas após tratamento com três diferentes concentrações de braquidina A, B ou C, e seus respectivos controles.

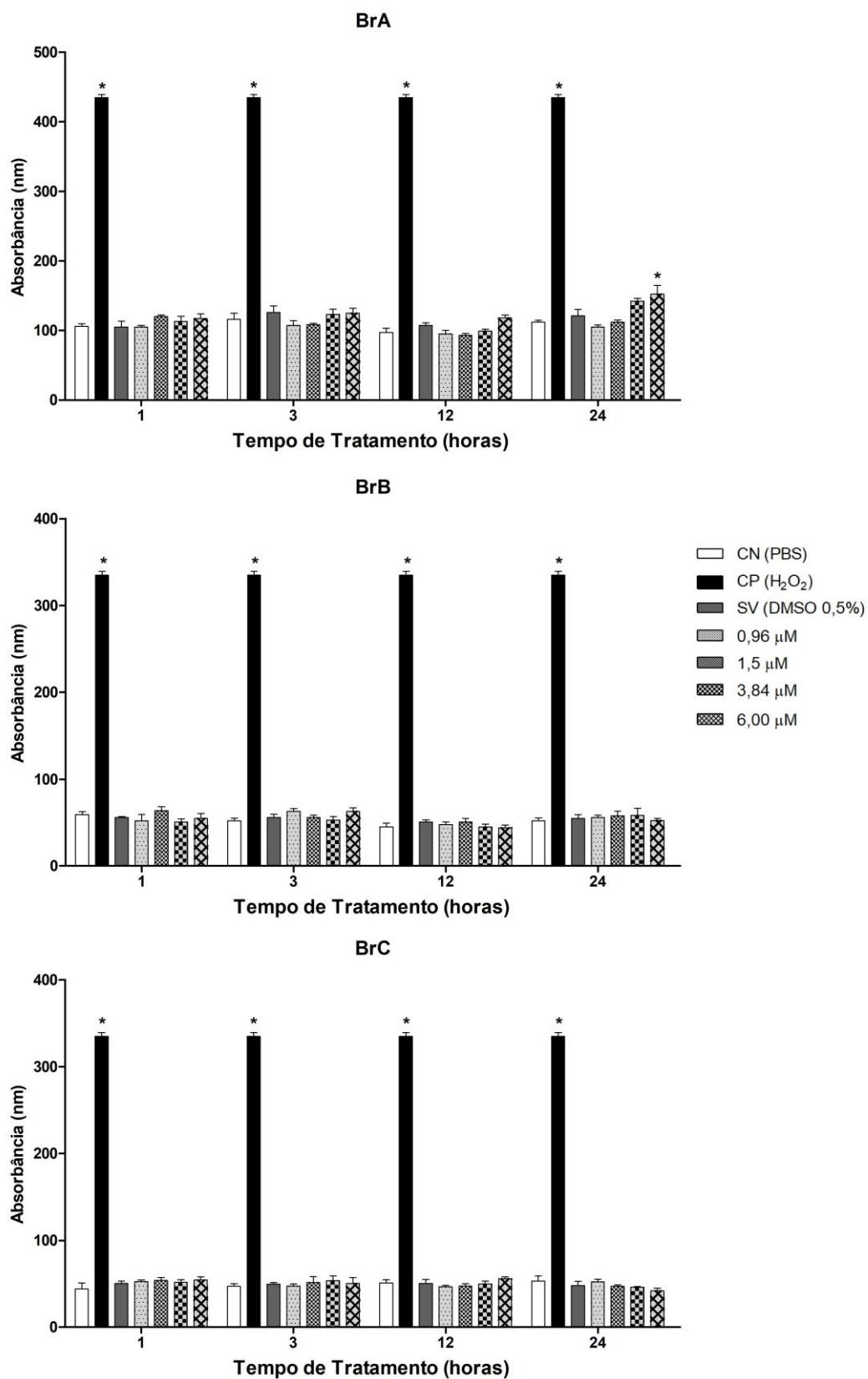
Tratamentos	Células (%)		
	Viáveis	Necróticas	Apoptóticas
CN (PBS)	96,00 \pm 2,00	1,67 \pm 1,53	2,33 \pm 1,53
CP (DXR - 0,345 μ M)	80,33 \pm 1,53*	9,00 \pm 2,65*	10,67 \pm 2,08*
SV (DMSO 10%)	91,67 \pm 2,52	5,00 \pm 1,73	2,00 \pm 1,00
Braquidina A (μM)			
1,5	96,00 \pm 2,65	3,67 \pm 2,08	0,33 \pm 0,58
3,84	94,67 \pm 0,58	4,33 \pm 1,53	1,00 \pm 1,00
6,00	91,67 \pm 2,08	7,00 \pm 2,65*	1,33 \pm 0,58
Braquidina B (μM)			
1,5	81,67 \pm 8,98	14,83 \pm 9,36	3,50 \pm 0,50
3,84	85,50 \pm 3,04	8,17 \pm 2,02	6,33 \pm 1,53
6,00	64,50 \pm 3,50*	17,00 \pm 2,18*	18,50 \pm 3,90*
Braquidina C (μM)			
1,5	90,17 \pm 3,21	1,67 \pm 0,29	8,17 \pm 3,33*
3,84	89,67 \pm 2,25	4,33 \pm 2,02	6,00 \pm 1,50*
6,00	90,00 \pm 1,32	2,33 \pm 0,58	7,67 \pm 1,89*

Controle negativo (CN: PBS - tampão fosfato salino); positivo (CP: DXR-doxorrubicina – 3 μ g/mL) e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%). Dados representados por média \pm desvio padrão. *Valores estatisticamente diferentes do controle negativo (PBS) ($p < 0,05$). ANOVA seguido de Tukey. Fonte: o próprio autor.

5.1.2 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULARES

A Figura 13 exibe os resultados obtidos no ensaio de quantificação de espécies reativas intracelulares utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA. Para braquidina A somente a maior concentração (6,00 μ M) no tempo de tratamento de 24 horas induziu um nível de estresse oxidativo quando comparado com o controle negativo. Esse efeito não foi observado em nenhuma concentração e em nenhum tempo de tratamento para as braquidinas B e C.

Figura 13: Ensaio de quantificação de ERs oxidativo utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA

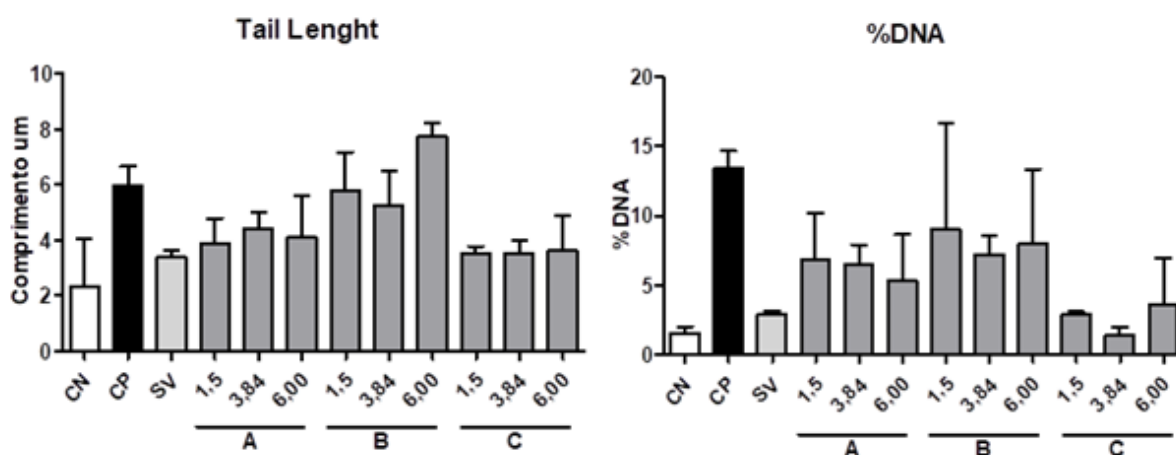


BrA: braquidina A; BrB: braquidina B; BrC: braquidina C; dados representados por média ± desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelos testes ANOVA seguido de Tukey. Fonte: o próprio autor.

5.1.3 GENOTOXICIDADE

A Figura 14 traz os resultados do ensaio do cometa, onde foram avaliados os parâmetros comprimento da cauda (*Tail Length*) e porcentagem de DNA (%DNA) na cauda. Os resultados obtidos com todas as concentrações avaliadas não diferiram estatisticamente daqueles obtidos no grupo controle negativo.

Figura 14: Resultados obtidos no ensaio do cometa para a linhagem PC-3 submetida a três diferentes concentrações de braquidinas e seus respectivos controles.



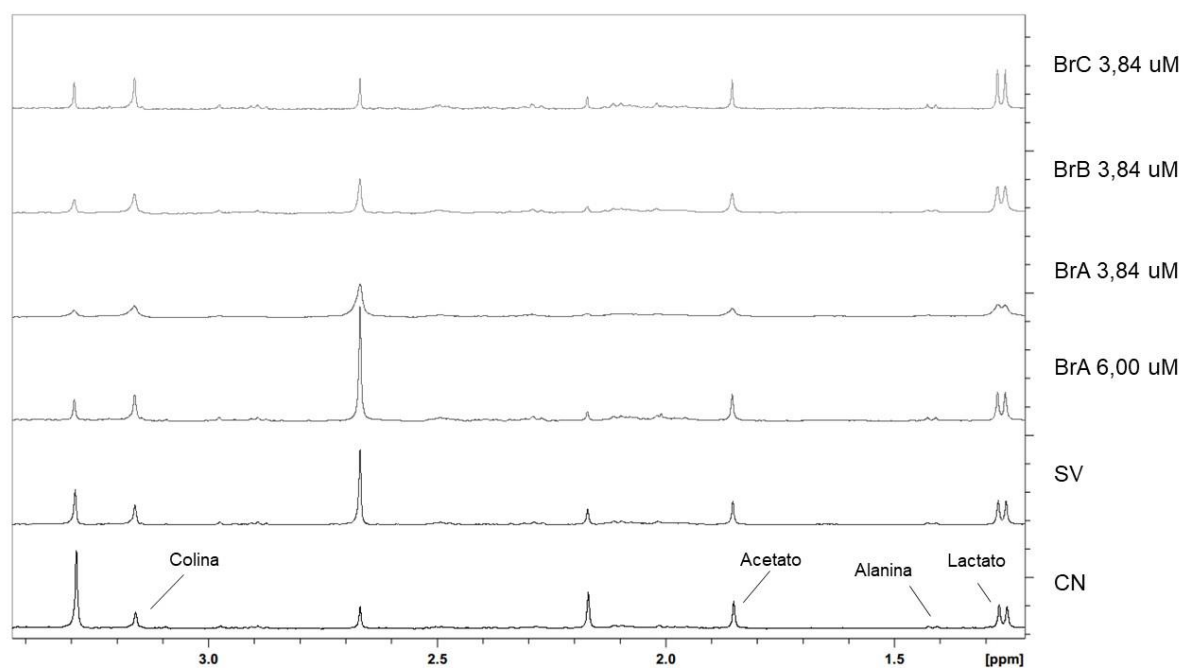
Controle negativo (CN: PBS - tampão fosfato salino); positivo (CP: DXR-doxorrubicina – 3 μg/mL) e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%); A – braquidina A; B – braquidina B e C – braquidina C. Dados representados por média das medianas ± desvio padrão; Kruskal-wallis seguido de Dunn. Fonte: o próprio autor.

5.1.4 METABOLÔMICA

A Figura 15 mostra o espectro obtido de cada amostra individualmente (sem a sobreposição dos espectros), onde foi possível determinar 4 metabólitos: lactato, alanina, acetato e colina. A Figura 16 traz os espectros sobrepostos para comparação da intensidade desses metabólitos contra o controle negativo.

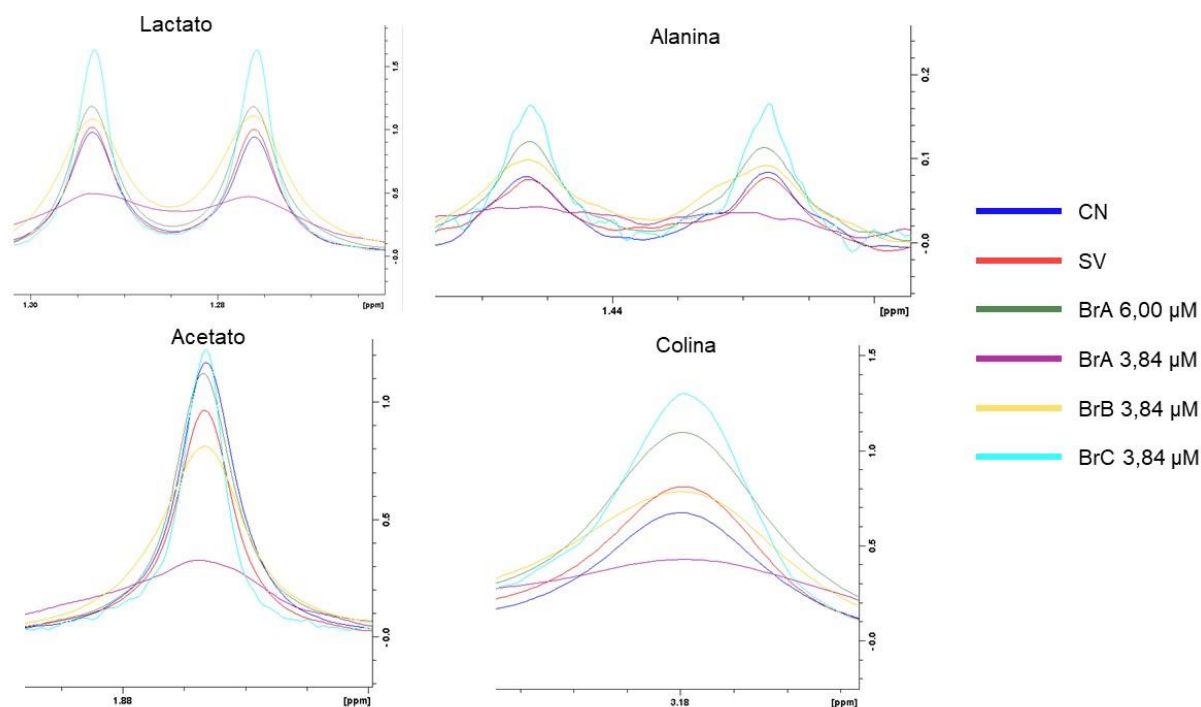
Foi possível detectar uma maior quantidade de lactato, alanina e colina nas células tratadas com braquidina C na concentração de 3,84 μM. Efeito similar foi observado para células tratadas com braquidina A a 6,00 μM. O grupo que recebeu tratamento com a concentração de 3,84 μM de braquidina A foi o que mostrou menos quantidade dos quatro metabólitos identificados. Os que foram tratados com braquidina B a 3,84 μM apresentaram uma diminuição de acetato e um aumento de alanina, lactato e colina.

Figura 15: Representação do perfil metabólico das células PC-3 tratadas com braquidinas e os respectivos controles (negativo e solvente).



Controle negativo (CN: PBS - tampão fosfato salino); e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%); BrA – braquidina A; BrB – braquidina B e BrC – braquidina C.

Figura 16: Sobreposição dos espectros obtidos após tratamento da linhagem PC-3 com as braquidinas A, B ou C e com seus grupos controle negativo e do solvente.

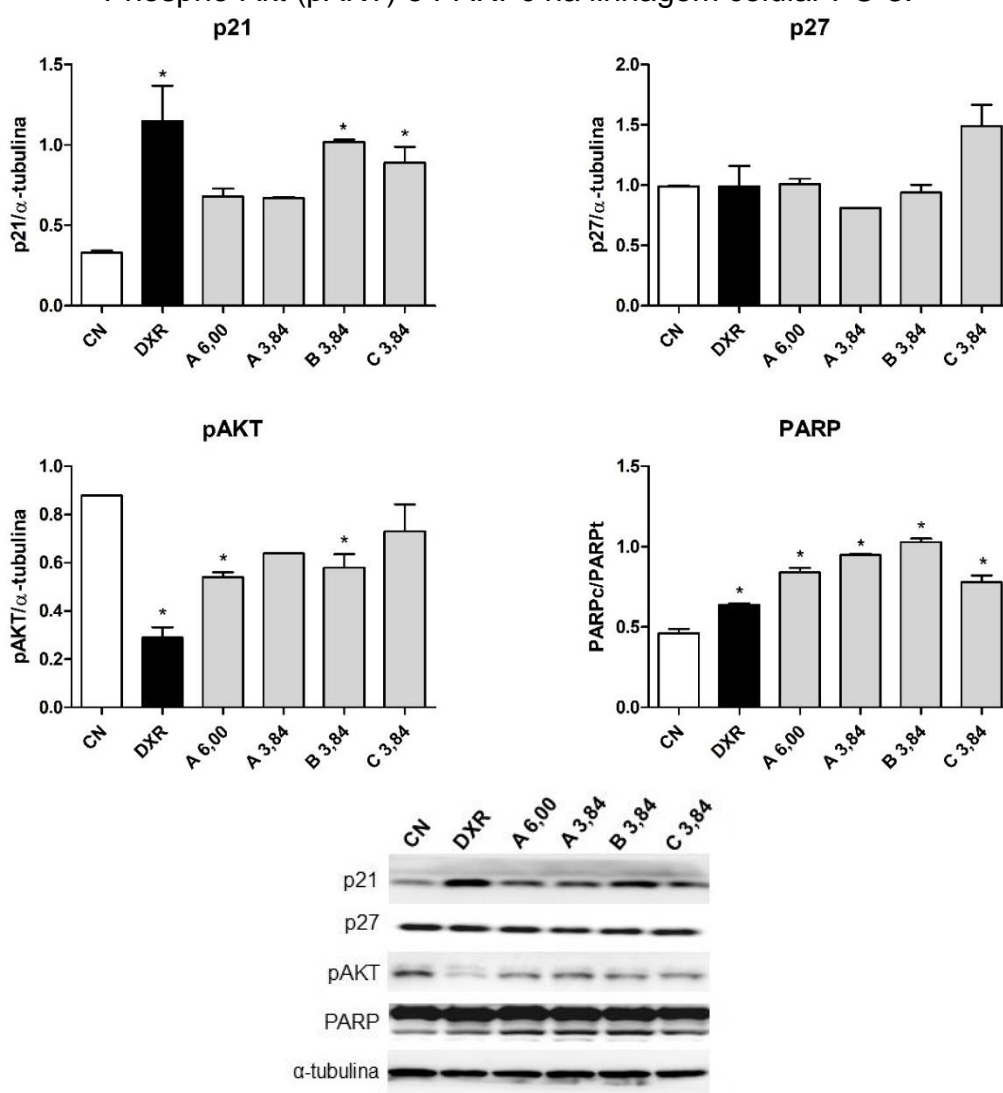


Controle negativo (CN: PBS - tampão fosfato salino); e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%); BrA – braquidina A; BrB – braquidina B e BrC – braquidina C. Fonte: o próprio autor.

5.1.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

A Figura 17 traz os resultados quantitativos do *western blotting* onde foram avaliadas as proteínas p21, p27, AKT fosforilada (fosfo-AKT) e PARP clivada/PARP total. A expressão de p21 aumentou significativamente quando comparados os dados obtidos no grupo controle negativo com os de DXR e com as braquidinas B e C na concentração de 3,84 μ M. Não foi notado aumento ou diminuição estatisticamente significativos para a proteína p27.

Figura 17: Quantificação por densitometria das proteínas p21, p27, Phospho-Akt (pAKT) e PARPc na linhagem celular PC-3.



Controle negativo (DMSO - 0,5%); DXR (doxorubicina 3 μ g/mL); A – braquidina A; B – braquidina B e C – braquidina C. Dados representados por média \pm desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) por ANOVA seguido de Tukey. Fonte: o próprio autor.

Para Phospho-AKT (pAKT) houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos do grupo controle negativo com DXR, braquidina A a 6,00 μ M e braquidina B a 3,84 μ M. A expressão de PARP clivada diminuiu significativamente em relação ao grupo controle negativo em todos os tratamentos utilizados.

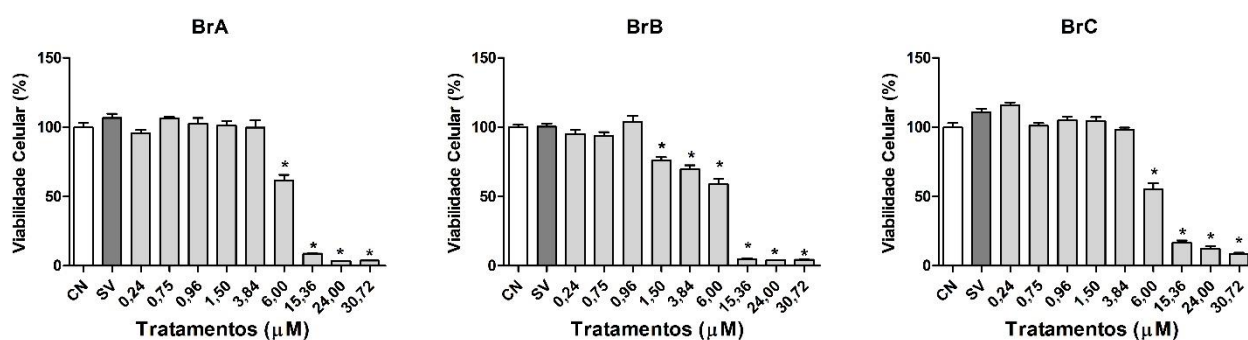
5.2 Linhagem DU145

5.2.1 VIABILIDADE CELULAR

5.2.1.1 MTT

A Figura 18 traz os resultados do ensaio do MTT realizado com a linhagem celular DU145. Braquidina A e C diminuíram significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 6,00 μ M, enquanto que com braquidina B esse efeito foi observado a partir da concentração de 1,50 μ M. Os valores de IC₅₀ calculados para as braquidinas A, B e C foram, respectivamente, 6,75 μ M, 6,69 μ M e 7,06 μ M.

Figura 18: Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do MTT nas células tumorais de próstata (DU145) após tratamentos por 24 horas com diferentes concentrações das braquidinas A, B ou C.

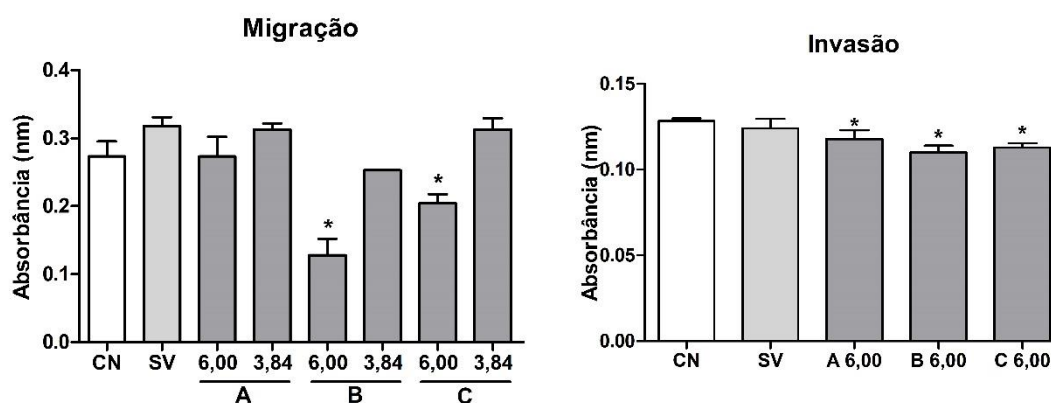


BrA: braquidina A; BrB: braquidina B; BrC: braquidina C; Controle negativo (CN): tampão fosfato salino – PBS; SV: Solvente - DMSO 0,5%. Dados representados por média \pm desvio padrão. *Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$) pelos testes ANOVA seguido de Dunnett. Fonte: o próprio autor.

5.2.2 MIGRAÇÃO E INVASÃO

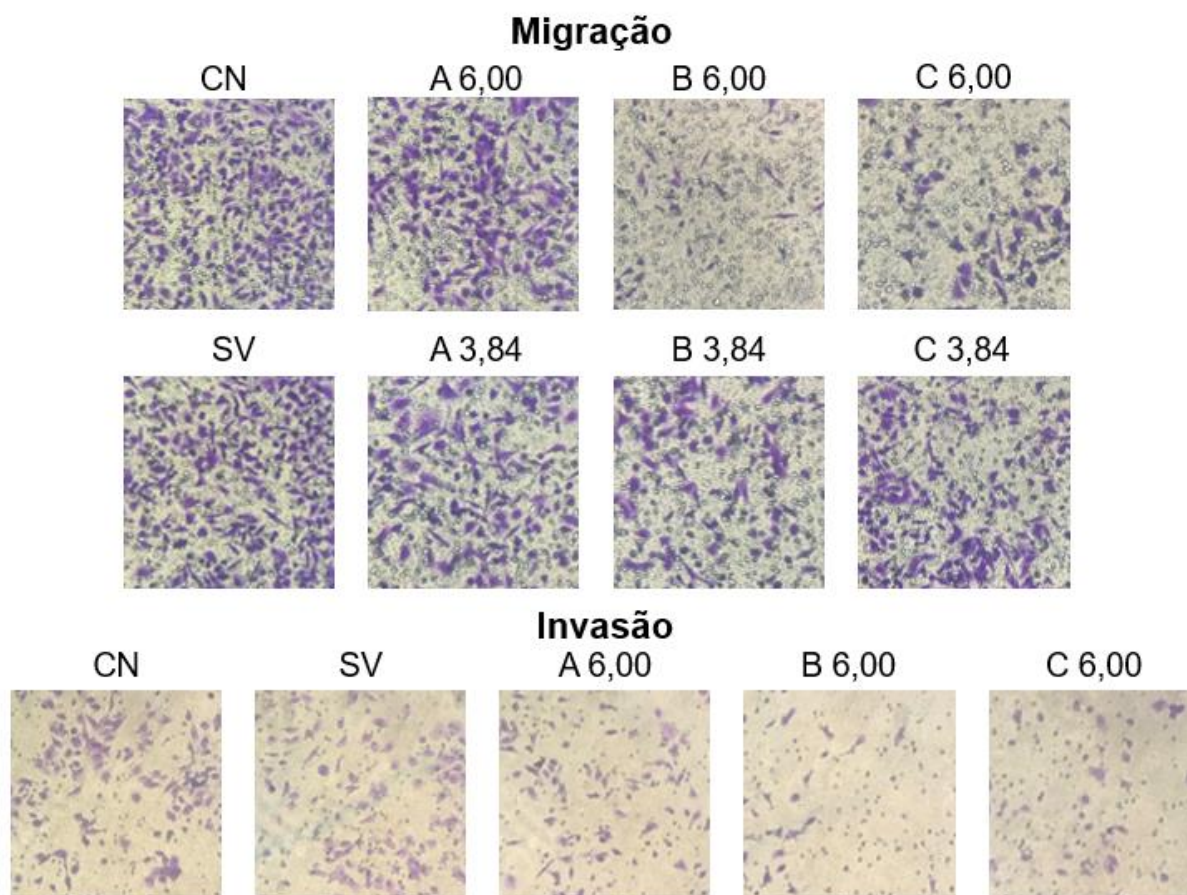
A Figura 19 mostra os resultados obtidos nos ensaios de migração e invasão utilizando o sistema *transwell*. A concentração de 6,00 μ M das braquidinas B e C foi capaz de diminuir a migração das células da parte superior para a inferior do inserto. Quando analisando a invasão, as três braquidinas na concentração de 6,00 μ M foram capazes de diminuir significativamente esse processo.

Figura 20: Migração e invasão, mensurada por absorbância, da linhagem DU145 após tratamento com as braquidinas.



Controle negativo (CN: PBS - Tampão fosfato salino); positivo (CP: DXR-doxorrubicina – 3 µg/mL) e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%); A – braquidina A; B – braquidina B e C – braquidina C; concentrações em µM. Dados representados por média ± desvio padrão. ANOVA seguido de Tukey. Fonte: o próprio autor.

Figura 19: Fotomicrografia (30X) dos inserts após migração/invasão da linhagem DU145 e seus respectivos tratamentos corados com cristal violeta.



Controle negativo (CN: PBS - tampão fosfato salino); e solvente (SV: Solvente, dimetilsulfóxido(DMSO) 0,5%); A – braquidina A; B – braquidina B e C – braquidina C; concentrações em µM. Fonte: o próprio autor.

6. DISCUSSÃO

O interesse em desenvolver produtos medicinais derivados de plantas aumentou significativamente em todo o mundo a partir do século dezenove e atualmente novos fármacos podem ser produzidos graças ao avanço da química medicinal (TACKLIND et al., 2012). A descoberta de novos fármacos isolados de plantas com potencial terapêutico, como por exemplo o Taxol, confirma a presença desses compostos em espécies vegetais e assim estimula novas pesquisas buscando por possíveis fitofármacos a serem utilizados na terapia do câncer.

Com os resultados obtidos no presente estudo com as braquidinas foi possível determinar quais concentrações são ou não citotóxicas para células tumorais de próstata humana (PC-3 e DU145) e definir limites mínimos para a citotoxicidade desses polifenóis. As IC_{50} calculadas no presente estudo para as braquidinas B (6,69 μ M) e C (7,06 μ M) em células DU-145 são muito semelhantes àquelas observadas em *T. cruzi* (B: IC_{50} 6,0 μ M e C: IC_{50} 6,8 μ M) por Da Rocha et al. (2014), mesmo que tenham sido realizados ensaios com organismos diferentes.

A interrupção do ciclo celular e o processo de apoptose limitam a progressão do câncer e por isso são importantes parâmetros quando identificados em células tumorais submetidas a potenciais fármacos a serem empregados na quimioterapia.

A proteína AKT está envolvida na cascata de sinalização *PI3K/AKT/mTOR*, regulando processos como quiescência, proliferação e longevidade da célula (KING; YEOMANSON; BRYANT, 2015). Braquidina A (6,00 μ M), e braquidina B (3,84 μ M), reduziram significativamente a expressão de phospho-AKT, indicando uma possível parada no ciclo e no crescimento celular, e também diminuição de processos metabólicos que favorecem a apoptose.

As braquidinas B e C na concentração de 3,84 μ M parecem ser capazes de interferir negativamente no ciclo celular, pois induziram um aumento da expressão de p21 que impede a formação dos complexos ciclinas-CDK2 e CDK4/6, podendo levar à inibição do ciclo celular nas fases G1/S e G1, respectivamente. No entanto, como a expressão da proteína p27, inibidora de CDK2, não foi alterada pelos tratamentos com nenhuma das três braquidinas, podemos presupor que o complexo ciclina-CDK2 não foi inibido, e que o aumento da proteína p21 teve como alvo o complexo ciclina-CDK4/6 induzindo uma parada em G1. Estes indícios terão que ser confirmados com estudos de citometria de fluxo.

A hipótese de que a diminuição na expressão da proteína phospho-AKT e aumento da p21 observadas no ensaio *western blot* poderiam influenciar a proliferação e morte das células PC-3 é corroborada pelos resultados obtidos com braquidina A (6,00 μ M) no ensaio vermelho neutro e com braquidina B (3,84 μ M) no ensaio MTT, ambos ensaios influenciados pelos eventos de proliferação e morte celular.

PARP é uma proteína envolvida em processos celulares como reparo de DNA, estabilidade genômica e morte celular programada (MORALES et al., 2014). Todas as braquidinas, nas concentrações avaliadas, induziram um aumento significativo de PARP clivada em relação a PARP total. Isto indica que as células estariam passando por um processo de apoptose, pois PARP clivada é comumente utilizada como marcador de morte celular programada.

O ensaio da enzima LDH indica diretamente morte celular devido ao extravasamento da lactato desidrogenase para o meio extracelular quando a membrana é rompida. Como nesse ensaio está envolvida a análise da integridade da membrana celular, podemos afirmar que a partir das concentrações de 15,36 μ M, 3,84 μ M e 6,00 μ M das braquidinas A, B e C, respectivamente, houve indução de algum processo de morte onde há rompimento de membrana, como por exemplo, necrose, necroptose, piroptose e apoptose tardia/necrose secundária

Os resultados obtidos no ensaio de morte com as células tratadas com as braquidinas B e C, somados aos dados obtidos no ensaio LDH e ao aumento da expressão das proteínas p21 e PARP e redução de Phospho-AKT no ensaio *western blotting*, reforçam a hipótese dessas braquidinas serem indutoras de morte para células tumorais de próstata humana.

Estes resultados de morte celular corroboram dados ainda não publicados do laboratório de Mutagênese e Oncogenética (SERPELONI et al., 2013) onde o extrato etanólico das folhas de *F. platyphylla* induziu necrose em células primárias de estômago normais (GAS) e tumorais (ACP02). Como as braquidinas foram obtidas a partir de extratos da mesma planta, a análise conjunta dos resultados reforça o efeito necrótico para células humanas *in vitro* de compostos presentes nas folhas e na raiz desta planta. No entanto, este não é um resultado interessante para a caracterização de um fitoterápico, uma vez que este tipo de morte pode causar danos às células adjacentes, devido às células afetadas não conseguirem manter a

integridade de sua membrana durante a necrose e extravasarem seu conteúdo (WALLACH et al., 2016).

Ainda é importante destacar que no ensaio de morte celular foram identificadas diferentes respostas das três braquidinas, com pouca diferença entre “A” e “B”. Levando-se em conta que a diferença entre as três moléculas é em um radical e que braquidina A induziu somente necrose, braquidina B apoptose e necrose e braquidina C apenas apoptose, podemos imaginar que essas respostas distintas se devam às diferenças estruturais das braquidinas. Para se comprovar isso serão necessários estudos para identificar se o grupo hidroxila (braquidina A) e o grupo metoxil (que confere um caráter mais lipofílico à braquidina B), influenciam o processo de morte celular, desviando a apoptose para a necrose, ou até mesmo para uma necroptose.

Os resultados obtidos no ensaio com a sonda CM-H₂DCFDA permitem afirmar que as braquidinas não alteram a quantidade de ERs nas células PC-3 e, portanto, não alteraram o estado redox. O fato de somente uma concentração de braquidina A (6,00µM), no maior tempo de tratamento (24 horas) ter induzido um aumento de ERs, somado aos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, onde esta braquidina induziu necrose nesta mesma concentração, indicam que o estresse oxidativo pode estar de alguma forma relacionado com o esse tipo de morte (CHOI et al., 2009), mas experimentos adicionais são necessários para confirmação.

O fato de não ter sido detectado aumento de espécies reativas após tratamento das células PC-3 com a maioria das concentrações testadas das tres braquidinas, somado ao fato do estresse oxidativo ser um indutor de danos no material genético, leva ao pressuposto de ausência de genotoxicidade. Isto foi confirmado com os resultados do ensaio cometa, onde nenhuma concentração das braquidinas induziu genotoxicidade. Portanto, podemos caracterizá-las como não genotóxicas neste sistema-teste. Do mesmo modo, podemos confirmar que a morte celular observada para essa linhagem não está sendo causada nem por danos no material genético, nem por estresse oxidativo.

A ausência de genotoxicidade sugere ausência de mutagenicidade. No presente estudo este último parâmetro não foi avaliado em células eucariontes. As três braquidinas foram avaliadas isoladamente por Resende et al. (2017) pelo teste de Ames e não induziram mutações em *Salmonella typhimurium*. Estes autores mostraram que três diferentes extratos obtidos de folhas, raízes e caules de

Fridericia platyphylla foram mutagênicos no mesmo ensaio, sugerindo que deva haver algum tipo de sinergismo entre os fitoquímicos quando presentes nos extratos, que induz mutagenicidade, pois quando isolados, os fitoquímicos não mantêm esta capacidade mutagênica.

A identificação dos potenciais genotóxico e mutagênico é decisiva na avaliação do perigo de novos compostos e os resultados do presente estudo somados aos de Resente et al. (2017) podem auxiliar a agência reguladora brasileira para indicação de uma ou mais braquidinas para uso terapêutico. A concentração-limite de citotoxicidade encontrada neste estudo, assim como os valores de IC₅₀, podem ser utilizados em ensaios subsequentes, auxiliando na avaliação de outras atividades biológicas das braquidinas.

Resende et al. (2017) não observaram interação das braquidinas com receptores de estrógeno; porém, tal efeito foi observado para os extratos de raízes e para o extrato de folhas. Ainda há poucos estudos na literatura com os extratos de *F. platyphylla*, ou mesmo com as braquidinas, e alguns relataram atividades benéficas, como Da Rocha et al. (2011) e Rodrigues et al. (2017). Os primeiros avaliaram a atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e redução da parasitemia sanguínea em ensaio *in vivo*, enquanto Rodrigues et al. (2017), avaliando uma mistura das três braquidinas, verificaram alívio de dor aguda em camundongos *in vivo*.

A análise do perfil metabólico é capaz de melhorar a investigação da efetividade de novas drogas com alvos conhecidos, assim como auxiliar no descobrimento dos mecanismos de ação de drogas com seus alvos ainda desconhecidos (CUPERLOVIC-CULF; CULF, 2016). Aparentemente, a única braquidina que influenciou no metabolismo celular foi a braquidina C, que induziu um aumento nos níveis de lactato das células PC-3. Isto pode estar relacionado a um aumento na fonte de energia, pois este metabólito está diretamente ligado à glicólise. Um alto nível de lactato também pode estar relacionado a processos inflamatórios de tumores, funcionando como molécula sinalizadora, estimulando a angiogênese (DOHERTY; CLEVELAND, 2013). A quantidade de colina também foi alterada, porém, não há relatos na literatura de que um aumento de colina esteja relacionado a algum processo negativo para a célula, pelo contrário, a diminuição da mesma pode estar relacionada a dano no DNA, processos necróticos ou apoptóticos (DA COSTA et al., 2004, 2006).

Por ser tóxica em concentrações menores quando comparada às outras braquidinas (e conseqüentemente permitir a utilização de menores quantidades de matéria-prima nos ensaios biológicos), e também possuir uma resposta significativa na maioria dos ensaios realizados, braquidina B se mostrou mais promissora para dar continuidade futuramente à pesquisa em relação a quais são seus alvos moleculares.

Na busca por compostos que são potenciais agentes anticâncer também é investigada sua capacidade de inibir ou diminuir a metástase de células tumorais. Assim, analisando a motilidade de células DU-145 submetidas a tratamento com 6 μ M de braquidinas, foi observada diminuição significativa da migração (braquidinas B e C) e diminuição da invasividade (braquidinas A, B e C) dessas células quando comparadas às do controle negativo.

Se levarmos em consideração que a linhagem PC-3, assim como a linhagem DU145, são derivadas de células de próstata e fizermos um paralelo entre os resultados observados para a linhagem DU145 com os dados dos testes de citotoxicidade e expressão das proteínas p21 e phospho-AKT para PC-3, é arriscado dizer que as braquidinas influenciaram diretamente na migração/invasão das células DU145, pois este efeito pode ter sido devido a resultados semelhantes aos descritos acima para PC-3. Isto merece e deverá ser investigado futuramente. No entanto, o resultado não deixa de ser importante, pois sugere a possibilidade das braquidinas serem estudadas em vias que envolvam a metástase, afim de avaliar seus efeitos antimetastáticos, importante parâmetro na pesquisa por fármacos que possam ser utilizados para tratamento de câncer.

Com o objetivo de discutir possíveis atividades biológicas das braquidinas, realizamos uma pesquisa utilizando o banco de dados público PubChem do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), e encontramos 1330 moléculas com similaridade estrutural $\geq 90\%$ às braquidinas. Destas, 101 já foram testadas em bio-ensaios e 44 delas se mostraram ativas. Nesta pesquisa apenas uma molécula foi classificada como fitoestrógeno (4'-Metoxi-7-isoflavanol, *PubChem Compound Identification Number* – CID: 23652247). Das 44 moléculas ativas nos bio-ensaios, foram selecionadas nove que já possuem um nome, ou seja, não são apenas representadas por códigos de banco de dados, fórmulas ou nome IUPAC, sendo todas essas de origem vegetal.

A maioria das moléculas ativas, como Licoricidin (CID: 480865) e Glyaspecin D (CID: 480860), apresentou atividade citotóxica para linhagens tumorais, como HepG2 (fígado), MCF-7 (mama), A549 (pulmão) e SV480 (côlon) ou para linhagem normal de macacos Vero (renal), como Glyasperin C (CID: 480859). Em relação à proliferação celular, há duas moléculas semelhantes às braquidinas com atividades divergentes. Erycibenin E (CID: 16093658) foi antiproliferativa para linhagem tumoral de linfócitos e Vestitol (CID: 182259) estimulou a proliferação de células tumorais T-47D (mama).

Os dados acima citados mostram similaridades com o perfil citotóxico para linhagens celulares tumorais, exceto Vestitol, que induziu a proliferação das células tumorais. Algumas moléculas similares às braquidinas também apresentaram atividade contra patógenos, assim como relatado por Da Rocha et al. (2014) a atividade anti tripomastigotas das braquidinas. Não foram relatadas atividades genotóxicas, mutagênicas ou indução de ERs para essas moléculas, assim como no presente estudo, em que observamos ausência desses efeitos das braquidinas.

Tabela 3: Resumo do estudo feito no banco de dados público PubChem comparando moléculas semelhantes com as braquidinas .

	Moléculas similares (PubChem)	Braquidinas	Referência (braquidinas)
Perfil tóxico (linhagens tumorais)	✓	✓	Presente estudo
Atividade contra patógenos	✓	✓	Da Rocha et al., 2014
Genotoxicidade	X	X	Presente estudo
Mutagenicidade	X	X	Resende et al., 2017
Indução de espécies reativas	X	X	Presente estudo

✓ presença de efeito, X ausência de efeito. **Fonte:** o próprio autor.

7. CONCLUSÕES

Os ensaios de viabilidade/citotoxicidade realizados no presente estudo indicaram que os flavonoides braquidinas A, B e C, obtidos do extrato das raízes de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann induzem citotoxicidade em linhagens celulares de próstata humana, mesmo em concentrações baixas. Neste estudo também foi possível definir limites mínimos de citotoxicidade para ambas as linhagens celulares utilizadas, PC-3 e DU145.

Na linhagem PC-3 as braquidinas não interferiram na concentração de ERs intracelulares e também não foram genotóxicas. A citotoxicidade induzida, conforme observado em nos ensaios LDH, MTT e vermelho neutro, levou à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose, efeito também relacionado à maior presença de PARP clivada. As braquidinas diminuíram a expressão das proteínas phospho-AKT e aumentaram a de p21, indicando uma influência negativa sobre o ciclo celular, porém não interferiram na expressão de p27.

Para avaliar se as braquidinas poderiam interferir no processo metastático das células DU145, foi aplicado o ensaio que avalia a capacidade migratória e invasiva em sistema *transwell*, mostrando que as braquidinas podem influenciar na motilidade das células. No entanto, tal fato precisa ser confirmado com experimentos futuros.

A citotoxicidade das braquidinas pode também ser confirmada por meio da comparação computacional com moléculas similares em bancos de dados público, as quais também possuem perfil citotóxico e atividade contra patógenos.

Estudos posteriores ainda precisam ser realizados para aprimoramento dos efeitos observados nos estudos do perfil metabólico, assim como análises de maior número de proteínas no ensaio western blot, para melhor definir os mecanismos de ação das braquidinas em células tumorais de próstata humana.

REFERÊNCIAS

- AKANDE, K. E. et al. Major antinutrients found in plant protein sources: Their Effect on Nutrition. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 827–832, 1 ago. 2010.
- ALBINI, A. et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer research**, v. 47, n. 12, p. 3239–45, 15 jun. 1987.
- ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182–196, 1 fev. 2017.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 1 dez. 2015.
- ATES, G. et al. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. In: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: Cell Viability Assays**. Cell Viabi ed. New York, NY: Humana Press, 2017. v. 1601p. 19–26.
- AURIN, M. Chasing the dragon: the cultural metamorphosis of opium in the United States, 1825-1935. **Medical Anthropology Quarterly**, v. 14, n. 3, p. 414–441, set. 2000.
- BADDINI, A. L. Q.; NETTO, A. D. P.; TEIXEIRA, V. L. Metabolomics Based on ¹H NMR and partial least squares-discriminant analysis. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 2, p. 396–415, jan. 2014.
- BENIGNI, R.; BOSSA, C.; TCHEREMENSKAIA, O. Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 5, p. 2940–2957, 8 maio 2013.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, n. SUPPL., p. 127–152, 2005.
- BHAGAT, J. Combinations of genotoxic tests for the evaluation of group 1 IARC carcinogens. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 81–99, 11 jul. 2017.
- BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 115, n. 3, p. 453–66, 1962.
- BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 115, n. 3, p. 453–66, 28 fev. 1962.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014**. 9 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 230 p., 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445–448, 2002.

BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–68, 19 mar. 1999.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–99, jun. 2011.

CAMPOS-VEGA, R.; DAVE OOMAH, B. Chemistry and Classification of Phytochemicals. In: **Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction**. Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 5–48.

CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5392, p. 1318–21, 13 nov. 1998.

CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 11, p. 26–32, jun. 2007.

CHANDRASEKHAR, K. et al. A short review on proteomics and its applications. **International Letters of Natural Sciences**, v. 17, p. 77–84, jun. 2014.

CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 18, jul. 2018.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P. P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 3, p. 183–196, 1 abr. 2010.

CHOI, K. et al. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. **Current neurovascular research**, v. 6, n. 4, p. 213–22, nov. 2009.

COLELLA, R.; JACKSON, T.; GOODWYN, E. Matrigel® invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 79, n. 3–4, p. 121–127, 12 jun. 2004.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 26 mar. 2004.

CROAKER, A. et al. Carcinogenic potential of sanguinarine, a phytochemical used in 'therapeutic' black salve and mouthwash. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 774, p. 46–56, 1 out. 2017.

CROSS, D. A. E. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785–789, 28 dez. 1995.

CUPERLOVIC-CULF, M.; CULF, A. S. Applied metabolomics in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 8, p. 759–770, 2 ago. 2016.

DA COSTA, K. A. et al. Elevated serum creatine phosphokinase in choline-deficient humans: mechanistic studies in C2C12 mouse myoblasts. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 163–170, 1 jul. 2004.

DA COSTA, K. A. et al. Choline deficiency increases lymphocyte apoptosis and DNA damage in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 88–94, 1 jun. 2006.

DA ROCHA, C. Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396–401, 27 jan. 2011.

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, maio 2014.

DA ROCHA, C. Q. et al. Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93–105, 1 mar. 2017.

DADASHPOUR, M. et al. Emerging Importance of Phytochemicals in Regulation of Stem Cells Fate via Signaling Pathways. *Phytotherapy Research*, v. 31, n. 11, p. 1651–1668, 31 ago. 2017.

DEL BELLO, F. et al. Chemical manipulations on the 1,4-dioxane ring of 5-HT_{1A} receptor agonists lead to antagonists endowed with antitumor activity in prostate cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 461–473, 15 abr. 2019.

DIEHL, J. A. et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. **Genes & development**, v. 12, n. 22, p. 3499–511, 15 nov. 1998.

DIEPENBRUCK, M.; CHRISTOFORI, G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? *Current Opinion in Cell Biology*, v. 43, p. 7–13, 2016.

DILLON, L. W.; BURROW, A. A.; WANG, Y. H. DNA instability at chromosomal fragile sites in cancer. **Current genomics**, v. 11, n. 5, p. 326–37, ago. 2010.

DOHERTY, J. R.; CLEVELAND, J. L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3685–3692, 3 set. 2013.

DUNN, W. B. et al. Integration of metabolomics in heart disease and diabetes research: current achievements and future outlook. **Bioanalysis**, v. 3, n. 19, p. 2205–2222, out. 2011.

EFFERTH, T. et al. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50284–50304, jul. 2017.

ELGASS, S.; COOPER, A.; CHOPRA, M. Lycopene treatment of prostate cancer cell lines inhibits adhesion and migration properties of the cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 9, p. 948–954, jul. 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

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, 1 mar. 2015.

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, jan. 2015.

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, jan. 2006.

FRIEDL, P.; WEIGELIN, B. Interstitial leukocyte migration and immune function. **Nature immunology**, v. 9, n. 9, p. 960–9, set. 2008.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. **Journal of Cell Biology**, v. 188, n. 1, p. 11–19, 2010.

FUKUMASU, H. et al. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 2, p. 49, 2008.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 mar. 2018.

GARCIA-ESQUINAS, E. et al. Arsenic exposure and cancer mortality in a US-Based prospective cohort: the strong heart study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 11, p. 1944–1953, nov. 2013.

GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. **Methods in Molecular Biology: Cell Viability Assays**. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1601

GLOUSHANKOVA, N. A.; RUBTSOVA, S. N.; ZHITNYAK, I. Y. An *in vitro* system to study the epithelial–mesenchymal transition *in vitro*. In: **Methods in Molecular Biology**, v. 1749p. 29–42, 2018.

GONZÁLEZ, B. et al. Chemical composition and biological activity of extracts from *Arrabidaea bilabiata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 287–290, 2000.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006.

HAJDUCH, E.; LITHERLAND, G. J.; HUNDAL, H. S. Protein kinase B (PKB/Akt) - a key regulator of glucose transport? **FEBS letters**, v. 492, n. 3, p. 199–203, 16 mar. 2001.

HAJIAGHAALIPOUR, F. et al. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. **Food Chemistry**, v. 169, p. 401–410, 15 fev. 2015.

HALLIWELL, B. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 341–347, 15 jan. 2007.

HATTEN, M. E. Central nervous system neuronal migration. **Annual review of neuroscience**, v. 22, p. 511–39, 1999.

HEIJINK, A. M.; KRAJEWSKA, M.; VAN VUGT, M. A. T. M. The DNA damage response during mitosis. **Mutation Research**, v. 750, n. 1, p. 45–55, 2013.

HERCEG, Z.; WANG, Z. Q. Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. **Mutation research**, v. 477, n. 1–2, p. 97–110, 2 jun. 2001.

HOSOOKA, T. et al. Inhibition of the motility and growth of B16F10 mouse melanoma cells by dominant negative mutants of Dok-1. **Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 16, p. 5437–5446, 2001.

JOHNSON, I. T. Phytochemicals and cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, p. 207–215, 30 maio 2007.

KAEHLER, M. *Fridericia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113348>>. Acesso em 14 Jul. 2018.

KANG, S. H. et al. Recent advances in *in vivo* genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **Journal of cancer prevention**, v. 18, n. 4, p. 277–88, dez. 2013.

KELLER, R. Cell migration during gastrulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 5 SPEC. ISS., p. 533–541, 2005.

KERR J. F. R.; WYLLIE A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, v. 181-185, p. 471-474, 2002.

KHANJANI, N.; JAFARNEJAD, A. B.; TAVAKKOLI, L. Arsenic and breast cancer: a systematic review of epidemiologic studies. **Reviews on Environmental Health**, v. 0, n. 0, 11 jan. 2017.

KING, D.; YEOMANSON, D.; BRYANT, H. E. PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 37, n. 4, p. 245–251, maio 2015.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 378–386, 2005.

KRAMER, N. et al. *In vitro* cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, jan. 2013.

KREISEDER, B. et al. α -Catulin downregulates E-cadherin and promotes melanoma progression and invasion. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 3, p. 521–530, 2013.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of the methanol extracts of *Elephantopus mollis*, *Kalanchoe crenata* and 4 other Cameroonian medicinal plants towards human carcinoma cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 280, 25 dez. 2017.

KUMAR, D. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy for metabolic profiling of medicinal plants and their products. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 400–412, 2016.

KUMAR, M. et al. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 531–63, ago. 2016.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western Blotting: An Introduction. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Western Blotting: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology**. 1312. ed. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 17–30.

LAST, R. L.; JONES, A. D.; SHACHAR-HILL, Y. Towards the plant metabolome and beyond. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 167–174, 2007.

LEE, Y. J.; SHACTER, E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 28, p. 19792–19798, 1999.

LEITE, J. P. V et al. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2307–2309, 2006.

LELLI, J. L. et al. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 6, p. 694–702, 1998.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 1 dez. 2004.

LIU, S. X. et al. Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1643–1648, 13 fev. 2001.

LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 171–182, 2008.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating *in vitro* DNA damage using comet assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 128, 2017.

MARTIN, F. et al. Antioxidant C-glucosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1887–1890, 2008.

MEI, N. et al. Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews**, v. 13, n. 7–8, p. 509–526, 3 dez. 2010.

MIRANDA, N. et al. Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of *Arrabidaea chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 256–265, set. 2017.

MOLYNEUX, R. J. et al. Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2973–2985, nov. 2007.

MORALES, J. et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 24, n. 1, p. 15–28, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NANDHAKUMAR, S. et al. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 107–11, abr. 2011.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=23652247. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23652247>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=16093658. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16093658>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=480865. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/480865>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=182259. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/182259>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=480859. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/480859>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=480860. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/480860>>. Acesso em: fev. 3, 2019.

NAVÉ, B. T. et al. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **The Biochemical journal**, v. 344 Pt 2, p. 427–31, 1 dez. 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

NIETO, M. A. et al. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21–45, 30 jun. 2016.

OLIVARES, O. et al. Research into cancer metabolomics: Towards a clinical metamorphosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 43, p. 52–64, 2015.

OLIVER, F. J. et al. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33533–9, 11 dez. 1998.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–8, 30 ago. 1984.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 mar. 2012.

PAULETTI, P. M.; DA SILVA BOLZANI, V.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Quimica Nova**, v. 26, n. 5, p. 641–643, 2003.

PAWELETZ, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 1, p. 72–75, 2001.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 2, p. 108–111, 2005.

PEREIRA, Ivan de Oliveira. Determinação da atividade leishmanicida, antiproteolítica e antioxidante de *Arrabidaea brachypoda*. 2012. 99 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104773>>.

PRÄBST, K. et al. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: Cell Viability Assays**. New York, NY: Springer NY, 2017. v. 1601p. 1–17.

QIAO, Y. et al. Herbacetin induces apoptosis in HepG2 cells: Involvements of ROS and PI3K/Akt pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 426–433, jan. 2013.

RASHID-DOUBELL, F.; HOROBIN, R. W. Selection of fluorescent golgi complex probes using structure-activity relationship models. In: **Biotechnology Applications of Microinjection, Microscopic Imaging, and Fluorescence**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 73–78.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–31, 2008.

RESENDE, F. A. et al. *In vitro* toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 29–35, nov. 2017.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Kraho Indians, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 2, p. 129–135, 2005.

RODRIGUES, R. M. et al. Assessment of an automated *in vitro* basal cytotoxicity test system based on metabolically-competent cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 760–767, 2013.

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, 2 nov. 2017.

ROGERS, M. et al. Synergistic growth inhibition of PC3 prostate cancer cells with low-dose combinations of simvastatin and alendronate. **Anticancer research**, v. 35, n. 4, p. 1851–9, 1 abr. 2015.

ROSSANT, J.; HOWARD, L. Signaling pathways in vascular development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 541–573, 2002.

SAAD, Gláucia de Azevedo et al. Fitoterapia Contemporânea - Tradição e Ciência na Prática Clínica. 2. ed. [s.l.]: Guanabara Koogan, 2016.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421–7, 2014.

SERPELONI, J. M. 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.

SHAHEEN, S.; AHMAD, M.; HAROON, N. Edible Wild Plants: A Solution to Overcome Food Insecurity. In: **Edible Wild Plants: An alternative approach to food security**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 41–57.

SHAW, D. Toxicological risks of Chinese herbs. **Planta Medica**, v. 76, n. 17, p. 2012–2018, 12 dez. 2010.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introduction to Food Toxicology**. 2. ed. California: Elsevier/AP, 2009.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715–748, 20 jun. 2017.

SILVA, A. F. et al. Effects of β -glucan extracted from *Agaricus blazei* on the expression of *ERCC5*, *CASP9*, and *CYP1A1* genes and metabolic profile in HepG2 cells. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 647–654, 19 jun. 2013.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–91, mar. 1988.

SINGH, S. et al. Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1667, 8 nov. 2016.

SMOLINSKA, A. et al. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 82–97, 2012.

SNEADER, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. **British Medical Journal**, v. 321, n. 7276, p. 1591–1594, 23 dez. 2000.

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, 25 dez. 2016.

SPENCER, S. L. et al. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 369–83, 10 out. 2013.

SRIVIDYA, A. R. et al. Antioxidant and antidiabetic activity of *Alpinia galanga*. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**, v. 3, n. 1, p. 6–12, 2011.

STOCKERT, J. C. et al. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159–167, abr. 2018.

STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. In: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. (Eds.). **Methods in molecular biology**. 1. ed. NY: Humana Press, New York, NY, 2011. v. 740p. 1–6.

TACKLIND, J. et al. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, 12 dez. 2012.

TALORETE, T. P. N. et al. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. **Cytotechnology**, v. 52, n. 3, p. 189–198, 2006.

TANG, C. L. et al. Focal adhesion kinase signaling is necessary for the Cyclosporin A-enhanced migration and invasion of human trophoblast cells. **Placenta**, v. 33, n. 9, p. 704–11, 2012.

TERRANOVA, V. P.; HUJANEN, E. S.; MARTIN, G. R. Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, n. 2, p. 311–316, 1986.

TIAN, J. et al. Inhibition of melanoma cell motility by the snake venom disintegrin eristostatin. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 899–908, 2007.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.

TOMITA, M.; NISHIOKA, T. **Metabolomics: The Frontier of Systems Biology**. 1. ed. Springer Japan, 2005.

TUTTIS, Katuska. Avaliação da citotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade de extrato de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. *in vitro*. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

UCHINOMIYA, S. et al. Prediction of intracellular localization of fluorescent dyes using QSAR models. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 5, p. 378–83, 2016.

VANDEN BERGHE, T. et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, 2013.

VREE, T. B. et al. Identification in hashish of tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol analogues with a methyl side-chain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 7–12, 1972.

WALLACH, D. et al. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. **Science**, v. 352, n. 6281, p. aaf2154-aaf2154, 1 abr. 2016.

WANDER, S. A.; ZHAO, D.; SLINGERLAND, J. M. p27: A barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 12–18, 1 jan. 2011.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 5 maio 1971.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–81, 15 set. 2014.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 3, p. 165–176, mar. 2016.

ZHANG, F. et al. Astrocyte elevated gene-1 interacts with β -catenin and increases migration and invasion of colorectal carcinoma. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. 8, p. 603–610, 2013.

ZHANG, L. et al. FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. **Toxicology Letters**, v. 236, n. 1, p. 43–59, 2015.

ZHANG, Y. et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell Research**, v. 28, n. 1, p. 9–21, 27 jan. 2018.

ZHUANG, W. J. et al. Involvement of NF-kappaB and c-myc signaling pathways in the apoptosis of HL-60 cells induced by alkaloids of *Tripterygium hypoglaucum* (levl.) Hutch. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 11, n. 4, p. 295–302, 2004.

ZIMMERMANN, S.; MOELLING, K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5445, p. 1741–4, 26 nov. 1999.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 831–835, 2001.

ZOU, Y. et al. Application of LDH-Release assay to cellular-level evaluation of the toxic potential of harmful algal species. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 2, p. 345–352, 2013.

ZUANG, V. The neutral red release assay: A review. In: **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**. v. 29, p. 575–599, set. 2001.